

**UNIVERSITE DE NANTES**  
U.F.R. DE MEDECINE

**THESE DE DOCTORAT**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANTES**

Ecole doctorale Biologie-Santé  
Discipline : Biologie, médecine et santé  
Spécialité : Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement le 14 Octobre 2010

Par

**Sandrine LAVENUS**

**ÉTUDES DES INTERACTIONS ENTRE CELLULES SOUCHES  
ET SURFACES IMPLANTAIRES NANOSTRUCTUREES**

Devant le jury ci-dessous

**Rapporteurs :**

Mme. Marie-Christine DURRIEU      Chargé de recherche INSERM (Bordeaux)  
M. Matthew DALBY                      Professeur Associés (Glasgow, Ecosse)

**Directeur de thèse :**

M. Pierre LAYROLLE                      Directeur de recherche INSERM (Nantes)

**Co-directeur de thèse :**

M. Guy LOUARN                          Professeur des Universités CNRS (Nantes)

**Examineurs :**

M. Patrick CHABRAND                      Professeur des universités (Marseille)  
M. Dominique HEYMANN                      Professeur des Universités (Nantes)

*« En fin de compte tout s'arrange, sauf la difficulté d'être, qui ne s'arrange pas »*

Jean Cocteau, extrait de « la difficulté d'être ».

# Publications

**Lavenus S.,** Ricquier J. C., Louarn G., Layrolle P. “Cell interaction with nanopatterned surface of implants” (2010) *Nanomedicine*, 5 (6), 937-947

**Lavenus S.,** Louarn G., Layrolle P. “Nanotechnology and dental implants” (2010) chapter of “Nanotechnology for dental applications”, In press.

**Lavenus S.,** Pilet P., Weiss P., Guicheux J., Louarn G., Layrolle P.. “Behaviour of mesenchymal stem cells on smooth surface” *Acta Biomaterialia* *submitted*

**Lavenus S.,** Berreur M., Trichet V., Louarn G., Layrolle P. “Adhesion and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on titanium nanopores” Under submission to *Nanoletters*

**Lavenus S.,** Lechevalier S., Amiaud J., Hoornaert A., Louarn G., Layrolle P. “Cell differentiation and osteointegration influenced by nanoscale anodized titanium surfaces” Under submission to *Biomaterials*.

# Présentation congrès

## 2010:

S. Lavenus, J-L. Milan, G. Louarn, P. Layrolle, P. Chabrand “ Adhésion cellulaire sur surfaces nano-structurées”  
GDR mécanotransduction (Compiègne, France), June 2010. Oral presentation.

S. Lavenus, S. Le Chevalier, A. Hoornaert, P. Bertoncini, G. Louarn, P. Layrolle “ Mesenchymal stem cells differentiation on nanostructured surface ”  
Third International NanoBio Conference (Zurich, Switzerland), August 2010, Poster presentation.

S. Lavenus, G. Louarn, P. Layrolle “Mesenchymal stem cells adhesion on nanostructured surface”  
Third International NanoBio Conference (Zurich, Switzerland), August 2010, Poster presentation.

S. Lavenus, S. Lechevalier, P. Bertoncini, G. Louarn, P. Layrolle “Mesenchymal stem cells adhesion on nanostructured titanium measured by AFM”  
23rd European Society for Biomaterials (ESB, Tampere, Finland), September 2010, Oral presentation.

## 2009

S. Lavenus, P. Pilet, G. Louarn, P. Weiss, J. Guicheux, P. Layrolle “Etude du comportement des ostéoblastes, fibroblastes et cellules souches humaines sur différents substrats ”

- Scientific day in Nantes University, June 2009, Oral presentation.
- GDR mécanotransduction (Marseille, France), June 2009, Oral presentation.
- 1st day for society of Biomaterials for Dentistry (SFBD, Reims, France), June 2009, Oral presentation.
- RMB (Angers, France) June 2009, Oral presentation.
- PhD student forum (Nantes, France), November 2009, Poster presentation and best poster presentation.
- Bioadh (Le Mans, France) November 2009, Oral presentation.

S. Lavenus, P. Pilet, G. Louarn, P. Weiss, J. Guicheux and P. Layrolle “Comparative behaviors of human cells on different surfaces”  
22nd European Society for Biomaterials (ESB, Lausanne, Switzerland), September 2009, Poster presentation.

## 2008:

S. Lavenus, G. Louarn, P. Pilet, P. Weiss, J. Guicheux, P. Layrolle “Interaction between bone cells and nanostructured implanted surface”  
Scientific day in Nantes University, June 2008, Oral presentation.

# **Table des matières**

Table des matières .....	5
Abréviations .....	8
Introduction générale.....	10
Chapitre I :.....	13
Mise au point bibliographique sur les interactions entre cellules et surfaces implantaires nanostructurées.....	13
I. Introduction .....	14
II. Le tissu osseux .....	15
1. Les propriétés mécaniques du tissu osseux .....	15
2. Les propriétés métaboliques .....	16
3. L'hématopoïèse .....	16
4. Structure et Composition du tissu osseux .....	18
III. Les implants .....	28
1. La composition chimique des implants .....	29
2. La rugosité de surface des implants .....	30
3. Les traitements de surface des implants .....	31
IV. Modification de la rugosité au niveau nanométrique .....	33
1. Les traitements chimiques .....	33
2. Les traitements physiques .....	34
3. L'anodisation.....	34
V. Caractérisation des nanostructures .....	36
VI. L'adsorption protéique .....	38
1. Les protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire .....	39
2. L'adsorption des protéines sur les surfaces implantaires .....	40
VII. L'adhésion et la prolifération cellulaire .....	42
1. L'adhésion cellulaire .....	42
2. Les intégrines et les voies de signalisation.....	44
3. L'adhésion cellulaire sur les surfaces nanostructurées .....	48
VIII. La différenciation cellulaire sur les surfaces nanostructurées.....	52
1. La différenciation fibroblastique .....	52
2. La différenciation ostéoblastique .....	53
IX. Etudes <i>in vivo</i> .....	58
1. L'ostéointégration des implants .....	58
2. Les études précliniques .....	60
3. Les études cliniques .....	62
X. Les interactions entre les cellules et les surfaces nanostructurées .....	62
1. Article 1: Interaction cellulaire avec les surfaces implantaires nanostructurées.....	63
2. Chapitre livre: Nanotechnologie et implant dentaire .....	64
XI. Conclusion.....	79
Chapitre II : .....	80
Matériels et méthodes.....	80
I. Les matériaux .....	81
1. Le titane.....	81
2. Les pastilles de verre .....	81
3. Les membranes nanoporeuses .....	81
4. Revêtement de titane sur les membranes nanoporeuses.....	81
5. Préparation des anneaux de verre .....	82
6. Nanostructuration du titane par anodisation.....	83
II. Méthodes de caractérisation des matériaux.....	84
1. Microscopie électronique à balayage .....	84

2.	Microscopie à force atomique .....	85
3.	Analyse de la composition chimique .....	86
4.	La mesure de l'angle de contact .....	87
5.	Le potentiel zêta .....	87
III.	Culture cellulaire .....	88
1.	hCSM/MC3T3-E1/HGF-1 .....	88
2.	Décongélation/entretien/milieux .....	89
3.	Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses humaines .....	90
IV.	Etude de l'adhésion .....	92
1.	L'ensemencement.....	92
2.	La mesure de la force d'adhésion par AFM liquide : cellHesion.....	92
3.	L'immunomarquage et facteurs de formes.....	95
V.	Etude de la prolifération .....	97
VI.	Etude de la différenciation .....	97
1.	L'ensemencement.....	97
2.	Dosage de la phosphatase alcaline (PAL) .....	97
3.	La coloration et l'extraction du rouge alizarine .....	98
VII.	Etude de l'expression des transits par PCR en temps réel .....	99
1.	Extraction des ARN totaux .....	99
2.	Reverse-transcription (RT).....	99
3.	PCR en temps réel .....	99
4.	PCR array .....	102
VIII.	Etude in vivo .....	102
1.	Préparation des implants .....	102
2.	Modèle animal et site d'implantation.....	102
3.	Anesthésie et préparation du site opératoire.....	103
4.	Abord chirurgical .....	103
5.	Procédure d'explantation.....	104
6.	Analyse de l'attachement implantaire .....	104
7.	Histologie et histomorphométrie .....	104
	Chapitre III : .....	106
	Etude du comportement des cellules souches sur des surfaces lisses .....	106
I.	Introduction .....	107
II.	Article 2: Comportement des cellules souches mésenchymateuses sur des surfaces lisses 110	
III.	Discussion .....	133
	Chapitre IV .....	136
	Etude des interactions cellules/surfaces nanostructurées .....	136
I.	Introduction .....	137
II.	Article 3 : Effet des nanopores sur l'adhésion et la différenciation .....	141
III.	Article 4 : Différenciation cellulaire et ostéointégration de surface anodisée en titane 161	
IV.	Discussion .....	182
	Conclusions générales et perspectives .....	188
	Listes des figures et tableaux.....	193
	Références bibliographiques .....	194

# Abréviations

AA: Acide ascorbique  
AFM: Microscopie à force atomique  
ATP: Adénosine tri-phosphate  
BMP: Bone morphogenic proteins  
BSA: Bovin serum albumin- Albumine bovine  
BSP: Bone sialoprotein- Sialoprotéine osseuse  
CaP: Calcium phosphate- Phosphate de calcium  
Cbfa-1: Core binding factor alpha-1  
Col I: Collagène de type I  
CSH: Cellule souche hématopoïétique  
CSM: Cellule souche mésenchymateuse  
Dex: Déxaméthaxone  
DMSO: Diméthylsulfoxyde  
EDX: Energy dispersive X-ray spectrometry-Spectroscopie par dispersion en énergie des rayons X  
FN: Fibronectine  
GAP: Jonctions communicantes  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Acide sulfurique  
HA: Hydroxyapatite  
HF: Acide fluorhydrique  
HNO<sub>3</sub>: Acide nitrique  
IGF: Insulin-like Growth factors-Facteur de croissance semblable à l'insuline  
IL: Interleukine  
Itg: Intégrine  
Lama: Laminine  
MEB: Microscopie électronique à balayage  
MEC: Matrice extracellulaire  
MMA: Méthyl méthacrylate  
MMP: Métalloprotéinase  
NK: Natural Killers  
OCN: Ostéocalcine  
OPG: Ostéoprotégérine  
OPN: Ostéopontine  
PAL: Phosphatase alcaline- Alcaline phosphatase (ALP)  
PBS: Phosphate buffer saline-Tampon phosphate  
PCR: Polymerase chain reaction  
PFA: Paraformaldéhyde  
Pi: Phosphate inorganique

Ppi: Pyrophosphate inorganique  
PTH: hormone parathyroïdienne  
PVD: Dépôts physique en phase vapeur  
RANK: Receptor Activator of Nuclear factor kappa B  
RANKL: Receptor Activator of Nuclear factor kappa B ligand  
RGD: Arginine-glycine-acide aspartique, séquence peptidique  
RT: Reverse transcription- Transcription inverse  
SIBLING: Small Integrin Binding Ligand Nlinked Glycoprotein  
Sp1: Secreted Phosphoprotein 1  
SPARC: Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine  
SVF: Sérum de veau foetal  
TCPS: Tissue culture polystyrene- Plastique de culture  
TGF: Transforming growth factor  
Ti: titanium- Titane  
TiO<sub>2</sub>: Oxyde de titane  
TNAP: Tissue non-specific alcalin phosphatase- Phosphatase alcaline tissulaire non spécifique  
TNF: Tumor Necrosis Factor  
TRAP: Phosphatase acide résistante au tartrate  
VN: Vitronectine  
XPS: X-Ray Photoelectron Spectroscopy- Spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X

# **Introduction générale**

Des forts taux de succès cliniques sont actuellement obtenus pour les réhabilitations prothétiques. Les implants dentaires et prothèses orthopédiques en titane sont appréciés pour leurs excellentes propriétés mécaniques, leur résistance à la biocorrosion et leurs propriétés de surface qui les rendent biocompatibles avec le tissu osseux. Différents travaux ont montré que les propriétés de surfaces telles que la rugosité, la mouillabilité, la charge électrique et la composition chimique, modulent l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire. L'étude des interactions entre cellules et surfaces implantaires est ainsi essentielle pour la compréhension de l'intégration tissulaire des implants.

L'objectif de ce travail est l'étude de l'adhésion et la différenciation de cellules souches mésenchymateuses sur des surfaces en titane nanostructurées. Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à une mise au point bibliographique dans le domaine des interactions entre cellules et surfaces implantaires. Après un préambule sur le tissu osseux et les implants, les différents procédés permettant d'obtenir et de caractériser des surfaces implantaires nanostructurées sont décrits. L'adsorption protéique sur les surfaces implantaires est développée, ainsi que les études décrivant l'adhésion et la différenciation cellulaire sur ces surfaces. Le second chapitre concerne les matériels et méthodes mis en œuvre aux cours de cette thèse.

Dans le troisième chapitre, nous présentons l'étude de l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules sur des substrats ayant des compositions chimiques différentes mais des rugosités similaires. Après caractérisation des surfaces, le comportement de cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSM), d'ostéoblastes (MC3T3-E1) et de fibroblastes gingivaux (HGF-1) est étudié sur du titane poli miroir (Ti) dont la rugosité est inférieure à 40 nm. Les résultats sont comparés au comportement cellulaire sur des substrats de référence tels que le plastique de culture (TCPS) et le verre. L'adhésion cellulaire est étudiée par comptage au bleu Trypan, marquage du cytosquelette et immunomarquage des points focaux. Un programme d'analyse d'images a été développé pour permettre de caractériser la morphologie cellulaire et le nombre de points focaux. Enfin, la différenciation ostéoblastique est mesurée par dosage de la phosphatase alcaline et par coloration au rouge alizarine. Cette première étude nous a permis de mettre au point les protocoles d'études de l'adhésion et de la différenciation ostéoblastique sur les différents substrats.

Le dernier chapitre de ce travail concerne l'étude des interactions à court et à long terme de cellules souches mésenchymateuses (hCSM) avec différentes surfaces nanostructurées. Ces résultats *in vitro* sont corrélés à une étude sur l'ostéointégration du titane nanostructuré implanté dans des tibias de rats.

Dans une première étude, une évaporation de titane est réalisée dans une enceinte sous vide et permet de déposer une couche de 5 nm sur des membranes de polycarbonate percées par des pores de 30, 150 ou 300 nm de diamètre. Des PCR arrays suivis de qPCR nous permettent de déterminer l'influence des nanostructures sur l'expression des gènes impliqués dans l'adhésion. Les techniques d'immunomarquage et d'analyse d'images sont utilisées pour quantifier l'adhésion cellulaire. L'influence des nanostructures sur la différenciation ostéoblastique est également étudiée.

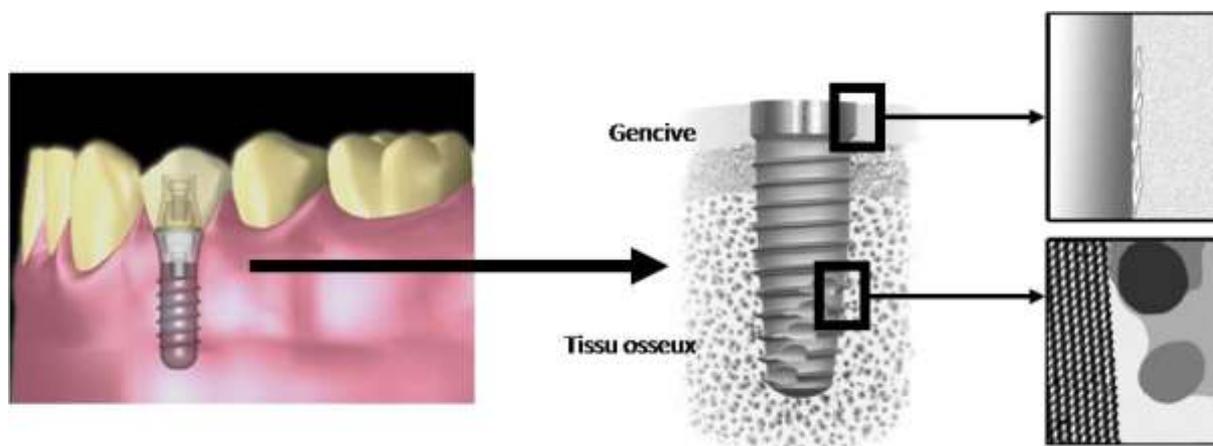
Dans une seconde étude, des surfaces en nids d'abeilles avec des pores de 20, 30 et 50 nm sont obtenues par anodisation. L'influence de la taille des pores sur la différenciation ostéoblastique des hCSM est étudiée par puce à ADN et qPCR. Enfin, une expérimentation *in vivo* permet l'étude de l'ostéointégration d'implants nanostructurés par analyse histomorphométrique et tests mécaniques après 1 et 3 semaines d'implantation dans des tibias de rats.

# **Chapitre I :**

## **Mise au point bibliographique sur les interactions entre cellules et surfaces implantaires nanostructurées**

## I. Introduction

En raison de l'augmentation de l'espérance de vie dans les pays industrialisés, le marché des implants dentaires et orthopédiques augmente de 15 % chaque année (Langer & Vacanti 1993) (Millénium research group's reports, 2005). La pose de prothèse totale de hanche et de genou est couramment réalisée avec un taux de succès clinique supérieur à 95 %. En réponse aux millions de patients édentés, des racines artificielles de dents sont implantées dans le maxillaire et la mandibule pour restaurer la dentition (Figure n°1). De nombreuses études ont démontré une forte corrélation entre le taux de succès clinique à long terme et l'ostéointégration précoce des implants.



**Figure 1: Implant dentaire montrant une surface différente en fonction du tissu environnant (Lavenus et al. 2011)**

Les métaux en particulier le titane et ces alliages sont largement utilisés dans la fabrication d'implants dentaires et orthopédiques. La passivation de surface du titane le rend biocompatible. La fixation biomécanique de l'implant en titane au tissu osseux peut être améliorée par la rugosité de surface du titane ou par la création d'une surface poreuse. Des traitements de surface ont été développés afin d'améliorer l'ostéointégration des implants en titane. Ces traitements ont pour objectif d'apporter au titane des propriétés biologiques de surface afin de favoriser l'adsorption de protéines, l'adhésion cellulaire et la repousse osseuse au contact par ostéoconduction (propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse). Différentes études ont montré que les propriétés de surface telles que la rugosité, la mouillabilité, la charge électrique et la composition chimique, modulent l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire (Dalby et al. 2007; Le Guehennec, h et al. 2008; Anselme et al. 2000,) et par conséquent, l'ostéointégration des implants.

Actuellement, différents traitements de surface tels que le sablage, le mordantage acide, le traitement par plasma et les revêtements de phosphate de calcium sont couramment utilisés sur les implants métalliques. Cependant, bien que les enjeux pour ce domaine de recherche soient considérables, le rôle précis des propriétés de surface dans la réponse biologique reste à déterminer.

L'étude des interactions entre cellules et surfaces implantaires est essentielle pour la compréhension de leur intégration tissulaire. En effet, l'attachement, l'adhésion et l'étalement constituent la première phase des interactions cellules/matériaux. La qualité de cette première phase va influencer la capacité des cellules à proliférer et à se différencier au contact des matériaux. En retour, la différenciation cellulaire conditionne la nature du tissu dans la zone peri-implantaire. Ainsi, un tissu fibreux est préférable au niveau de la gencive alors qu' autour de la racine artificielle, un tissu osseux est voulu.

## **II. Le tissu osseux**

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé composé d'une fraction organique et d'une fraction minérale, dont la substance fondamentale est calcifiée, ce qui lui confère ses propriétés de rigidité et d'élasticité. Véritable « charpente » de l'organisme, l'os minéralisé constitue la partie porteuse de l'appareil locomoteur avec trois fonctions principales : mécanique, métabolique et hématopoïétique (Clarke 2008).

Le tissu osseux, caractérisé par sa dureté et son apparente rigidité, n'est pas pour autant figé. En effet, tout au long de la vie, le tissu osseux est en continuel remaniement, c'est-à-dire que l'os est régulièrement détruit puis reconstruit au cours des différentes phases d'un processus appelé remodelage osseux.

### **1. Les propriétés mécaniques du tissu osseux**

Les os forment la charpente du corps humain et permettent les mouvements, le maintien de la posture ainsi que la locomotion. Les tendons, attachés aux os, permettent conjointement avec les articulations et les muscles, la mobilisation de certaines parties du corps ainsi que du corps dans son ensemble dans les 3 dimensions de l'espace. Les os protègent d'autres structures et organes importants : le cerveau et la moelle épinière sont protégés par le crâne et la colonne vertébrale ; les poumons, le cœur et le foie sont protégés par les vertèbres et la cage thoracique. L'os participe également à l'audition via la transduction mécanique des sons

(Stenfelt & Goode 2005). L'onde sonore parvient au tympan par le conduit auditif externe. Les vibrations qui en résultent sont transmises aux osselets constitués du marteau, de l'enclume et de l'étrier dans l'oreille interne, contenus dans la partie pétreuse de l'os temporal. Cette vibration est ensuite transmise à la cochlée située dans l'oreille interne.

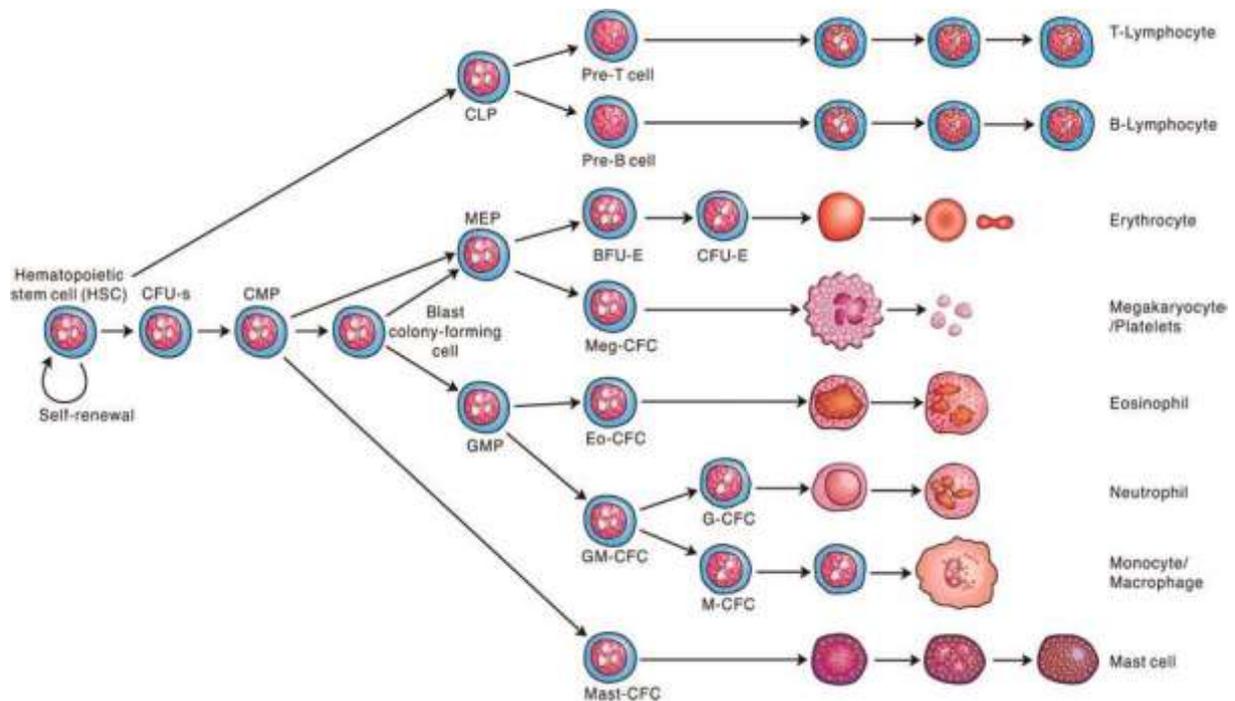
## **2. Les propriétés métaboliques**

Les os constituent une zone de stockage importante d'ions calcium et de phosphate rapidement mobilisables. Les os jouent donc un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie phosphocalcique grâce au remodelage osseux. Une hypercalcémie entraîne une augmentation de la formation et de la minéralisation osseuse afin de ramener la concentration calcique à un taux physiologique. A l'inverse, une diminution de la calcémie est responsable d'une diminution de la formation osseuse et d'une stimulation de la résorption osseuse afin de permettre une libération rapide de calcium. La régulation de l'homéostasie phosphocalcique est sous le contrôle de nombreuses hormones notamment la calcitonine et l'hormone parathyroïdienne (PTH). Les os interviennent aussi dans la régulation de l'équilibre acido-basique. Ils tamponnent les variations de pH en absorbant ou en libérant des sels calciques. Des facteurs de croissance tels que l'IGF (Insulin-like Growth factors), le TGF (Transforming growth factor), les BMP (Bone morphogenic proteins), y sont également stockés. Enfin, les os sont impliqués dans le processus de détoxication. Ils sont capables d'emmagasiner les métaux lourds et d'autres exotoxines afin d'abaisser leur concentration sanguine et de réduire leurs effets sur les autres tissus. Ils sont ensuite relargués de manière progressive en vue de leur excréation.

## **3. L'hématopoïèse**

L'os est un réservoir de facteurs de croissance et de cytokines qui assure un environnement propice à l'hématopoïèse. La moelle rouge contenue principalement dans les os plats chez l'homme est le lieu de production des cellules sanguines. L'hématopoïèse permet à l'organisme de produire et de renouveler les éléments figurés du sang c'est-à-dire les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. Chez l'adulte, toutes les cellules sanguines (lymphocytes, érythrocytes, polynucléaires, monocytes et plaquettes) sont produites à partir d'une même cellule indifférenciée dite cellule souche hématopoïétique. Sous l'influence de facteurs stimulants, une cellule multipotente se différencie progressivement vers différents lignages cellulaires (Figure n°2). Cette cellule se divise en différentes cellules progénitrices,

elles-mêmes multipotentes. Puis au terme de divisions successives, ce progéniteur devient monopotent c'est-à-dire capable de générer une seule lignée cellulaire. Ce dernier va se différencier en précurseurs (ce sont des cellules identifiables morphologiquement dans un prélèvement de moelle osseuse) qui vont subir des mitoses puis une étape de maturation pour aboutir à la production de cellules fonctionnelles qui passent dans le sang.



**Figure 2: Schéma général de l'hématopoïèse (Metcalf 2007)**

La cellule souche hématopoïétique (CSH) s'oriente soit vers la lignée lymphoïde, soit vers la lignée myéloïde (Figure n°2). Un stimulus lymphoïde permettra une différenciation de la CSH en lymphocyte T ou B, ou bien en Natural Killers (NK). En revanche, si elle reçoit un signal myéloïde, elle se différenciera en progéniteur myéloïde primitif qui s'engagera vers la lignée mastocytaire pour aboutir à la formation de mastocyte ou vers la lignée GEMM (Granuleuse, Erythrocytaire, Macrophage, Mégacaryocytaire) (Metcalf 2007).

## 4. Structure et Composition du tissu osseux

### a. Anatomie de l'os

Le squelette adulte est constitué d'environ 208 os. Un os long typique chez l'adulte est formé d'une partie centrale cylindrique appelée diaphyse et de deux extrémités élargies et arrondies appelées épiphyses, couvertes de cartilage articulaire. Des régions coniques, appelées métaphyses, connectent la diaphyse à chaque épiphyse. La forme particulière des os longs leur confère la capacité de résister aux forces de flexion, de traction et de cisaillement. Histologiquement, l'os compact (ou corticale) est distingué de l'os spongieux (ou trabéculaire). L'ensemble est entouré d'une enveloppe externe, le périoste, excepté au niveau du cartilage articulaire et aux endroits d'insertion des tendons et des ligaments (Figure n°3).

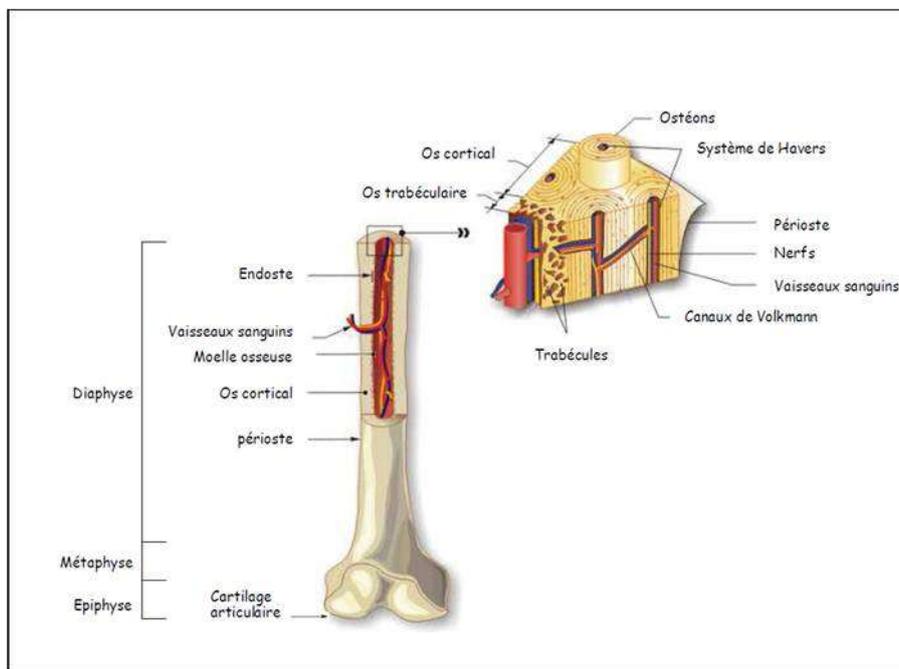


Figure 3: Structure d'un os long, modifiée d'après <http://courses.washington.edu/bonephys>

La classification en os compact et trabéculaire est basée sur le degré de porosité :

- 5 à 30 % pour l'os compact qui constitue surtout la corticale compacte de la diaphyse des os longs
- 30 à 90 % pour l'os trabéculaire situé essentiellement au centre de la diaphyse et dans les régions métaphysaires et diaphysaires, ainsi que dans les os courts et plats.

L'os compact est un os mature, dense, contenant moins de 10 % de tissu mou, présent dans la couche externe de tout os. L'os compact, représentant environ 80 à 85% du tissu osseux, a un rôle mécanique et métabolique important. Il est principalement constitué d'ostéons ou du système de Havers, correspondant à de petites lamelles osseuses cylindriques disposées de manière concentrique autour du canal de Havers. Dans la matrice extracellulaire, des logettes appelées ostéoplastes et contenant des ostéocytes sont présentes. Les canaux de Havers sont reliés entre eux ainsi qu'avec la cavité médullaire et la surface de l'os par des canaux transversaux ou obliques appelés canaux de Volkmann conférant à l'os compact une résistance optimale. Chaque canal de Havers est innervé et contient des capillaires sanguins.

L'os spongieux est appelé ainsi en raison de sa structure en éponge, faite de travées osseuses où se trouve la moelle hématopoïétique. Il est constitué de trabécules plates ou rondes qui s'entremêlent dans la moelle osseuse. Celle-ci peut être jaune (tissu adipeux) ou rouge (hématopoïétique) et représente 75 % du volume total de l'os spongieux. La microstructure de l'os spongieux permet des échanges particuliers avec la moelle osseuse, d'autant plus que sa surface d'échange est développée ; ceci explique le rôle hématopoïétique de l'os spongieux en fournissant les progéniteurs des différentes lignées sanguines.

Tout au long de la vie, le squelette subit de nombreux remaniements par un processus complexe : le remodelage osseux. Il fait intervenir deux types cellulaires spécialisés : les ostéoclastes, responsables de la dégradation ou résorption osseuse, et les ostéoblastes qui permettent la production de matrice minéralisée (apposition osseuse).

### **b. Organisation du tissu osseux**

Le tissu osseux est un tissu conjonctif minéralisé spécialisé, richement vascularisé et innervé (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil et al. 2006), composé de cellules spécialisées (les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes) ainsi que d'une matrice extracellulaire occupant entre 92 et 95 % du volume tissulaire. Cette matrice extracellulaire contient une phase organique et une phase minérale.

La phase organique est composée en grande majorité de fibres de collagène de type I (représentant 80 % du collagène total de l'os) entourées d'une substance interfibrillaire et présentant une structure hélicoïdale. Le collagène est une protéine longue de 300 nm avec un diamètre de 1,5 nm et comprend trois chaînes élémentaires torsadées en triple hélice : deux

chaînes  $\alpha 1$  et une chaîne  $\alpha 2$ . De plus, la phase organique contient en quantité moindre du collagène de type III (5 à 15 %) et des collagènes « mineurs » de types IV et V (5 %). Outre la présence de collagène dans cette matrice extracellulaire, la substance interfibrillaire composée de protéines non collagéniques représente 10 à 15 % de la phase organique. Parmi celles-ci, l'ostéocalcine (OCN) (10 à 20 % de l'ensemble de ces protéines) contenant des résidus d'acide glutamique carboxylé jouerait un rôle dans l'attraction des ostéoclastes dans les foyers de résorption et dans la minéralisation (Swaminathan 2001; Glowacki et al. 1991). Des glycoprotéines sont présentes dans la matrice extracellulaire, telles que l'ostéopontine (OPN) et la sialoprotéine osseuse (BSP) qui interviennent dans l'adhésion des ostéoclastes sur la travée osseuse. D'autres facteurs importants dans l'activation cellulaire et dans le couplage entre la formation et la résorption osseuse (Horwood et al. 1998) sont disponibles dans cette matrice notamment des protéoglycanes, des cytokines et des facteurs de croissance tels que le Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), l'IGF, le Tumor Necrosis Factor (TNF), les interleukines (IL) et les BMP (Hauschka et al. 1986).

La phase minérale de la matrice osseuse est composée de phosphate de calcium (CaP) cristallisé sous forme de cristaux d'hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , soit 70 % du poids total de l'os ce qui lui confère sa rigidité et sa solidité. De ce fait, le squelette contient environ 1 kg de calcium et constitue la principale réserve de calcium de l'organisme (99 %).

### **c. Les cellules du tissu osseux**

Le tissu osseux est composé de cellules spécialisées permettant son maintien (Figure n°4). Ces cellules sont soit ostéoformatrice (les ostéoblastes et les ostéocytes) soit ostéorésorbante (les ostéoclastes). Les cellules souches mésenchymateuses présentes dans le tissu ou apportées par la circulation sanguine, vont permettre sa cicatrisation. Dans ce paragraphe, nous allons aborder les fonctions et les mécanismes d'actions de ces différents types cellulaires.

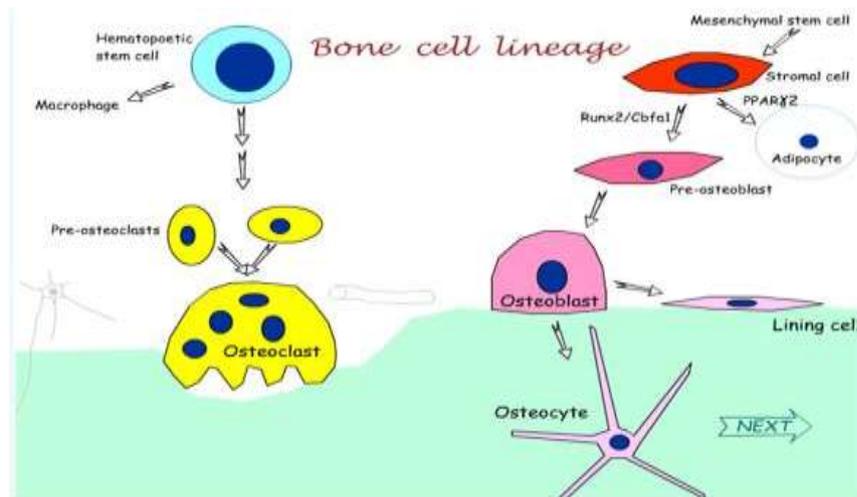


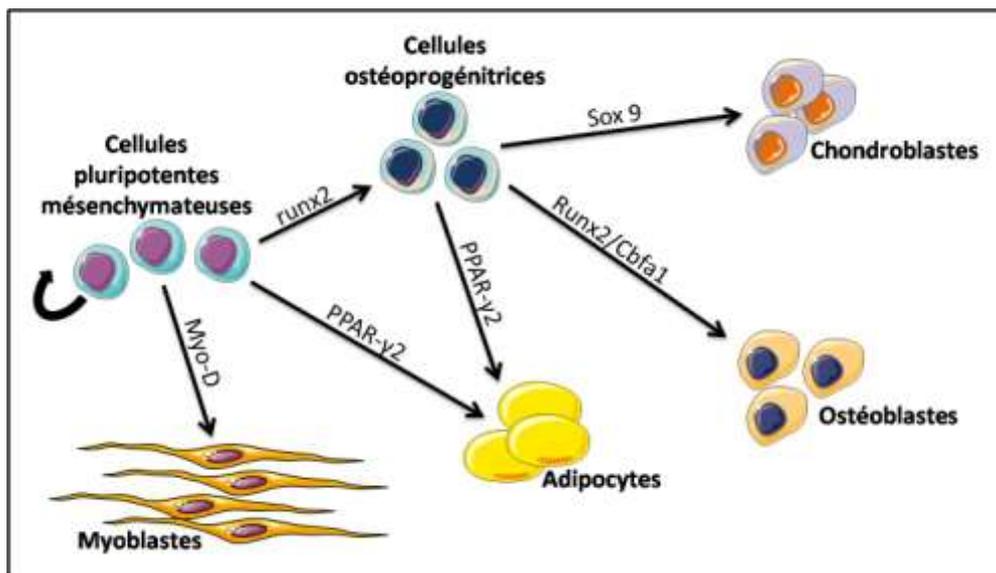
Figure 4 : Lignées cellulaires osseuses et les effets des principales hormones  
<http://courses.washington.edu/bonephys/physiology.html>

#### (i) Les cellules souches mésenchymateuses

Ces cellules, découvertes grâce aux travaux d'A.J. Friedenstein à partir de la fin des années 60 (Friedenstein et al. 1968) et isolées de la moelle osseuse par leur capacité d'adhérence au plastique, constituent un élément important de la niche hématopoïétique *in vivo*. D'aspects fibroblastiques après mise en culture, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) dérivent des tissus somatiques et possèdent la capacité de se différencier en cellules de différents phénotypes mésodermiques notamment en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes, cellules stromales de la moelle osseuse ainsi qu'en cellules endothéliales et musculaires. Sous certaines conditions, ces cellules semblent également capables de se différencier en cellules d'origine non-mésodermique telles que les cellules épithéliales (Sensebé et al. 2010).

Les CSM sont présentes dans de nombreux tissus conjonctifs et dans le sang en faible quantité et assurent le maintien tissulaire. Elles se distinguent des autres types cellulaires par 2 caractéristiques. Tout d'abord, ce sont des cellules non spécialisées capables d'auto-renouvellement même après une longue période d'inactivité. Ensuite, sous certaines conditions physiologiques ou expérimentales, elles peuvent être incitées à devenir des cellules spécifiques d'un tissu ou d'un organe avec des fonctions précises.

Les CSM ont une haute capacité de prolifération élevée et peuvent se différencier sous l'influence de signaux perçus dans leur microenvironnement. Elles sont classiquement définies comme des cellules adhérentes, non hématopoïétiques exprimant des marqueurs membranaires tels que CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105 et CD166 et sont négatives pour d'autres marqueurs tels que CD14, CD34 et CD45.



**Figure 5: Les ostéoblastes proviennent de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses (D'après Marie P.J, Médecine/Sciences 2001).**

D'origine mésodermique dans la plus grande partie du squelette, mais issus des crêtes neurales dans les os du crâne et de la face, les progéniteurs ostéoblastiques sont des cellules mésenchymateuses. Chez l'adulte, ces cellules sont essentiellement présentes dans le périoste et le stroma de la moelle osseuse, avec des progéniteurs extrasquelettiques et/ou circulants (Bianco & Cossu 1999). Sous le contrôle de différents facteurs de transcription, les cellules souches peuvent se différencier en chondrocytes, en ostéoblastes, en fibroblastes, en myocytes ou en adipocytes (Owen 1988).

En effet, l'expression de Sox-9 induit la différenciation des cellules dans la voie chondroblastique, celle de Myo-D dans la voie myoblastique et celle de PPAR $\gamma$ 2 dans la voie adipocytaire (Pittenger et al. 1999). Une série complexe d'étapes de prolifération et de différenciation des CSM aboutit aux ostéoblastes matures grâce à l'expression de facteur de transcription Cbfa1/Runx2 (Figure n°5).

### (i) Les ostéoblastes

Au niveau nucléaire, la différenciation des ostéoblastes est sous le contrôle de nombreux facteurs de transcription tels que c-Fos et AP-1 (Wagner 2002; Wang & El-Deiry 2003). Par exemple, le promoteur de l'ostéocalcine présente des sites de liaisons pour AP-1 et est souvent utilisé pour exprimer spécifiquement un gène dans l'ostéoblaste. La liaison d'AP-1 sur le promoteur du gène de l'ostéocalcine a donc pour effet de réprimer son expression dans les progéniteurs proliférants, inhibition levée lors de la différenciation ostéoblastique terminale (McCabe et al. 1996).

Durant la phase de différenciation, les ostéoblastes expriment la phosphatase alcaline (PAL); enzyme fortement exprimée à la surface des cellules, stimulent l'activité de l'adénylate cyclase en réponse à la PTH, synthétisent du collagène de type I (Col I) et de l'OCN puis induisent la formation de nodules minéralisés (Figure n°14).

Les ostéoblastes différenciés sont des cellules mononuclées de forme cuboïdale disposées en couches monocellulaires sur la surface osseuse. Ces cellules ont un rôle double : construire l'os et activer l'ostéoclaste. En effet, les ostéoblastes ont pour fonction principale la synthèse de protéines constituant la matrice organique, composée de collagène de type I et de substance ostéoïde (protéines non collagéniques comme l'ostéocalcine et les protéoglycanes). Du fait de leur activité de synthèse élevée, de nombreux organites se trouvent à la partie apicale du cytoplasme tel que les mitochondries, l'appareil de golgi et un réticulum endoplasmique rugueux très développé. De plus, le cytoplasme renferme des vésicules de calcium qui permettront la minéralisation de la matrice préalablement synthétisée (chez l'homme en moyenne 10- 20 jours après la déposition de la matrice). La régulation de la formation osseuse fait intervenir la PTH et les hormones sexuelles. A l'issue de la période de formation osseuse, les glucocorticoïdes en excès induisent l'apoptose de la majorité des ostéoblastes (65 %). Dans le cas contraire, les ostéoblastes peuvent devenir des cellules bordantes ou subir une différenciation terminale en ostéocytes.

Les cellules bordantes ont pour origine des ostéoblastes aplatis ayant une activité métabolique très réduite (cytoplasme pauvre en organites tels que les mitochondries et un réticulum endoplasmique réduit). Chez l'adulte, seules 15 % des surfaces trabéculaires sont recouvertes d'ostéoblastes actifs. Le reste des surfaces osseuses est recouvert de cellules bordantes. Ces cellules n'ont aucune activité de synthèse mais ont comme principale fonction d'assurer la communication entre la surface osseuse, l'environnement cellulaire et les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse. De plus, les cellules bordantes sous l'influence de stimuli, sont

capables de se multiplier et de se redifférencier en ostéoblastes actifs et/ou de jouer également un rôle durant la phase initiale du remodelage osseux. Sous l'effet de certains signaux, elles libèrent la surface osseuse permettant ainsi l'attraction et l'ancrage des ostéoclastes (Chambers & Fuller 1985).

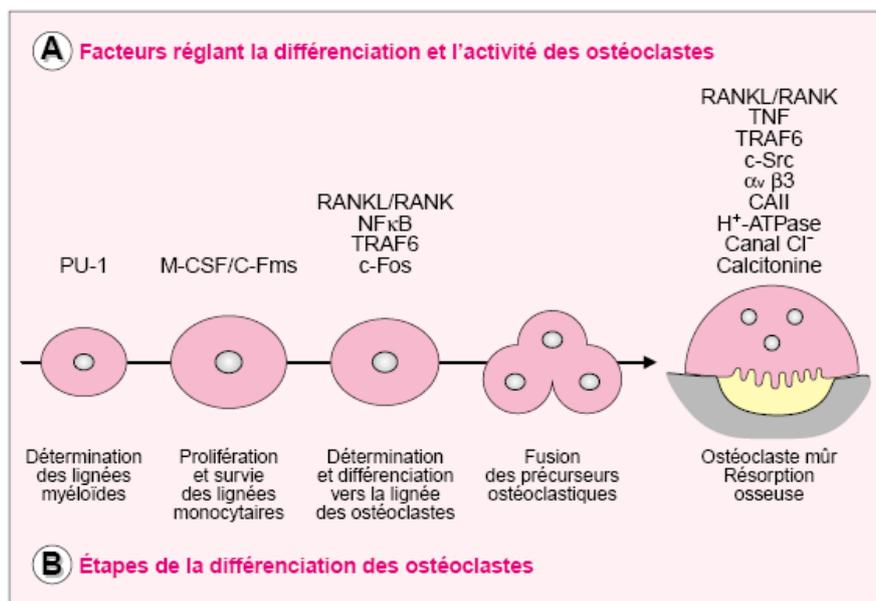
Les ostéocytes proviennent de la différenciation terminale de certains ostéoblastes emmurés au sein de la matrice osseuse, à l'intérieur de lacunes périostéocytaires appelées ostéoplastes. Dix à 20 % des ostéoblastes deviennent des ostéocytes soit  $25\ 000/\text{mm}^3$  de tissu osseux. Au cours de cette différenciation, les ostéoblastes perdent une grande quantité de leurs organites. Possédant de nombreux prolongements cytoplasmiques, les ostéocytes sont reliés les uns aux autres et communiquent avec les cellules bordantes recouvrant la surface osseuse. Les substances nutritives qui proviennent du sang atteignent les ostéocytes en diffusant soit dans les canalicules autour des prolongements cellulaires, soit dans les cellules elles-mêmes, passant de l'une à l'autre par des jonctions communicantes (GAP). Les ostéocytes interviennent essentiellement dans la transmission des signaux mécano-sensoriels et dans les échanges entre les cellules et le microenvironnement (Aarden et al. 1994). Ils régulent la formation osseuse via la sécrétion de sclérostine qui constitue un marqueur spécifique des ostéocytes (Poole et al. 2005). Il semblerait que l'apoptose de ces cellules soit le facteur déclenchant l'ancrage des ostéoclastes à la surface osseuse et par conséquent, la mise en place du processus de résorption et de remodelage.

#### (ii) **Les ostéoclastes**

Les ostéoclastes sont des cellules géantes multinucléées (entre 4 et 20 noyaux regroupés au centre de la cellule) de 10 à 100  $\mu\text{m}$  de diamètre, issues de la fusion de cellules dérivées de précurseur de la lignée myéломocytaire, commun aux cellules dendritiques, aux monocytes/macrophages et aux ostéoclastes. Ces précurseurs se différencient en ostéoclastes sous l'influence de facteurs synthétisés et sécrétés par les cellules stromales ou les ostéoblastes mais également par des contacts directs entre ces différents types cellulaires (Udagawa et al. 1990) (Figure n° 6).

Ce sont des cellules qui possèdent un appareil de golgi très développé autour de chaque noyau, de nombreuses mitochondries périnucléaires ainsi que d'importantes quantités de vésicules lysosomales riches en enzymes telles que la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP), la cathepsine K et des collagénases. Les ostéoclastes sont des acteurs essentiels du remodelage osseux ayant comme activité principale la résorption osseuse.

L'ostéoclaste est une cellule étalée sans polarité membranaire particulière au repos ou en migration, mais qui acquiert une polarité verticale lorsqu'il devient actif durant le phénomène de résorption. En effet, il y a formation d'une membrane spécialisée au contact de l'os, définie par une zone d'ancrage et d'une bordure plissée (ou bordure en brosse) durant la fixation de l'ostéoclaste à la matrice osseuse via les intégrines. La zone d'ancrage permet de créer un espace étroit et hermétique entre l'ostéoclaste et la matrice osseuse qui correspond au compartiment de résorption. La bordure plissée, formant la zone centrale de la membrane spécialisée, est constituée de nombreux replis au niveau desquels s'effectueront les échanges lors de la dégradation du minéral osseux.



**Figure 6 : Différenciation ostéoclastique à partir d'un précurseur hématopoïétique (D'après Marie P.J, Médecine/Sciences 2001).**

L'ostéoclaste peut être observé au fond des lacunes de résorption appelées lacunes de Howship, au contact de la matrice osseuse calcifiée. À ce niveau, l'ostéoclaste est capable d'acidifier le milieu extracellulaire (par la sécrétion de protons) grâce à des pompes à protons qui solubilisent la fraction minérale. La digestion de la trame organique s'effectue ensuite sous l'action des enzymes protéolytiques (cathepsine K, collagénases, métalloprotéases telles que la MMP-9, ...) contenues dans les lysosomes (Blair et al. 1986).

#### d. Le remodelage osseux

Jusqu'à l'âge de 20 ans, la masse osseuse augmente progressivement, puis reste stable pendant quelques années avant de diminuer lentement avec l'âge. Le renouvellement de l'os du squelette adulte est de l'ordre de 10 % par an. Le remodelage osseux est un processus complexe qui fait intervenir deux activités opposées mais complémentaires, conduisant au maintien de la masse osseuse : la destruction de l'os ancien par les ostéoclastes et la formation d'un tissu osseux nouveau par les ostéoblastes (Parfitt 2000). Ces deux types cellulaires agissent de façon orchestrée dans l'espace et dans le temps. Par ces deux activités, le tissu osseux peut remplir son rôle métabolique, par la libération de sels minéraux stockés, et son rôle de soutien par des adaptations architecturales aux contraintes mécaniques.

Le remodelage osseux peut être déclenché par des stimuli de nature :

- mécanique, suite à l'altération de l'architecture locale de l'os causée, entre autre, par une fracture ou une prise de poids importante (Turner & Pavalko 1998).
- hormonale, comme dans le cas de l'ostéoporose où une diminution du taux d'œstrogènes entraîne une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes (Pacifci 1998).

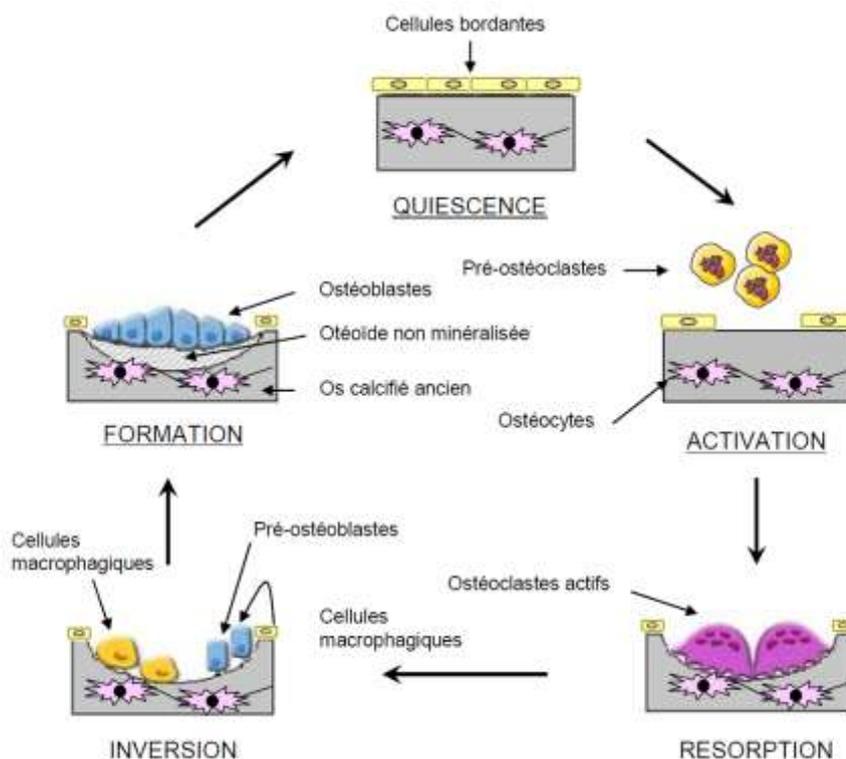


Figure 7 : Les différentes étapes du remodelage osseux (d'après Lerner 2006)

Le remodelage osseux se subdivise en une succession de 4 phases parfaitement définies : activation, résorption, inversion et formation (Figure n°7) (Hill 1998).

Le cycle débute par l'**activation** caractérisée par la rétractation des ostéoblastes (ou cellules bordantes) à la surface du tissu osseux en réponse à des facteurs ostéorésorbants tels que la PTH, la vitamine D<sub>3</sub>, la prostaglandine E<sub>2</sub> laissant place aux ostéoclastes ou aux précurseurs ostéoclastiques mononucléés qui peuvent adhérer à la matrice. Les ostéoblastes environnants vont alors favoriser la différenciation et l'activation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes matures par la production de différentes cytokines, la plus importante étant RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor kappa B ligand) qui va interagir avec son récepteur RANK (Receptor Activator of Nuclear factor kappa B) présent à la surface des pré-ostéoclastes.

Les ostéoclastes différenciés et activés vont alors adhérer à la surface osseuse au niveau de la zone claire constituant une zone de scellement entre l'ostéoclaste et l'os. Cette adhérence assurée par l'interaction entre les protéines de la matrice organique (notamment la vitronectine) et les intégrines présentes sur la membrane ostéoclastique (notamment  $\alpha_2\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$ ), signe le début de la phase de **résorption** et est à l'origine de la polarisation et de la formation de la bordure en brosse. Cette phase s'effectue en deux étapes successives. En effet, l'acidification du compartiment de résorption s'effectue à l'aide d'une pompe à protons qui sécrète des ions H<sup>+</sup>, permettant la dissolution de la phase minérale de la matrice extracellulaire. Cette acidification de la chambre de résorption est suivie par la dégradation de la matrice organique sous l'action d'enzymes protéolytiques lysosomales telles que la phosphatase acide, la cathepsine K, les collagénases.

La phase d'**inversion** suit la phase de résorption, correspondant au moment où la profondeur maximale d'érosion est atteinte. Les ostéoclastes se détachent de la surface osseuse érodée et meurent par apoptose médiée par le système Fas/Fas ligand (Wu et al. 2003). Le décrochement des ostéoclastes fait apparemment intervenir la MMP-9 dans le déplacement des ostéoclastes. Suite à la résorption, il y a une augmentation du taux de calcium dans la lacune qui perturberait la stabilité de l'anneau du filament d'actine rendant la lacune moins hermétique avec pour conséquence une augmentation du pH au niveau de cette lacune. Ainsi la MMP-9, plus active suite à l'augmentation de pH, jouerait un rôle dans le déplacement des ostéoclastes. Ils sont alors remplacés par des macrophages qui lissent le fond de la lacune.

La dernière phase du remodelage osseux est la phase de **formation** d'un nouveau tissu osseux qui se déroule en deux temps, au cours desquels les ostéoblastes jouent un rôle majeur. Dans

un premier temps, ces cellules sont responsables de la production de la matrice extracellulaire, suivie d'une étape de minéralisation de cette matrice. En effet, durant cette phase, les ostéoblastes sont recrutés au fond de la lacune de résorption dans le but de combler cette lacune par la synthèse d'une nouvelle matrice collagénique non minéralisée (substance pré- osseuse ou tissu ostéoïde). La production de cette matrice peut être stimulée par des hormones (oestrogènes, androgènes, vitamine D...) ou par des facteurs de croissance sécrétés par les ostéoblastes (TGF  $\beta$ , IGF, BMP...). A l'inverse, l'IL1 et TNF- $\alpha$  sont capables d'inhiber la production de matrice osseuse par les ostéoblastes.

Une fois la lacune comblée par la nouvelle matrice, la minéralisation débute à la jonction entre le tissu ostéoïde et le tissu minéralisé existant. Les ostéoblastes synthétisent alors la phosphatase alcaline qui est libérée dans de petites vésicules matricielles au niveau de la matrice non minéralisée. Cette enzyme a pour rôle d'initier la minéralisation du tissu ostéoïde par l'hydrolyse des esters phosphoriques inhibiteurs de la minéralisation. De plus, l'ostéocalcine et la vitamine D3 jouent un rôle dans l'augmentation et la fixation du calcium extracellulaire sur le tissu ostéoïde. La carence en vitamine D3 est connue pour augmenter la sécrétion de la PTH responsable de la déminéralisation des os par l'appauvrissement en calcium et en phosphore, notamment observé dans les cas de rachitisme chez l'enfant ou d'ostéomalacie chez l'adulte.

### III. Les implants

En cas de perte dentaire, la pose d'un implant est parfois nécessaire pour garder l'intégrité de la structure osseuse. Ainsi, un implant dentaire permet de consolider l'os mandibulaire ou maxillaire en inhibant la dégradation de l'os causé par l'absence de stimulation mécanique. De même, la prothèse totale de hanche suite à l'usure des cartilages, remplace à la fois l'extrémité supérieure du fémur et le condyle. Cette usure résulte de plusieurs causes dont les principales sont :

- la coxarthrose c'est-à-dire une arthrose de la hanche pouvant être la conséquence de séquelles de fractures articulaires, d'une malformation congénitale telles que la dysplasie, la luxation...
- la polyarthrite rhumatoïde ou autres rhumatismes inflammatoires,
- l'ostéonécrose qui siège le plus souvent sur la tête fémorale.

Lorsque la douleur, l'instabilité et/ou l'impotence s'aggravent et que les traitements médicaux sont sans effet, au point de gêner la station debout, la montée d'escalier ou la marche, la mise en place d'une prothèse de hanche est envisagée.

## 1. La composition chimique des implants

La composition chimique de surface des implants dentaires et orthopédiques dépend des métaux utilisés pour leur confection et des traitements de surface visant à promouvoir leur ostéointégration. Le titane et ses alliages sont appréciés pour leurs excellentes propriétés mécaniques, leur résistance à la biocorrosion et leur ductilité (la ductilité désigne la capacité d'un matériau à se déformer sans se rompre) permettant une bonne absorption des chocs. De plus, un implant métallique est aussi capable de supporter un régime de contraintes mécaniques physiologiques normales pendant plusieurs décennies.

Les implants en titane et alliages présentent une excellente capacité à se fixer à l'os. Cette capacité d'ostéointégration est attribuée à la présence d'une couche d'oxyde de titane qui peut incorporer des ions minéraux présents dans le fluide biologique (Pan 1996). Les implants dentaires et orthopédiques sont généralement fabriqués en titane commercialement pur (TiCp) ou en alliage de titane (Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V). Le titane commercialement pur présente plusieurs grades de pureté allant de 1 à 4. Ce grade est défini par la quantité d'oxygène ainsi que par les taux de carbone et de fer contenus dans le titane. Le grade 4 présente une plus grande dureté comparé aux autres grades et compose la majorité des implants dentaires. Les alliages de titane sont principalement composés de Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V de grade 5 présentant de meilleures propriétés de flexion et de résistance à la fatigue que le TiCp (Steinemann 1998).

La composition chimique des implants influence l'énergie de surface et par conséquent le caractère hydrophile/hydrophobe. Ce caractère, déterminé par la mesure de l'angle de contact, semble jouer un rôle majeur dans les interactions de la surface implantaire avec les fluides biologiques (R Olivares-Navarrete et al. 2008). Les surfaces ayant un faible angle de contact ou une haute énergie de surface augmentent l'absorption protéique, l'adhésion cellulaire, la prolifération et la différenciation ostéoblastique (Faghihi et al. 2007; Zhao et al. 2005). Selon les surfaces implantaires, les angles de contact mesurés varient de 0° (hydrophile) à 140° (hydrophobes) (Buser et al. 2004; Bagno & Di Bello 2004).

Dans une étude *in vivo*, la cicatrisation autour d'implant à surface hydrophile et hydrophobe après 3 semaines d'implantation a été observée (Eriksson et al. 2004). Aucune différence du nombre de cellules n'a été mise en évidence. Par contre, des différences d'expression génique

ont pu être observées. Le caractère hydrophile des surfaces semble agir de manière transitoire et est plus prononcé durant la phase initiale de la cicatrisation. De plus, les surfaces hydrophiles seraient plus trombogéniques que les surfaces hydrophobes (Vogler et al. 1995; Hunt et al. 1997). Enfin, les implants, dont le caractère hydrophile a été photo-induit, augmentent la formation osseuse avec 28 % de contact os/implant après 2 semaines de cicatrisation contre 18 % pour le contrôle (Sawase et al. 2008).

## 2. La rugosité de surface des implants

De nombreuses études montrent que la rugosité de surface affecte le taux d'ostéointégration et la fixation biomécanique des implants dentaires et orthopédiques (Cochran et al. 1998; Wennerberg et al. 1998). Cette rugosité de surface peut être caractérisée à 3 niveaux, en fonction de l'échelle d'observation, à savoir, la macro, la micro et la nanorugosité.

La **macrorugosité** est définie pour les rugosités de l'ordre de 1 à  $10^{-3}$  mm. Cette échelle est en relation directe avec la géométrie de l'implant, présentant des spires usinées et des traitements de surface conduisant à des rugosités de plus de 10  $\mu\text{m}$ . De nombreuses études ont montré que la fixation précoce ainsi que la stabilité mécanique à long terme des prothèses implanto-portées sont améliorées par une surface très rugueuse comparativement à une surface lisse (Buser et al. 1991; Gotfredsen et al. 1995; Wennerberg et al. 1995). Cette rugosité permet un ancrage mécanique entre la surface de l'implant et le tissu osseux apposé à son contact. Toutefois, l'utilisation d'une surface très rugueuse augmente le risque de contamination bactérienne et par conséquent, de péri-implantite ainsi que le relargage ionique (Becker et al. 2000). Une surface modérément rugueuse (1-2  $\mu\text{m}$ ) semble limiter ces 2 effets négatifs (Albrektsson & Wennerberg 2005).

La **microrugosité** implantaire est caractérisée par une rugosité de l'ordre de 1 à 10  $\mu\text{m}$ . Ce type de rugosité favorise les interactions entre le tissu osseux minéralisé et la surface de l'implant (Wennerberg et al. 1995; Wennerberg et al. 1998). Un modèle théorique suggère que la surface idéale devrait être formée de puits hémisphériques de 1,5  $\mu\text{m}$  de profondeur et de 4  $\mu\text{m}$  de diamètre (Hansson & Norton 1999).

La **nanorugosité** des surfaces implantaire, définie pour des rugosités de 1  $\mu\text{m}$  à 1 nm, joue un rôle important au niveau des protéines, de l'adhésion cellulaire et donc de la vitesse de l'ostéointégration (Brett et al. 2004). Cependant, il est difficile d'obtenir des surfaces nanostructurées reproductibles par traitements chimiques. De plus, les caractéristiques topographiques de la surface nanostructurée idéale pour obtenir une adsorption sélective des

protéines, une adhésion cellulaire optimale et une apposition osseuse rapide, ne sont pas connues à ce jour.

Il a été montré que la topographie de surface des implants en titane génère un effet *in vivo* positif sur l'ostéointégration d'où les développements des traitements de surface. Ces différents traitements ont pour objectif d'apporter au titane des propriétés biologiques de surface afin de favoriser l'adsorption de protéines, l'adhésion cellulaire et la repousse osseuse au contact par ostéoconduction. Ses propriétés biologiques sont très fortement influencées par la composition chimique, la mouillabilité, la charge électrique et la rugosité des implants.

### 3. Les traitements de surface des implants

Au niveau de la surface implantaire, la composition chimique et la rugosité jouent un rôle important au niveau de la cascade d'événements biologiques qui suit l'implantation. Toutefois, les surfaces implantaires ont été souvent développées de façon empirique en utilisant des tests *in vitro* et *in vivo*. La plupart des surfaces actuellement disponibles présentent une topographie aléatoire avec des rugosités variant de quelques nanomètres à quelques millimètres.

Les traitements de surfaces sont divers : projection plasma d'une poudre de titane (titanium-plasma spraying), sablage à l'aide de particules d'oxyde de titane ou de céramiques (grit-blasting), mordantage acide (acide etching) ou revêtements de phosphate de calcium. Cependant, tous ces traitements de surface présentent différents avantages et inconvénients dont la non-reproductibilité des structures rendant leurs études complexes.

Le procédé utilisant la projection plasma d'une poudre de titane a été utilisé afin d'obtenir des surfaces implantaires rugueuses. Ce procédé consiste en l'injection de poudre de titane dans une torche à plasma à très haute température. Les particules de titane sont projetées contre la surface de l'implant où elles se condensent et fusionnent formant un film de 30 µm d'épaisseur. Le revêtement obtenu présente une rugosité moyenne d'environ 15 µm augmentant ainsi la superficie de l'implant. Cette structure tridimensionnelle augmente la capacité de résistance à l'arrachement au niveau de l'interface os-implant (Buser et al. 1991).

Une autre technique consiste à projeter des particules de céramiques dures à la surface de l'implant en utilisant de l'air comprimé. En fonction de la taille des particules de céramiques, différentes rugosités peuvent être obtenues à la surface de l'implant. Le matériau utilisé pour le sablage doit être chimiquement stable, biocompatible et ne doit pas perturber l'ostéointégration de l'implant en titane. Plusieurs types de céramiques ont été utilisés tels que

l'alumine ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), l'oxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) et les phosphates de calcium (CaP) (Müeller et al. 2003a; Novaes et al. 2002; Wennerberg et al. 1995).

Le mordantage des surfaces implantaire par des acides forts tels que l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) ou l'acide fluorhydrique (HF), est un autre procédé permettant d'obtenir des surfaces rugueuses. Le mordantage acide produit à la surface des implants des micro-puits dont le diamètre varie de 0,5 à 2  $\mu\text{m}$  (Massaro et al. 2002; Zinger et al. 2005). Cette technique permet d'augmenter fortement l'ostéointégration en évitant les contaminations de surface notamment par des particules de sablages (Wang et al. 2005).

Une autre technique pour augmenter l'ostéointégration des implants consiste à recouvrir la surface de phosphate de calcium (CaP) tels que l'hydroxyapatite (HA). Après implantation, la dissolution du revêtement augmente la concentration en ions phosphore et calcium des fluides biologiques dans l'environnement péri-implantaire et conduit à la précipitation d'une apatite biologique à la surface de l'implant (Daculsi et al. 2003; Davies 2003). Ce revêtement d'apatite biologique contient des protéines endogènes et sert de support à l'adhésion et la prolifération de cellules ostéogéniques (Davies 2003). La projection plasma et la déposition biomimétique ou électrophorétique sont utilisées pour obtenir ce revêtement. Il a été montré que l'ostéointégration des implants en titane est accélérée avec un revêtement de CaP comparé aux implants dépourvu de ce revêtement (Morris et al. 2000; Barrère et al. 2003). Un des principaux problèmes de ces revêtements concerne leur détachement de la surface implantaire en titane causé par des différences de phases de solubilité. Il en résulte un échec à l'interface implant-revêtement, bien que le revêtement soit toujours adhérent au tissu osseux (Wheeler 1996; Tinsley et al. 2001; Y L Chang et al. 1999).

Ces différentes techniques de traitements de surface métalliques permettent d'obtenir une rugosité au niveau micrométrique favorisant ainsi l'ancrage mécanique et la fixation initiale au tissu osseux. Les surfaces nanostructurées favorisent, pour leur part, l'adsorption des protéines, l'adhésion des cellules ostéoblastiques et la vitesse de cicatrisation osseuse dans les régions péri-implantaires. Le rôle biologique exact des propriétés de surface est actuellement mal connu, les topographies répétitives et bien définie au niveau nanométrique n'étant pas maîtrisées. Cependant, de telles surfaces standardisées pourraient permettre d'appréhender les interactions cellules/surfaces et tissus/surfaces

## IV. Modification de la rugosité au niveau nanométrique

Plusieurs méthodes ont été développées pour améliorer l'ostéointégration des implants dentaires et orthopédiques à court et long terme. Ces techniques induisent, principalement, des modifications de la rugosité de surface au niveau nanométrique afin d'améliorer l'adsorption des protéines, l'adhésion et la différenciation cellulaire au niveau des surfaces implantaires. La plupart des méthodes utilisées font appel à des techniques issues de l'électronique telles que la lithographie et le 'piquage' de surface au laser.

Des études expérimentales *in vitro* (Anselme et al. 2002; Bigerelle & Anselme 2005; Zhu et al. 2004) ont montré que l'attachement des cellules ostéoblastiques était amélioré sur des surfaces au niveau nanométrique comparativement à des surfaces lisses. Des filipodes entrent dans les pores nanométriques et permettent l'attachement initial des cellules. Plusieurs techniques sont généralement utilisées pour la préparation de surfaces nanostructurées mais la plupart de ces méthodes sont difficilement applicables à des implants métalliques.

### 1. Les traitements chimiques

La photolithographie est l'une de ces techniques qui peut permettre de comprendre le comportement cellulaire en utilisant des topographies et des rugosités bien définies et reproductibles sur des polymères. Cette technique commence par l'application d'une photorésine sur la surface sous forme d'un film fin. Elle est ensuite exposée à une radiation lumineuse. Lors de cette étape, l'utilisation d'un masque, formé de zones opaques et transparentes, permet de définir le motif souhaité sur la surface. Cette technique est couramment utilisée pour la modification des surfaces et l'étude des interactions avec les cellules (Bhatia et al. 1997). Cependant, la résolution de la photolithographie est, en général, limitée à quelques centaines de nanomètres (~ 600 nm). La nanogravure par lithographie peut être réalisée après dépôt d'un film de titane afin d'obtenir une topographie comprise entre 100 et 200 nm (Covas et al. 2008).

Une autre approche est d'utiliser la technique de gravures chimiques avec des acides forts tels que HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub> et HF ainsi que par des traitements alcalins (Lee et al. 2009). Ces traitements chimiques produisent des surfaces nanostructurées sur des métaux mais sans contrôle de la géométrie de la surface.

## 2. Les traitements physiques

L'évaporation en phase gazeuse (electron beam evaporation) permet de déposer une fine couche de métal sur les surfaces obtenues par photolithographie. Puckett et al (Puckett et al. 2008) ont montré que les nanophases métalliques alignées augmentent les fonctions précoces de l'ostéoblaste (morphologie et adhésion). Durant l'évaporation, la nature de la phase gazeuse permet le greffage de groupements chimiques tels que  $-CH=CH_2$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ , ce qui va entraîner une modification des propriétés de surface, notamment la charge électrique (Cai et al. 2006).

Le traitement par radio-fréquence, ou glow-discharge plasma, permet également de modifier la chimie des surfaces des implants en titane mais aussi d'améliorer l'énergie de surface (Le Guehennec, h et al. 2008; Yo Shibata et al. 2002). Les traitements plasma dans différentes atmosphères gazeuses sont couramment utilisés pour nettoyer, activer ou stériliser des implants. Ainsi, le traitement plasma à faible pression est efficace pour augmenter la mouillabilité des surfaces de titane (Yo Shibata et al. 2002). En changeant la nature du gaz, différents groupements chimiques peuvent être greffés sur la surface permettant ainsi de faire varier les propriétés de surface. Cette technique est couramment utilisée pour améliorer l'adhésion et la différenciation des ostéoblastes sur des surfaces en titane (Yo Shibata et al. 2002; Swart et al. 1992). Néanmoins, cette technique est limitée par le greffage aléatoire des groupements chimiques dû à la non spécificité du traitement.

## 3. L'anodisation

La technique la plus prometteuse pour obtenir des surfaces nanostructurées sur des implants en titane est l'anodisation. Cette technique consiste à faire croître une couche d'oxyde de titane poreuse en utilisant une contre-électrode en platine dans une solution acide à un potentiel de 5 à 25 V. En modifiant les conditions expérimentales, notamment le courant dans l'électrolyte et le temps, plusieurs chercheurs ont produit une couche d'oxyde de titane de quelques micromètres d'épaisseurs et composée de pores disposés en « nid d'abeille », dont le diamètre varie entre 30 et 100 nm , perpendiculaires à la surface de titane (S. Oh et al. 2009).

L'anodisation présente l'avantage de pouvoir faire croître rapidement une couche de dioxyde de titane poreuse, avec une taille de pores facilement contrôlable, une bonne uniformité et une épaisseur de couche inférieure au micron limitant ainsi l'exfoliation. Il a été prouvé que l'anodisation favorisait la formation d'apatite (Suh et al. 2003; Rohanizadeh et al. 2004) et

l'adhésion cellulaire (S. Oh et al. 2009). Ceci serait dû à la taille des structures formées qui sont de l'ordre de la centaine de nanomètres, correspondant à la taille des cristaux d'hydroxyapatite présents dans la matrice de collagène qui entraînent la formation d'os (Oh et al. 2005). L'anodisation est une technique connue depuis un siècle et largement utilisée sur l'aluminium afin de protéger sa surface de la corrosion. Elle concerne d'autres métaux tels le titane, le tantale, le niobium, le vanadium, l'hafnium et le tungstène.

En fonction de l'électrolyte choisi et des conditions d'anodisation (potentiel électrique appliqué, température, agitation...), la couche formée pourra être compacte ou poreuse. Nous cherchons ici à obtenir des couches poreuses. L'anodisation en milieu chromique ou en présence d'acide fluorhydrique est connue pour aboutir à des structures poreuses nanotubulaires que nous souhaitons obtenir dans notre cas (Darque-Ceretti et al. 2000).

Lors du processus d'anodisation, les réactions chimiques suivantes interviennent :

- à l'interface métal/oxyde :  $Ti = Ti^{2+} + 2e^-$
- à l'interface oxyde/électrolyte :  $2H_2O = O_2 + 4H^+ + 4e^-$  et  $2H_2O = 2O^{2-} + 4H^+$
- soit aux deux interfaces :  $Ti + 2O^{2-} = TiO_2 + 2e^-$

Deux modes d'anodisation sont possibles :

- le mode galvanostatique (densité de courant constante) où le potentiel et l'épaisseur de la couche augmente linéairement en fonction du temps,
- le mode potentiostatique (potentiel constant) que nous utiliserons dans ce travail. Dans ce mode, la densité de courant initiale est très élevée puis diminue rapidement jusqu'à atteindre une valeur seuil proche de 0.

En utilisant des acides forts dans des solutions d'électrolyte, la couche d'oxyde se dissout le long des lignes de convection du courant et s'épaissit dans les autres régions. Cette dissolution locale et cette croissance simultanée de la couche d'oxyde crée des nanotubes à la surface du titane (Sul 2002b; Sul 2002a; Y. Huang et al. 2005; Xiropaidis et al. 2005). Ces nanopores ont une taille proche de celle des protéines impliquées dans l'adhésion telle que la fibronectine ou la vitronectine et des prolongements cytoplasmiques, favorisant ainsi l'adhésion cellulaire. De récentes études ont montré que l'adhésion ainsi que la différenciation cellulaire sont modifiées par la taille de la topographie au niveau nanométrique (Le Guehenec, h et al. 2008). Comparées aux surfaces usinées, les surfaces anodisées améliorent la réponse osseuse. De plus, des résultats positifs aux tests biomécaniques et histomorphométriques ont été obtenus (Rocci et al. 2003; Sul 2002b). Ainsi, pour une morphologie implantaire identique, un plus fort taux de succès clinique est observé pour les implants présentant des surfaces anodisées comparativement aux implants usinés (Jungner et al. 2005).

Deux mécanismes peuvent expliquer cette ostéointégration, soit un ancrage mécanique pour la croissance osseuse dans les pores de la surface implantaire, soit une meilleure réponse biologique (Sul et al. 2005; Schüpbach et al. 2005). Certains éléments chimiques provenant des électrolytes peuvent être incorporés dans la couche poreuse d'oxyde modifiant ainsi les propriétés de surface (Kurze et al. 1986; Bangshang Zhu et al. 2004). Kim et al (Kim et al. 2010) ont montré que l'angle de contact et le module élastique sont significativement réduits sur les surfaces nanotubulaires, comparés à ceux avant anodisation. Une incorporation d'ion calcium, sulfure ou phosphores peut-être observée en fonction de la nature de l'électrolyte utilisé. L'incorporation d'ion magnésium dans la couche d'oxyde de titane donne une plus grande résistance à l'arrachement pour les implants insérés dans l'os mandibulaire (Sul et al. 2005).

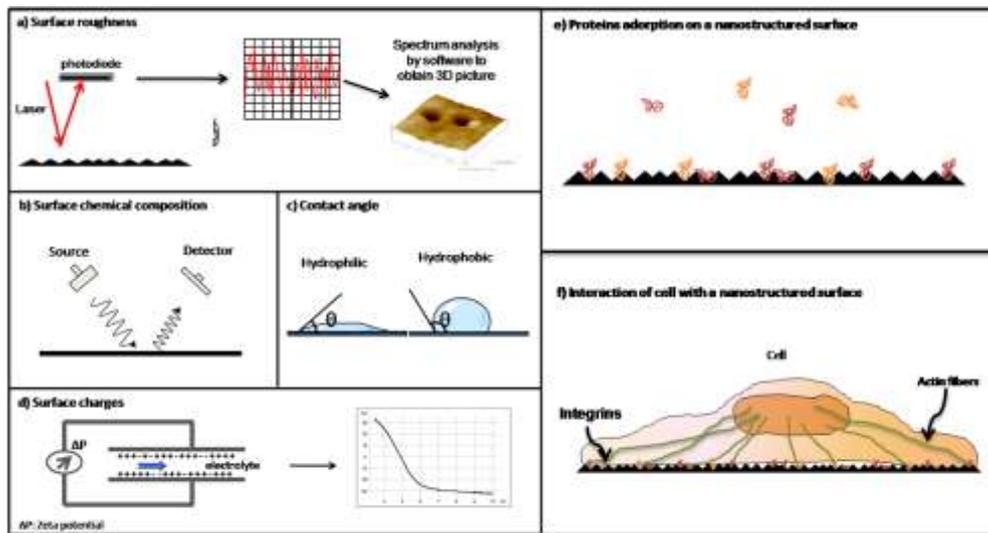
Cette technique d'anodisation est dépendante de nombreux paramètres tels que l'intensité du courant ou la concentration de l'électrolyte. Cependant, les nanopores obtenus dans la couche d'oxyde présentent un diamètre, une profondeur et une distribution bien définie et reproductible permettant une étude précise des interactions protéiques, cellulaires et tissulaires avec ces surfaces. Mais, la surface optimale au niveau nanométrique n'est pas encore connue pour obtenir l'intégration tissulaire désirée.

## V. Caractérisation des nanostructures

Les propriétés de surface telles que la rugosité, la composition chimique, la mouillabilité et la charge de surface ont une profonde influence sur le comportement cellulaire (Puckett et al. 2008). Il est par conséquent important de caractériser les surfaces à un niveau nanométrique (Figure n°8).

La microscopie à force atomique (AFM, (Covani et al. 2007)) et la profilométrie (Anselme & Bigerelle 2006) sont couramment utilisées pour mesurer la rugosité de surface au niveau micro et nanométrique et pour obtenir des informations sur la topographie. Le Guehennec et al ont caractérisé des surfaces polies et nanostructurées en utilisant l'AFM, mesurant des rugosités moyennes de 1,4 et 6,2 nm respectivement (Le Guehennec 2008). Il est couramment admis que la topographie comme la rugosité modifie l'adhésion cellulaire et, indirectement, le phénotype cellulaire. Les surfaces dites « lisses » sont ainsi plus favorables à l'adhésion et la prolifération des cellules fibroblastiques et épithéliales (Eisenbarth et al. 1996) alors que les cellules ostéoblastiques adhèrent et prolifèrent mieux sur des surfaces rugueuses que sur des

surfaces lisses. De plus, leur différenciation est plus rapide sur des surfaces sablées ou mordancées (Citeau et al. 2005).



**Figure 8 : Analyse physicochimique et topographique de surface des implants, l'adsorption de protéines et interaction avec la cellule. A) rugosité mesurée au niveau nanométrique par AFM, b) analyse de la composition chimique par XPS ou EDX, c) énergie de surface déterminée par la mesure de l'angle de contact, d) charges de surface mesurées par zétamétrie, e) adsorption de protéines sur une surface nanostructurée et f) adhésion d'une cellule sur une surface nanostructurée via des intégrines interagissant avec les protéines adsorbées. Le cytosquelette est lié au noyau (Lavenus et al. 2010).**

L'analyse dispersive en énergie (EDX, energy dispersive X-ray spectrometry) et la spectroscopie à photoélectron rayon X (XPS) sont fréquemment utilisées pour étudier la composition chimique des surfaces. Par exemple, Lee et al ont étudiés l'attachement et la prolifération des cellules ostéoblastiques sur des surfaces en  $Ti_6Al_4V$ , un alliage de titane, après différents traitements de surface (Lee et al. 2004). Ils ont mis en évidence des modifications de la composition chimique de la couche d'oxyde par EDX et XPS avec la présence de groupements OH. Ces modifications chimiques entraînent des variations de la mouillabilité des surfaces. Or, ce paramètre semble jouer un rôle majeur dans les interactions des implants avec les cellules (R Olivares-Navarrete et al. 2008). L'angle de contact est donné par la mesure de l'angle entre une goutte de liquide (de l'eau généralement) et la surface. Plus l'angle sera faible, plus la surface sera hydrophile et inversement.

Les surfaces ayant un faible angle de contact ou une grande énergie de surface qui modifient l'adsorption protéique, l'adhésion cellulaire, la prolifération et la différenciation ostéoblastique (Faghihi et al. 2007; Zhao et al. 2005). De même, le potentiel zêta, renseignant

sur les charges de surface, a une grande importance dans les interactions surfaces/protéines et surfaces/cellules. Par exemple, les charges positives de surface vont interagir plus spécifiquement avec les protéines chargées négativement à pH physiologique et inversement (Cai et al. 2006).

## **VI. L'adsorption protéique**

Des études ont montré que l'adsorption de protéines sur une surface est liée aux propriétés de cette dernière (Elwing 1998). Immédiatement après l'implantation, l'implant est en contact avec une diversité de molécules présentes dans le sang. Les interactions qui vont en découler, vont dépendre autant des propriétés de surface que des molécules. La nature, la conformation et l'orientation des protéines sur la surface vont avoir des conséquences directes sur le recrutement, l'attachement, la prolifération et la différenciation cellulaire via, notamment, la disponibilité des sites de liaisons avec les intégrines : les séquences RGD (Arginine-glycine-acide aspartique). Comme les cellules peuvent permettre le développement de tissu autour de l'implant, les propriétés de surface qui contrôlent l'adsorption protéique, sont d'une grande importance dans la cascade de réponses biologiques post-implantation. La cicatrisation des tissus péri-implantaires est un phénomène complexe qui implique quantités de types cellulaires, de cytokines, de facteurs de croissance et de protéines de la matrice extracellulaire. Par exemple, le recrutement cellulaire est déterminé par la présence de facteurs chimiotactiques appropriés qui vont attirer les CSM circulantes impliquées dans la cicatrisation tissulaire. Des protéines impliquées dans l'adhésion telles que la fibronectine ou la vitronectine doivent être présentes sur la surface implantaire afin de permettre l'adhésion de ces cellules alors que des facteurs de croissance et des cytokines sécrétées dans le milieu environnant vont permettre la prolifération et la différenciation des CSM.

Ainsi les matériaux composant les implants peuvent induire une multiplicité de réponses cellulaires aboutissant à la cicatrisation tissulaire (Boyan et al. 1996). Des études ont prouvé que l'adsorption protéique est liée aux propriétés de surface (Sigal et al. 1998) notamment la mouillabilité et le potentiel zêta qui jouent un rôle important dans les interactions protéines/surfaces. En effet, les charges de surface, le caractère hydrophile/hydrophobe des surfaces, les fonctions chimiques, la rugosité ainsi que la distribution de tous ces paramètres en surface influencent l'adsorption protéique. Ces propriétés influencent la nature, la quantité,

la densité et l'orientation des protéines en modifiant le caractère attraction/répulsion de la surface lié à la chimie et la topographie (Roach et al. 2007; Woo et al. 2003)

Le titane est un matériau dont la surface est hydrophobe (Cai et al. 2006) avec un angle de contact avoisinant 80° et une charge de surface négative dont le potentiel zêta est de -8 mV à pH physiologique. Une majorité des protéines du sang est négative à pH physiologique.

## 1. Les protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire

De nombreuses protéines contenues dans le sang interviennent dans l'adhésion cellulaire. Dans ce paragraphe, nous allons décrire les plus importantes dans les interactions cellule/surface.

La **fibronectine** (FN) est un maillon-clés de l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. La fibronectine est un dimère de grande taille en forme de V de 100 nm de long et de 460 kDa. Les deux monomères sont reliés par deux ponts disulfures à leur extrémité C-terminale. La molécule est composée des domaines rigides reliés par des parties flexibles. Les domaines rigides représentent les sites d'interaction avec les autres composantes de la matrice extracellulaire (collagène, protéoglycanes...). La fibronectine peut également lier les intégrines par deux séquences RGD. La fibronectine peut donc simultanément se lier à la cellule et à d'autres molécules de la matrice extracellulaire, y compris à une autre molécule de FN. Les molécules de fibronectine s'assemblent pour former des fibrilles à la surface de nombreuses cellules. Les récepteurs membranaires de la fibronectine, dont les intégrines, jouent pour la cellule qui les porte le rôle de transducteur mécano-chimique. La liaison à la fibronectine est suivie d'une phosphorylation des protéines du cytosquelette avec modification de leur organisation. La fibronectine a un point isoélectrique entre 4,9 et 6,3 à pH 7,4, ce qui le rend négative à pH physiologique.

La **vitronectine** (VN) est une molécule constituée par l'association d'un sucre et d'une protéine (glycoprotéine) contenue dans le plasma et dans le tissu conjonctif proche de la fibronectine et ayant les mêmes propriétés que celle-ci.

Les **laminines** (Lama) sont une famille de protéines, plus précisément de glycoprotéines, qui forment le constituant majeur de la lame basale, en dehors du collagène. Les différents membres de la famille peuvent s'associer entre eux pour former des complexes comportant trois membres (trimères). Les molécules de laminines sont secrétées par les cellules épithéliales (1 chaîne) et par les cellules conjonctives (2 chaînes) du chorion sous-jacent à la basale. Elles s'assemblent en un réseau de mailles fines dans la matrice extracellulaire. Le

réseau extracellulaire ainsi formé contient du collagène de type IV auquel les laminines s'associent. Les laminines servent, avec notamment l'entactine, la fibronectine et les protéines fibrillaires, de substrat pour la migration cellulaire.

Le **collagène** est une famille de protéines fibreuses constituant les tissus conjonctifs dans le règne animal. Ces protéines ont pour fonction de conférer aux tissus une résistance mécanique à l'étirement. Il s'agit de la protéine la plus abondante dans un organisme humain, représentant le quart de la masse protéique. Il est secrété par les cellules des tissus conjonctifs et a un poids moléculaire de 300 kDa. Contrairement à l'élastine présente aussi dans les tissus conjonctifs, le collagène est inextensible et résiste bien à la traction. Il existe différents types de collagène selon l'organe considéré. Il est notamment indispensable aux processus de cicatrisation.

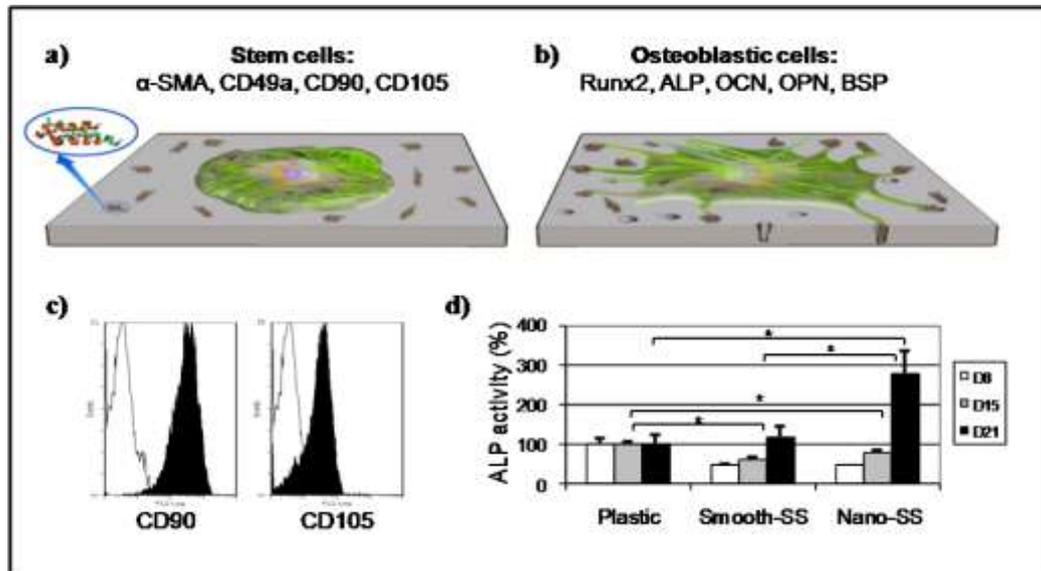
## 2. L'adsorption des protéines sur les surfaces implantaires

Les interactions cellulaires avec les implants sont, tout d'abord, liées aux protéines adsorbées, via une série complexe d'adsorptions et de « déplacements » connus sous le nom d'effet Vroman (Miller et al. 2006). En bref, les protéines ayant une haute mobilité vont arriver les premières sur les surfaces puis elles vont être remplacées par des protéines moins mobiles ayant une forte affinité pour la surface. Par exemple, quand la fibrine adhère à un biopolymère, elle va être remplacée par d'autres protéines ayant une affinité plus importante pour le biopolymère.

Les différences de mouillabilité ou hydrophilicité (faible angle de contact) résultent des modifications dans l'adsorption protéique des implants (Webster et al. 2000). Le titane fonctionnalisé avec des groupements  $\text{NH}_2$  (Ti- $\text{NH}_2$ ) a un angle de contact similaire au titane non fonctionnalisé ( $70^\circ$  au lieu de  $80^\circ$ ) mais l'adsorption protéique est meilleure (Cai et al. 2006). Dans cette étude, le potentiel zêta est de 0 mV pour le Ti- $\text{NH}_2$  comparé à -8 mV pour le titane. D'un autre côté, du titane fonctionnalisé avec des groupements  $\text{COOH}$  (Ti- $\text{COOH}$ ) montre un potentiel zêta et une adsorption protéique similaire au titane mais un angle de contact différent ( $80^\circ$  pour Ti et  $50^\circ$  pour le Ti- $\text{COOH}$ ). Ils ont ainsi démontré que l'adsorption protéique dépend plus du potentiel zêta que de l'angle de contact.

La fibronectine est moins résistante au déplacement que les autres protéines du sérum ou secrétées par les cellules durant la phase initiale d'adhésion et les phases tardives d'étalement et de prolifération (Sousa et al. 2005). L'orientation et la distribution de la fibronectine sur les surfaces nanostructurées ont été proposées comme pouvant contrôler non seulement l'adhésion cellulaire mais aussi la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en

ostéoblastes (Andersson et al. 2003). L'hypothèse de ce travail était que la localisation spatiale de la fibronectine sur les surfaces peut permettre l'élongation des cellules à travers les points focaux, la tension du cytosquelette via les fibres d'actine qui vont entraîner l'expression de gènes ostéoblastiques.



**Figure 9 : Influence de la surface sur la morphologie cellulaire et la différenciation a) adsorption de protéines et adhésion d'une cellule souche mésenchymateuse (CSM) sur une surface lisse b) adsorption spécifique de protéines sur une surface nanostructurée et différenciation ostéoblastique, c) analyse FACS des marqueurs CD90 et CD105, spécifique des CSM et d) activité phosphatase alcaline (ALP) d'ostéoblastes cultivés sur des surfaces lisses et nanostructurées après 8, 15 et 21 jours de culture en comparaison au plastique de culture. Pour l'analyse FACS, l'isotype contrôle est en blanc et les MSC cultivées sur la surface lisse en noir. Pour le test ALP, chaque expérience a été réalisée deux fois (n=8) pour chaque groupe. (Lavenus et al. 2010)**

La figure n°9 illustre cette hypothèse. Les protéines, telles que la fibronectine et la vitronectine, s'adsorbent sur les surfaces lisses avec une distribution aléatoire et une orientation qui seront influencées par la chimie de surface et la mouillabilité de la surface. D'un autre côté, les protéines pourraient spécifiquement interagir avec les nanopores et dévoiler leur séquence RGD. Ces différences d'adsorptions protéiques vont ainsi, diriger la différenciation cellulaire.

Le comportement des ostéoblastes sur des surfaces en titane a également été étudié (Schneider & Burrige 1994). Cette étude a montré que l'adhésion et la prolifération cellulaire sont meilleures en présence de sérum, permettant ainsi la formation rapide de points focaux. Une autre équipe a corroboré ces résultats en utilisant des ostéoblastes, des fibroblastes et des

cellules endothéliales ensemencées sur des céramiques en nanophase (aluminium, titane et hydroxyapatite) (Webster et al. 2000). Ils ont montré que les nanophases ont la capacité d'adsorber sélectivement la vitronectine, médiateur de l'adhésion cellulaire.

De plus, la nature et la quantité de protéines adsorbées sur l'implant, ainsi que l'orientation de ces molécules ont une grande importance pour l'adhésion cellulaire sur les surfaces. Par exemple, des différences de conformations de la fibronectine ou de la vitronectine sur la surface peuvent affecter l'accessibilité de la séquence RGD, domaine nécessaire à la liaison avec la cellule (Costa e Silva Filho & Menezes 2004)

En conclusion, comprendre l'effet des propriétés de surface et des nanostructures sur l'adsorption protéique reste un défi pour la recherche actuelle et constitue une approche potentielle pour le développement des surfaces implantaires afin d'obtenir une meilleure interaction cellulaire et par conséquent, une meilleure intégration tissulaire (Lord et al. 2010).

## **VII. L'adhésion et la prolifération cellulaire**

L'attachement, l'adhésion et l'étalement constituent les premières phases des interactions cellules/matériaux et la qualité de ces premières phases vont influencer la capacité des cellules à proliférer et à se différencier au contact des matériaux.

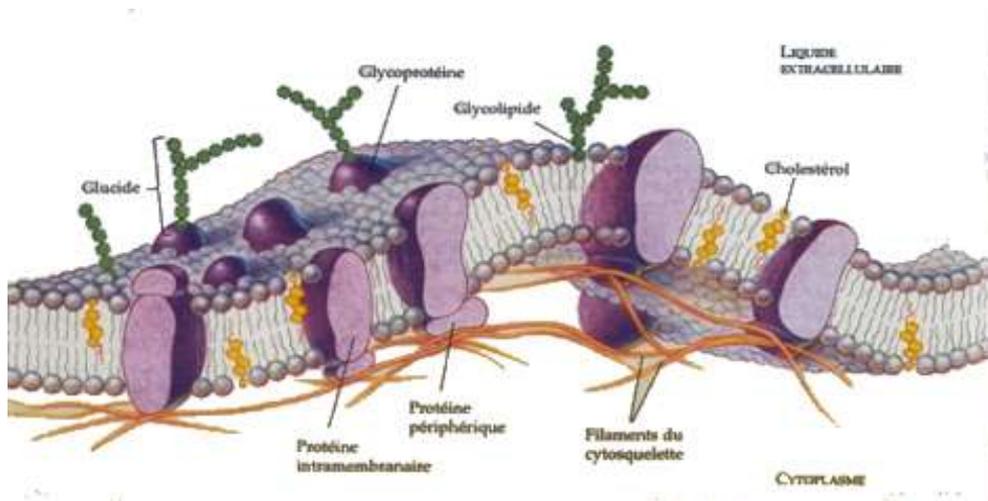
### **1. L'adhésion cellulaire**

L'adhésion cellulaire ou adhérence cellulaire correspond à l'ensemble des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en œuvre pour faire adhérer les cellules entre elles ou avec le milieu qui les entoure. L'adhésion cellulaire est indispensable à la formation, au maintien et au fonctionnement des tissus. Elle fait intervenir des interactions à la fois stables et modulables, soumises à une dynamique spatiale et temporelle, qui permettent le contact des cellules entre elles (interactions cellule-cellule) et des cellules avec les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) (interactions cellule-MEC). Ces interactions génèrent tout un ensemble de signaux essentiels à de multiples fonctions cellulaires comme la migration, la prolifération, la différenciation, et la mort programmée des cellules (apoptose). Dans des conditions pathologiques, la fonction d'adhésion est fréquemment compromise et provoque un désordre tissulaire, une migration cellulaire aberrante (dissémination des cellules cancéreuses) et une dérégulation des voies de signalisation. C'est pourquoi un contrôle strict et une régulation fine

de l'adhésion cellulaire sont indispensables à l'homéostasie cellulaire et tissulaire. L'adhésion cellulaire s'articule autour de quatre grands groupes de complexes protéiques interconnectés, de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule :

- Les protéines de la matrice extracellulaire (MEC),
- Les récepteurs d'adhésion cellulaire,
- Les protéines intracytoplasmiques impliquées dans un large répertoire de voies de signalisations intracellulaires,
- Les protéines constituant le cytosquelette.

La membrane plasmique d'une cellule est formée d'une bicouche composée de deux feuillets, dont les proportions en phosphoglycérides, sphingolipides et de cholestérol sont différentes (Figure n°10). À cette bicouche sont associés des protéines ou complexes protéiques transmembranaires, et notamment les molécules adhésives. Ces molécules ont la possibilité de diffuser dans le plan de la membrane, soit de manière passive (diffusion brownienne) soit active (par l'intervention de mouvements du cytosquelette et consommation d'ATP). La surface externe de la bicouche est recouverte d'une couche diffuse fortement chargée négativement, appelée matrice péricellulaire ou glycocalyx, dont l'effet est essentiellement anti-adhésif (Ardman et al. 1992; Chan & Springer 1992; K. D. Patel et al. 1995; Sabri et al. 1995).



**Figure 10 : Représentation schématique de la membrane plasmique d'une cellule montrant la bicouche, les filaments du cytosquelette, les protéines intégrales et les molécules glycosylées du glycocalyx.**

L'adhésion entre deux cellules ou entre une cellule et son environnement, nécessite l'approche des surfaces biologiques à une distance compatible avec la création de liaisons

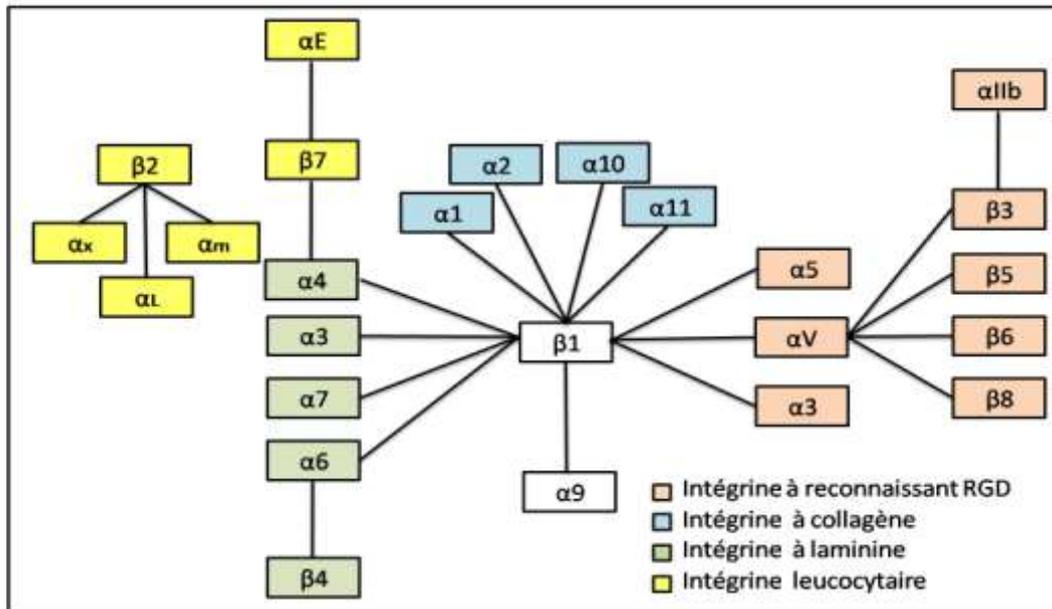
entre molécules adhésives. La membrane plasmique est soutenue par un ensemble organisé de structures de polymères – le cytosquelette – qui confère à la cellule l'essentiel de ses propriétés mécaniques. Le cytosquelette est composé d'un réseau de fibres – filaments d'actine, filaments intermédiaires et microtubules – créés dynamiquement par polymérisation/dépolymérisation continue. En réponse à la formation de liens spécifiques, les membranes cellulaires ont la capacité de se déformer de manière à créer une aire de contact qui peut atteindre une surface de quelques microns carrés (Pierres et al. 2003). Simultanément à la réorganisation membranaire, l'adhésion provoque une concentration ponctuelle de certains récepteurs (points focaux) dans les régions de contact (André et al. 1990). Cette concentration est produite par une diffusion active des protéines et s'accompagne d'une orientation des microfilaments d'actine qui augmentent la rigidité membranaire locale de manière à renforcer l'attachement.

## 2. Les intégrines et les voies de signalisation

Les intégrines sont des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire. Quand la cellule adhère à une protéine de la matrice extracellulaire, elle s'étale et développe des zones de contact très localisées visibles par immunofluorescence, appelé points focaux. Ces zones de contact contiennent un assemblage d'intégrines qui se rapprochent et se regroupent en amas (phénomène de clusterisation). Les intégrines sont liées aux protéines du cytosquelette (vinculine, ...), elles-mêmes reliées aux microfilaments d'actine.

Pendant l'adhésion cellulaire, différentes intégrines sont exprimées et transfèrent les informations de la surface au noyau via le cytosquelette d'actine modifiant l'expression génique. Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion cellulaire, c'est-à-dire des protéines transmembranaires dont l'une des extrémités interagit avec les matières situées à l'extérieur de la cellule, l'autre extrémité interagissant avec des constituants intracellulaires. Les intégrines sont constituées d'une sous-unité alpha ( $\alpha$ ) et d'une sous-unité bêta ( $\beta$ ) (figure n°11). L'analyse du génome humain a permis de découvrir 24 sous-unités  $\alpha$  et 9 sous-unités  $\beta$  pouvant s'associer en 24 hétérodimères distincts (Danen & Yamada 2001; Plow et al. 2000). De par leur spécificité pour leur ligand, les intégrines peuvent être classées en différents groupes : les intégrines à laminine, les intégrines à collagènes, les intégrines leucocytaires et les intégrines reconnaissant des motifs RGD (Y. Takada et al. 2007).

Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  sont constituées d'un large domaine extracellulaire (700-1100 aa) et d'une courte partie cytoplasmique (30-50 aa) (M J Humphries 2000), cependant aucune homologie n'a été détectée entre elles. Bien que la structure des 2 sous-unités soit différente, la complémentarité des domaines extracellulaire permet la spécificité du ligand.



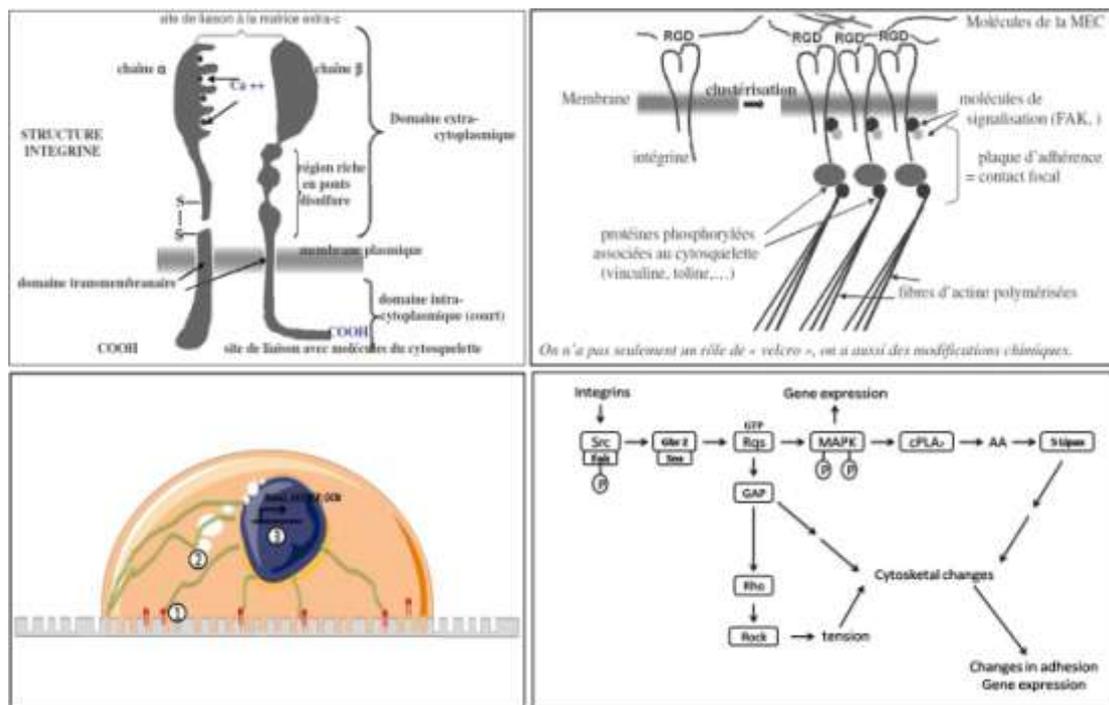
**Figure 11: Formation des différents hétérodimères d'intégrines et leurs ligands. D'après Ruoslahti et al, 1994 et de Haynes, 2002.**

Les sous-unités  $\alpha$  contiennent une série de 3 à 4 séquences répétitives fixant des cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) impliqués dans la formation du complexe ternaire intégrines-ligands (Newham & M J Humphries 1996). Les sites d'interactions intégrines-ligands sont constitués d'une courte séquence d'acides aminés. Le motif le plus répandu, le peptide RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique), est impliqué dans les interactions avec plusieurs composants de la MEC tels que la fibronectine, la vitronectine et le fibrinogène. La différence de spécificité implique que la séquence RGD n'est pas suffisante pour la liaison intégrine-ligand. L'environnement et la conformation sont également très important pour la présentation de ce peptide (Ruggiero et al. 1994; Ruggiero et al. 1996). D'autres séquences spécifiques ont été mises en évidence telles que KQAGDV, EILDV, LDV, KRLDGS et DGDEA (Ruoslahti 1996). Par exemple, l'intégrine  $\alpha4\beta1$  identifie la séquence EILDV (dans VCAM-1 et dans la fibronectine) alors que l'intégrine  $\alpha5\beta1$  se fixe à la séquence RGD présente dans de nombreuses protéines de la matrice.

Les intégrines peuvent adopter différentes conformations modifiant leur affinité pour le ligand et leur état d'activation. On décrit principalement 2 conformations des intégrines : la forme inactive, repliée où les sous-unités sont courbées et pour laquelle le site de liaison présente peu d'activité et la conformation active, étendue avec des sous-unités linéaire et un site de liaison ayant beaucoup d'affinité avec son ligand. Le passage d'une conformation à l'autre nécessite de rompre l'interaction entre la tête de l'intégrine et sa queue, la tête passant alors d'une position proche de la membrane à une position rendant possible l'interaction avec son ligand (Calderwood 2004; Shattil et al. 2010; Takagi 2004).

Les intégrines constituent une machinerie bidirectionnelle et allostérique de signalisation cellulaire. La régulation de l'affinité de l'intégrine pour son ligand est régulée par un signal « inside-out » qui met en jeu des partenaires cytoplasmiques, ces protéines induisent des changements de conformations qui modifient l'affinité du site de liaison de l'intégrine (Dedhar & Hannigan 1996; Jones & Walker 1999). Ainsi la taline interagit avec la queue de la sous-unité  $\beta$  et induit une restructuration des domaines transmembranaires qui permet l'activation des intégrines. Les interactions entre la cellule et la MEC constituent la signalisation « outside-in » qui requiert une coopération entre les récepteurs aux facteurs de croissance et les protéines du cytosquelette (Dedhar & Hannigan 1996). La fixation de l'intégrine à son ligand entraîne des changements de conformations. Les intégrines diffusent le long de la membrane pour former des agrégats (clustering) et permet la création de complexe intracellulaire de signalisation liés au cytosquelette.

Le court domaine cytoplasmique des sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  n'a pas d'activité enzymatique intrinsèque et semble fonctionner par assemblage avec des protéines cytoplasmique qui entraîne la formation d'un complexe protéique de grande taille contenant des protéines du cytosquelette et des molécules signalétiques (Clark & Brugge 1995; Sastry & Horwitz 1993). La plupart d'entre elles se lient aux molécules de la matrice extracellulaire (MEC) par leur région extracellulaire et aux microfilaments d'actine. Les protéines de liaison entre l'actine et les intégrines, localisées dans les points focaux, comprennent l' $\alpha$ -actinine, la taline, la tensine et la vinculine s'associant à la région intracellulaire des intégrines. Ce complexe de protéines structurales joue un rôle important dans la stabilisation de l'adhésion cellulaire et la régulation de la morphologie et de la mobilité cellulaire. Ce complexe protéique va aussi servir de matrice pour l'association de protéines qui vont réguler la transduction des informations via les voies de signalisation conduisant aux changements cellulaire induit par la fixation des intégrines.



**Figure 12 : Liaison des intégrines aux cytosquelette et voies de signalisation**

Après l'adhésion et le regroupement (clustering), les intégrines recrutent différentes protéines du cytosquelette et du cytoplasme permettant l'ancrage du complexe néoformé à l'actine du cytosquelette (Figure n°12). Cela entraîne le remodelage locale du cytosquelette d'actine et la formation de structure d'adhésion spécialisée, appelée points focaux. En plus de la formation d'une liaison structurelle entre la MEC et le cytosquelette d'actine, les points focaux sont aussi des sites importants pour la transduction de signal. Beaucoup de molécules de signalisation sont concentrées sur ce site, connectant ainsi l'adhésion médiée par les intégrines avec les signaux de transduction qui contrôlent les processus cellulaires tels que la prolifération et la différenciation (van der Flier & Sonnenberg 2001).

La protéine adaptatrice tensine et la tyrosine kinase FAK sont les premières protéines à être recrutées après le regroupement des intégrines. La liaison du ligand liant à l'intégrines mène au recrutement de composants du cytosquelette tels que le vinculine, la taline et  $\alpha$ -actinine.

De plus, l'attache aux ligands et la tension qui en résulte, induisent des phosphorylations au niveau de points focaux des protéines kinases de la famille SRC dont c-Src, Csk et Fyn, qui entraînent le recrutement et l'activation de molécules de signalisation en aval comme les Rho-like GTPase, les phospholipases- $C\gamma$  (PLC  $\gamma$ ) et les cascades de signalisation ERK et Jnk (Schlaepfer & T. Hunter 1998; Aplin et al. 1999). Les GTPases de la famille Rho joue un rôle important dans les réarrangements du cytosquelette (Hall 1998; Kilian et al. 2010). Ces

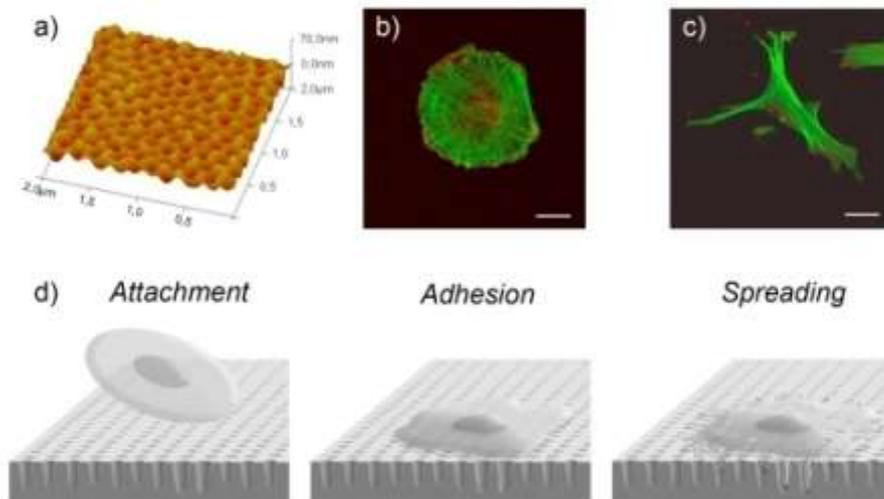
protéines sont active quand elles sont liées à du GTP et inactive quand la liaison est faite avec du GDP.

Enfin, la liaison des intégrines à leur ligand initie de nombreux changements métaboliques notamment une activation des serine/thréonine et tyrosine kinase, une augmentation de l'afflux de  $\text{Ca}^{2+}$  et de l'alkalinisation cytoplasmique, l'altération du métabolisme des lipides à inositols et des changements de morphologie cellulaire (Lafrenie & Yamada 1996). De plus, les voies de signalisation dépendante de l'adhésion qui régule le cytosquelette d'actine, sont aussi nécessaires dans plusieurs réponses fonctionnelles initiées par la liaison intégrine/ligand. L'influence des propriétés de surface sur le comportement cellulaire a été étudiée en utilisant de nombreuses surfaces et de types cellulaires comme les CSM, les ostéoblastes et les fibroblastes.

### **3. L'adhésion cellulaire sur les surfaces nanostructurées**

L'intégration des implants avec les tissus osseux et gingivaux voisins dépend du succès de l'interaction entre les tissus et la surface implantaire. L'un des axes de recherche sur les implants est la capacité d'utiliser les propriétés de surface pour guider la colonisation cellulaire et leur différenciation. La migration, l'adhésion et la prolifération cellulaire sont des pré-requis pour l'initiation de la régénération tissulaire. Des études ont montré que différents facteurs présents dans les tissus et sécrétés durant la phase inflammatoire sont capables d'attirer les CSM sur le site lésé (Agis et al. 2009; J. P. Vogel et al. 2006). La migration et la prolifération des CSM sont stimulées in vitro par de nombreux facteurs tels que le PDGF, EGF, VEGF, TGF- $\beta$ , BMP-2 et la BMP-4 (Mishima & Lotz 2008; Ozaki et al. 2007; Fiedler et al. 2005; Jian et al. 2006). Ces facteurs sont relargués sur le site lésé par les cellules impliquées dans la cicatrisation tissulaire. De plus, le clou plasmatique se formant au niveau de la plaie, va servir de lieu de stockage des molécules de fibrine et système de relargage d'une variété de facteurs bioactifs incluant des facteurs de croissance qui vont attirer les CSM et induire leur différenciation vers des lignées cellulaires spécifiques (Catelas et al. 2008; Wong et al. 2003; Mosesson 2005). Les facteurs plaquettaires sont aussi connus pour stimuler la prolifération des CSM (Rock et al. 2006). Après leur recrutement sur le site lésé, les CSM adhèrent à la matrice extracellulaire ainsi qu'à la surface implantaire puis prolifèrent afin de construire un nouveau tissu. Les modifications des surfaces implantaires au niveau nanométrique conditionnent la réponse biologique.

La figure n°13 illustre le contact initial de la cellule avec la surface conditionnant le comportement cellulaire. Il a déjà été démontré que la cellule interagit avec la surface à un niveau micro et sub-micrométrique.



**Figure 13: Les étapes successives de l'adhésion cellulaire sur une surface nanostructurée. A) Image AFM d'une surface nanostructurée. Images confocales de CSM après 2 (b) et 4 h (c), marquage de l'actine (vert) et de la vinculine (rouge (échelle : 20 µm). d) Schéma montrant l'attachement initial, l'adhésion) et l'attachement de cellule sur une surface nanostructurée.**

Dans un premier temps, la cellule va interagir avec la surface via les forces de Van der Waal. La présence de composant de la matrice extracellulaire tels que FN et VN, vont conditionner les interactions protéines-intégrines et par conséquent, l'ancrage cellulaire. La fixation avec les intégrines va entraîner une cascade complexe de voies de signalisations moléculaires et mécaniques qui se terminera par la formation de points focaux entre la cellule et son environnement (Kim et al. 2010). Après le contact initial, la cellule va produire des filipodes qui vont « sentir » la surface permettant un ancrage optimum et l'étalement cellulaire (Zhu et al. 2004).

La géométrie de la surface et les forces physiques sont aussi des paramètres qui semblent influencer la fonction cellulaire et le développement tissulaire. De nombreuses études ont montré l'effet des propriétés de surface, et plus particulièrement la rugosité sur l'adhésion cellulaire. Ainsi, les cellules vont s'aligner le long des lignes de microrugosité de la surface (S. Oh et al. 2009). Ce phénomène appelé « orientation de contact », a aussi été observé sur des surfaces composées de nano-sillons. La chimie de surface à un niveau nanométrique plus que micrométrique pourrait expliquer pourquoi l'attachement cellulaire n'est pas

systématiquement augmenter par la rugosité de surface (Anselme & Bigerelle 2006)(Mustafa et al. 2001; Bowers et al. 1992; Broberg et al. 2002; Deligianni et al. 2001; Keller et al. 1994; Xavier et al. 2003). Ces travaux coroborent l'idée que la cellule va interagir avec la topographie de surface à un niveau nano et micrométrique mais qu'elles sont sensibles à la chimie à un niveau nanométrique.

Les interactions cellule/surface médiées par les points focaux vont avoir un effet direct sur l'organisation spatiale du cytosquelette dépendant des forces de tension dues à l'étalement et la morphologie cellulaire. Déterminer comment les forces sont produites et propagées à travers le cytosquelette de la cellule est d'une grande importance. Ce phénomène appelé mécanotransduction, est un processus dynamique lié au cytosquelette et corrélé à de nombreuses voies de signalisation (Kilian et al. 2010). Bhadriraju et al ont montré qu'un haut degré d'étalement cellulaire conduit à une haute tension du cytosquelette et une expression différentielle de RhoA (Bhadriraju et al. 2007). Les tensions du cytosquelette modifient les voies Wnt, Erk et Jun via les modifications d'expression de RhoA (Kilian et al. 2010; Bhadriraju et al. 2007; McBeath et al. 2004; Hartmann 2006). La mécanotransduction est couplée à la tenségrité du cytosquelette. La tenségrité caractérise la faculté d'une structure à se stabiliser par le jeu des forces de tension et de compression qui s'y répartissent et s'y équilibrent. Les structures établies par la tenségrité sont donc stabilisées, non par la résistance de chacun de leurs constituants, mais par la répartition et l'équilibre des contraintes mécaniques dans la totalité de la structure. L'étude de la tenségrité et la mise en place de modèle sont des axes de recherche dans l'étude des interactions cellules/matériaux. Des modifications locales de la forme et de la longueur du cytosquelette seront le résultat de la propagation des forces à travers le cytoplasme (Jonas & Duschl 2010a). Le réseau de microtubule et l'actine sont requis pour permettre à la cellule de transmettre les forces de tension aux noyaux entraînant des modifications d'expressions géniques (Jonas & Duschl 2010b; Milan et al. 2009).

L'implication de la rugosité, la chimie ou la mécanotransduction doit cependant être confirmée par l'étude de l'expression génique de CSM sur différentes surfaces nanostructurées. Comme le montre la figure n°10, des CSM non différenciées sont caractérisées par l'expression de  $\alpha$ -SMA et de marqueurs de surface tels que CD90, CD49a et CD105. Lors de la différenciation ostéoblastique, les CSM exprime des marqueurs ostéogéniques telles que Runx2, ALP, OCN, OPN et BSP. Pour valider l'hypothèse selon laquelle les propriétés de surface peuvent diriger la différenciation cellulaire, des études comparatives devront être réalisées sur l'expression génique sur des surfaces nanostructurées

comme précédemment décrit par Dalby et al. sur des polymères nanostructurées (Dalby et al. 2007).

L'une des difficultés dans l'étude du comportement cellulaire sur des surfaces implantaires est due à la nécessité d'utiliser des surfaces et des techniques de quantifications biologiques standardisées. Cependant, la plupart des traitements physiques et chimiques de surfaces actuels produisent des topographies hautement variables et aléatoires rendant les tests biologiques difficilement interprétables. Afin de comprendre les interactions cellule/surface, des surfaces normalisées, bien caractérisées et reproductibles doivent être utilisées. Pour cela, les nanotechnologies peuvent permettre d'obtenir des surfaces reproductibles au niveau nanométrique.

Les techniques pour étudier l'adhésion sont multiples. Au cours de ce paragraphe, nous allons faire un état des lieux non exhaustif des techniques disponibles.

Après standardisation des surfaces, le nombre de cellule adhérente et proliférant sur les surfaces peut être déterminé par comptage cellulaire ou en utilisant des essais métaboliques (Anselme et al. 1999). La prolifération et la viabilité cellulaire sont couramment déterminées par des méthodes quantitatives et sensibles comme l'XTT et le MTT. Le doublement cellulaire est obtenu par incorporation de marqueurs radioactifs tel que la thymidine tritiée ou l'incorporation de 5'-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) par immunohisto ou cytochimie ou ELISA ou analyse FACS. Le western blot est utilisé en routine pour la détection de protéines spécifiques exprimées par les cellules. Cette technique est appliquée pour déchiffrer les voies de signalisation impliquées dans les interactions entre les cellules et le substrat (McBeath et al. 2004; Engler et al. 2006).

L'orientation de contact qui est l'habilité des cellules à utiliser la topographie du substrat pour leur orientation et leur migration, peut être étudiée par la visualisation de l'organisation des fibres d'actine et de la morphologie cellulaire. Le cytosquelette et plus particulièrement l'actine, est couramment visualisé par utilisation de la phalloïdine, une toxine extraite de l'amanite phalloïde (*A. phalloides*) connues sous le nom de phallotoxines. Cette molécule se lie à l'actine, empêchant sa dépolymérisation et empoisonnant la cellule. Les points d'ancrage à la surface seront détectés par des anticorps dirigés contre la vinculine ou la taline, des protéines présentes notamment au niveau des plaques d'adhésion focales.

La différenciation ostéogénique peut être évaluée par l'étude de l'expression génique de marqueurs tels que l'OCN et OPN (Biggs et al. 2007; Lipski et al. 2008). La minéralisation de la matrice extracellulaire est évaluée par coloration au rouge alizarine ou coloration Von

Kossa ou encore par détection EDX ou spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) (Bonewald et al. 2003; Gregory et al. 2004). La détection des marqueurs tardifs tels que la BMP-2 ou l'ALP, est réalisée par histochimie (Akiyama et al. 1997; Aoki et al. 2001) ou par dosage enzymatique. Par exemple, le p-nitrophényl phosphate (p-Npp) permet la détection de l'activité enzymatique de l'ALP (Aoki et al. 2001).

Récemment, des PCR arrays ont été utilisés pour déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse cellulaire aux surfaces nanostructurées (Biggs et al. 2007) Cette technique permet d'étudier jusqu'à 384 gènes concernant la matrice extracellulaire, les protéines de l'adhésion et de la prolifération. Des études ont montré que les gènes associés à l'adhésion et la prolifération sont surexprimés sur les surfaces nanostructurées comparées aux autres gènes (Covas et al. 2008; Vetrone et al. 2009).

## **VIII. La différenciation cellulaire sur les surfaces nanostructurées**

Dans le micro-environnement, les CSM sont stimulées par des facteurs spécifiques permettant la différenciation vers la lignée cellulaire adéquate aux tissus environnants. Sous l'influence de ces facteurs, les CSM vont basculer vers les cellules ostéoblastiques au contact du tissu osseux alors qu'elles vont se différencier en cellules fibroblastiques au contact du tissu gingival. Ces 2 voies de différenciation sont en concurrence autour des implants dentaires. Au cours de ce paragraphe, la différenciation fibroblastique sera abordée puis nous décrirons les facteurs ostéogéniques et la différenciation ostéoblastique qui a fait l'objet de nombreuses études durant cette thèse.

### **1. La différenciation fibroblastique**

Dans certains cas, les implants vont être encapsulés dans une capsule fibreuse à cause de la prolifération et de la différenciation des CSM en fibroblastes. En réponse à des cytokines, les fibroblastes vont migrer et générer une capsule de collagène, la première étape de la régénération du tissu gingival ou du rejet de l'implant au contact de l'os. Cette capsule fibreuse empêche le lien entre la surface implantaire et le tissu osseux entraînant l'échec de l'implant (Hobkirk 1983). Par contre, la différenciation des CSM en cellules fibroblastiques et l'adhésion des fibroblastes sont souhaitées au niveau de la tête de l'implant dentaire au contact du tissu gingival. L'adhésion des fibroblastes et la prolifération sont plus faibles sur

des surfaces nanostructurées comparées à des surfaces conventionnelles (Eisenbarth et al. 1996; Miller et al. 2005; Cohen et al. 2007). Wang et al ont confirmé le rôle de la chimie de surface sur le comportement cellulaire (Wang et al. 2005). Ils ont trouvé que les groupements fonctionnels chargés positivement améliorent l'attachement et l'étalement des fibroblastes. L'activité de OCN et ALP est augmentée sur les surfaces polies miroir alors qu'elle est diminuée sur des surfaces rugueuses de Ti nettoyées par plasma, indiquant que l'expression phénotypique des cellules osseuses est altérée par les techniques de préparation des surfaces (Boyan et al. 1996; Keller et al. 1994). L'adhésion des fibroblastes et leur prolifération ont été montrées plus faibles sur les surfaces nanostructurées comparées aux surfaces lisses (Keller et al. 1994; Cohen et al. 2007).

## 2. La différenciation ostéoblastique

### a. La régulation de la minéralisation

Le remodelage osseux est régulé par des facteurs de transcription qui permettent la différenciation ostéoblastique. Celle-ci est caractérisée par l'expression de protéines favorisant la minéralisation. Des protéines inhibant la minéralisation sont également sécrétées sur le site afin de permettre un contrôle de la néoformation osseuse. L'expression de protéines impliquées dans ce processus a été étudiée au cours de cette étude et sera détaillée dans cette partie (Figure n°14).

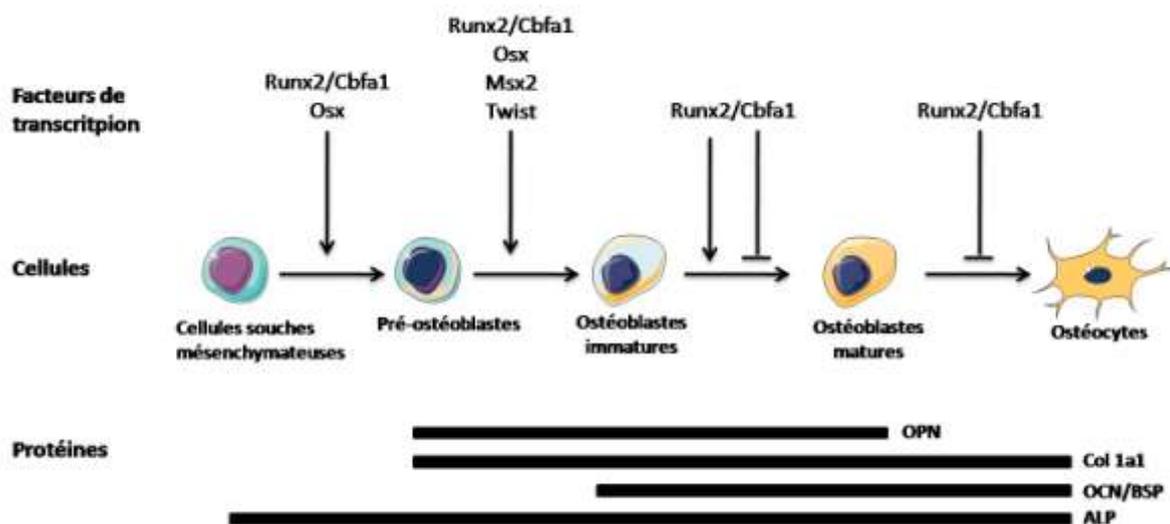


Figure 14 : facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses et protéines sécrétées au cours de la différenciation ostéoblastiques.

### (i) Les facteurs de transcription impliqués dans l'ostéogénèse

La différenciation des tissus implique l'action d'un large spectre de molécules de signalisation, d'hormones, de cytokines, de facteurs de croissance, de protéines matricielles, et de facteurs de transcription, ainsi que des interactions cellulaires. Ces facteurs vont agir de manière coordonnée afin de contrôler l'expression spatio-temporelle de gènes impliqués dans les propriétés fonctionnelles des ostéoblastes. Les facteurs de transcription Runx-2 et Ostérix, ayant fait l'objet d'étude au cours de cette thèse, seront décrits dans ce paragraphe.

**Runx-2**, également appelé Core binding factor alpha-1 (cbfa-1), est le premier facteur de transcription à avoir été impliqué dans la différenciation ostéoblastique (Komori et al. 1997; Komori 2002). La famille Runx est composée de trois gènes qui possèdent un domaine de liaison à l'ADN appelé domaine runt. Le facteur de transcription runx-2 se fixe sur les sites Osteoblast Specific Element -2 (OSE-2) décrit sur les promoteurs de nombreux marqueurs ostéoblastiques notamment sur celui du collagène de type I, de l'OPN, de la BSP et de l'OCN (Yoshida & Komori 2005). La protéine Runx-2 agit sur un coactivateur appelé Core binding factor b (Cbfb) (Yoshida et al. 2002). Des souris invalidées pour runx-2 ne présentent plus d'ossification endochondrale ou membranaire du fait de l'absence de différenciation ostéoblastique, indiquant le rôle essentiel de cette protéine dans la différenciation ostéoblastique (Komori et al. 1997). L'activation transcriptionnelle dépendante de Runx-2 dans les temps précoces de la différenciation a été montrée pour plusieurs promoteurs dont celui du collagène de type I (Col I), de l'OPN, de l'OCN, de la MMP 13 et de l'ostéoprotégérine (OPG). Néanmoins, le promoteur de la BSP est une exception puisque Runx-2 réprime son activité (Javed et al. 2001). Runx-2 est donc un facteur permettant la différenciation ostéoblastique dans les temps précoces mais son inhibition dans les temps tardifs. Ainsi, une surexpression de Runx-2 après le stade d'ostéoblastes matures entraîne une diminution de l'expression des principales protéines de l'os.

**Ostérix** est un facteur de transcription spécifique des ostéoblastes qui possèdent trois domaines en doigts de zinc (Nakashima et al. 2002). L'invalidation de ce gène est létale à la naissance. Les souris Osterix<sup>-/-</sup> présentent une absence d'ostéoblaste et de toute forme d'ossification démontrant le caractère indispensable de ce facteur dans la différenciation ostéoblastique.

Les **facteurs de transcription de la famille AP-1** sont des dimères composés de membres de la famille fos tels que cfos, fosB, Fra-1 et Fra-2 et de la famille jun tels que JunB, JunD et cJun (Angel & Karin 1991). Les facteurs de transcription de la famille d'AP-1 peuvent réguler

l'expression de nombreux gènes qui possèdent des sites de liaison AP-1 au sein de leur promoteur. Ces facteurs sont impliqués dans de nombreux phénomènes cellulaires incluant la prolifération, la différenciation et l'apoptose. L'expression des différents membres de la famille AP-1 varie au cours de la différenciation et de la maturation ostéoblastique. Ainsi, au stade prolifératif, tous les membres AP-1 sont fortement exprimés puis, au cours de la différenciation et de la minéralisation ostéoblastique, l'expression de Fra-1 (Fos related antigen-2) et JunD devient prédominant (McCabe et al. 1996). Les facteurs régulant la prolifération et la différenciation ostéoblastique tels que le TGF- $\beta$ , la PTH ou la vitamine D, stimulent l'activité des facteurs de la famille d'AP-1 (Karsenty & Wagner 2002).

### (ii) **Les protéines favorisant la minéralisation**

La **sialoprotéine osseuse** ou integrin-binding sialoprotein (BSP pour Bone sialoprotein) est une glycoprotéine extracellulaire appartenant à la famille des SIBLING (Small Integrin Binding Ligand Nlinked Glycoprotein) et synthétisée quasi exclusivement par les cellules des tissus minéralisés incluant l'os, la dentine, et le ciment (Fisher & Fedarko 2003). Des études menées *in vitro* et *in vivo* chez le rat ont montré qu'elle joue probablement un rôle spécifique dans les stades initiaux de la minéralisation en tant que nucléateur (Chen et al. 1992; Hunter et al. 1994) et ce contrôle pourrait être lié à sa capacité de liaison aux fibres de collagène. Des souris BSP<sup>-/-</sup> présentent un léger déficit de minéralisation à la naissance mais ce retard de minéralisation est rattrapé avec l'âge. Ces données confirmeraient le rôle de la BSP en tant que nucléateur aux stades initiaux de la minéralisation (Fujisawa et al. 1995). Suite aux phases initiales de la croissance des cristaux, la BSP agit comme un inhibiteur de la croissance cristalline (Hunter et al. 1994). Enfin, la Sialoprotéine osseuse possède une séquence RGD (Arg-Gly-Asp) qui est un site d'attachement cellulaire reconnu par des intégrines  $\alpha\beta3$ . Grâce à cette séquence RGD, la BSP contribue à l'activité des ostéoclastes en interagissant avec leurs intégrines (Ross et al. 1993; Razzouk et al. 2002). Cette hypothèse semble être validée par une réduction de la différenciation des ostéoclastes isolés des os de souris BSP<sup>-/-</sup> (Malaval et al. 2008).

L'**ostéonectine**, également appelée SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) ou BM-40 (Basement membrane 40), est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire des tissus minéralisés liant le calcium et le collagène (Alford & Hankenson 2006). L'ostéonectine est exprimée au niveau de l'os, en particulier dans les zones à fort remodelage osseux et est l'une des protéines non collagéniques la plus abondante du tissu osseux. Elle est également exprimée par le cartilage, la peau et les vaisseaux sanguins. Cette protéine ne joue pas un rôle

structural dans la matrice mais module les interactions cellules-matrice (Bornstein & Sage 2002). L'un de ces rôles est de lier les cristaux aux fibres de collagène (Bianco et al. 1988). Récemment, un rôle de protéine chaperonne du collagène lui a également été attribué. Ainsi, elle augmenterait la stabilité du collagène dans la cellule et régulerait la fibrillogenèse extracellulairement (Martinek et al. 2007).

La **phosphatase alcaline** est une enzyme liée à la membrane de telle sorte que sa sous-unité catalytique est localisée dans le milieu extracellulaire ce qui permet sa libération dans la circulation sanguine. Quatre isoformes de cette enzyme ont été décrites (intestinale, germinale, placentale et tissu non spécifique (TNAP)), la TNAP étant exprimée dans le foie, les reins, l'os, le cartilage, ainsi que les dents. Le rôle de la TNAP est de générer du phosphate inorganique (Pi) pour la cristallisation des cristaux d'apatite. Ainsi, il a été montré *in vitro* qu'au cours du processus de minéralisation, l'activité enzymatique de la TNAP augmente, et les phosphates organiques présents, tels que le  $\beta$ -glycérophosphate, ou l'ATP, sont hydrolysés en libérant du Pi (Nakano et al. 2007; Beck et al. 2000). Cette génération de Pi dans le milieu permet la minéralisation de la matrice extracellulaire par les ostéoblastes et les chondrocytes de la plaque de croissance (Murshed et al. 2005; Kirsch et al. 1997). Cependant, la présence de Pi n'est pas une condition suffisante pour que la minéralisation ait lieu, en raison de la présence de pyrophosphate inorganique (PPi), inhibiteur de la minéralisation (Anderson, Dymna et al. 2005; Murshed et al. 2004). La TNAP est également capable d'hydrolyser le PPi et donc de faciliter la précipitation et la croissance des cristaux (Anderson, Rama et al. 2005).

### (iii) **Les protéines inhibant la minéralisation**

L'**ostéopontine** (OPN), également connue sous le nom de Secreted Phosphoprotein 1 (Sp1), est une phosphoprotéine non collagénique, qui appartient à la famille des SIBLING (Small Integrin Binding Ligand N-Linked Glycoprotein). Cette protéine est exprimée par les ostéoblastes, les ostéoclastes, les chondrocytes hypertrophiques, les hépatocytes, les lymphocytes T activés et les cellules endothéliales. L'OPN est produite par les ostéoblastes à un stade tardif de leur maturation et sera présente dans la matrice osseuse. Elle est également fortement exprimée par les ostéoclastes. L'OPN est associée à la minéralisation du tissu osseux et aux calcifications ectopiques (Shioi et al. 2002). Elle se lie fortement aux cristaux d'hydroxyapatite en inhibant la croissance cristalline et la calcification *in vivo* et *in vitro* (Steitz et al. 2002). L'effet inhibiteur de l'OPN sur la minéralisation est dépendant de son degré de phosphorylation. Ainsi, il a été montré qu'après une déphosphorylation par une

phosphatase, l'OPN perd sa fonction inhibitrice (Gericke et al. 2005; S Jono et al. 2000). Par ailleurs, l'expression de l'OPN est augmentée en réponse au Pi dans des cultures de cellules ostéoblastiques (Beck et al. 2000), ce qui suggère que l'OPN pourrait effectuer un rétrocontrôle négatif en inhibant la formation des cristaux.

L'**ostéocalcine** (OCN) est exprimée par l'ostéoblaste mature, les chondrocytes et les odontoblastes. L'augmentation de la masse osseuse observée chez les souris invalidées pour le gène de l'ostéocalcine, suggère un rôle de cette protéine dans l'inhibition de la minéralisation (Ducy et al. 1996). Il a été montré *in vitro* que l'OCN se lie à l'apatite avec une grande affinité et contrôle ainsi la nucléation des cristaux d'hydroxyapatite (G. K. Hunter et al. 1996; A L Boskey et al. 1985). Cependant, il existe de nombreuses controverses quant à l'implication de cette protéine dans la minéralisation de la matrice extracellulaire. Ainsi, de nouvelles études n'associent pas l'OCN à la minéralisation de la MEC (Murshed et al. 2004). A l'inverse, d'autres études soutiennent que la carboxylation de ses résidus dépendant de la vitamine K entraîne une forte affinité de l'OCN pour les cristaux d'hydroxyapatite de l'os et favoriserait la minéralisation (Matsunaga et al. 1999).

#### **b. La différenciation ostéoblastique sur les surfaces nanostructurées**

L'influence des propriétés de surface sur le comportement cellulaire a été étudiée en utilisant de nombreuses surfaces différentes et de types cellulaires comme les CSM, les ostéoblastes et les fibroblastes.

La différenciation ostéoblastique de CSM est induite par des surfaces nanostructurées en absence de facteurs ostéogéniques (Dalby et al. 2007). De plus, les CSM sont sensibles au titane microstructuré et hydrophile induisant la différenciation ostéoblastique (Olivares-Navarrete et al. 2010). Plusieurs articles rapportent que l'augmentation de la rugosité de surface, augmente la différenciation alors qu'elle inhibe la prolifération cellulaire (Anselme 2000; Lange et al. 2002; Martin et al. 1995; Perizzolo et al. 2001). D'autres ont montré qu'une rugosité importante améliore la prolifération (Chehroudi & Brunette 2002; Suh et al. 2003). Cependant, les effets de la nanorugosité sur des ostéoblastes ont été observés par marquage de l'actine (Lipski et al. 2008). Dans cette étude, les auteurs ont constaté que l'aire cellulaire diminue quand la rugosité augmente de 50 et 300 nm. L'adsorption différentielle des protéines sur des topographies de rugosité nanométrique modifie la densité de FN adsorbée et de point focaux des ostéoblastes (González-García et al. 2010). Santiago et al. ont montré que la prolifération, la viabilité et la différenciation des cellules ostéoblastiques étaient

meilleures sur des échantillons en titane traités pas HCl/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en comparaison à des surfaces immergées dans une solution de fluorure de sodium (Santiago et al. 2005).

De nombreuses études ont ainsi démontré que la géométrie à un niveau nanométrique peut contrôler le comportement cellulaire à travers l'adsorption protéique et les voies de signalisation. Il est possible d'imaginer de développer de nouvelles surfaces implantaires permettant une intégration tissulaire prévisible grâce à ses propriétés de surface.

## **IX. Etudes *in vivo***

### **1. L'ostéointégration des implants**

La cicatrisation osseuse péri-implantaire a été définie par l'équipe de Brånemark comme étant le contact direct structurel et fonctionnel entre l'os vivant et la surface des implants dentaires mis en charges (Albrektsson et al. 1981). Histologiquement, cette ostéointégration se traduit par une formation osseuse au contact direct de l'implant sans interposition de tissu fibreux. Il en résulte une ankylose de l'implant, créée pendant la période de cicatrisation post-chirurgicale et maintenue par un équilibre dynamique tout au long de la période suivant l'ostéointégration. L'ostéointégration succédant à la mise en place de l'implant se déroule en trois étapes distinctes :

- L'ostéoconduction,
- La néoformation osseuse,
- Le remodelage osseux.

La première phase de l'ostéointégration correspond à l'apposition et la croissance osseuse à la surface de l'implant. Ce phénomène repose sur la migration de cellules ostéogéniques différenciées sur la surface, qui vont alors synthétiser de la matrice extracellulaire. Cette matrice organique va ensuite se minéraliser, conduisant à la néoformation osseuse. Ce tissu osseux néoformé possède la même composition et les mêmes propriétés mécaniques que celui du reste de l'organisme. Le remodelage par les cellules ostéoclastiques suit la phase d'apposition osseuse. L'étude de Davies, dans un modèle *in vitro*, tend toutefois à démontrer que les ostéoblastes ont la possibilité de migrer sur la surface, mais que ce sont généralement des cellules moins différenciées de la lignée ostéogénique ou des cellules souches mésenchymateuses indifférenciées qui migrent et colonisent la surface implantaire (Davies

1998). Des phénomènes d'ostéoinduction peuvent aussi favoriser l'ostéointégration implantaire. Des cellules primitives, pluripotentes et indifférenciées peuvent se transformer en cellules de la lignée osseuse de type ostéoblaste ou ostéocyte. Différents facteurs peuvent expliquer cette différenciation. Des facteurs environnementaux tels que la tension en oxygène, peuvent induire une différenciation ostéoblastique (Boyan et al. 1996). Les cellules indifférenciées peuvent aussi adhérer directement à la surface en reconnaissant les séquences RGD des protéines adsorbées (Kieswetter et al. 1996). La matrice néo-synthétisée par ces cellules modifie la surface de l'implant, induisant une différenciation ostéoblastique. Le nouveau tissu osseux est alors remodelé par les cellules ostéoclastiques.

L'ostéointégration des implants implique aussi deux phénomènes d'ostéogénèse : l'ostéogénèse de contact et l'ostéogénèse à distance. L'ostéogénèse de contact consiste en la néoformation osseuse à la surface de l'implant alors que l'ostéogénèse à distance concerne la formation de tissu osseux environnant l'implant.

La cicatrisation osseuse qui suit l'insertion implantaire est identique à celle observée au niveau de l'alvéole dentaire. Une phase de nécrose et de résorption du tissu osseux traumatisé est concomitante avec la néoformation osseuse. Après l'hémostase et la formation du caillot, la fibrinolyse entraîne la formation d'un tissu conjonctif lâche servant de support à l'angiogénèse. La surface de l'implant est conditionnée par les protéines sériques, les ions minéraux, les glucides, les lipides et les cytokines produites par les cellules du système immunitaire. Les protéines s'adsorbent, du fait notamment qu'elles contiennent des séquences RGD. Ces protéines semblent jouer un rôle majeur dans l'adhésion cellulaire et la minéralisation (Puleo & A Nanci 1999). De plus, l'ancrage du caillot de fibrine à la surface de l'implant pourrait servir de support aux cellules osseuses pour migrer vers la surface implantaire (Davies 2003).

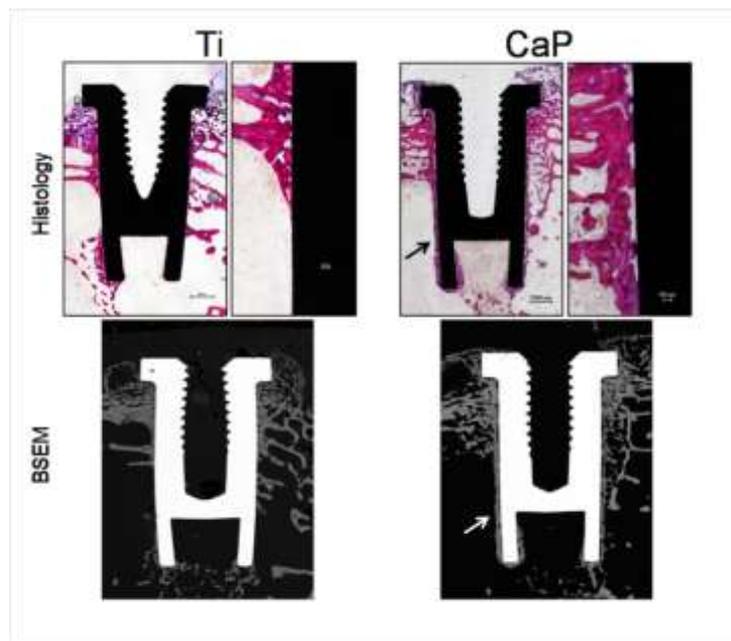
La chronologie de ces différentes étapes a été décrite par Schwartz (Schwartz & Boyan 1994). Aussitôt après l'implantation, des protéines sériques adhèrent à l'implant. Pendant les trois premiers jours, les cellules mésenchymateuses adhèrent à la surface implantaire et prolifèrent. Au bout de six jours, du tissu ostéoïde est produit. Après deux semaines, la calcification de la matrice extracellulaire est achevée. Au bout de trois semaines, les processus de remodelage sont en cours.

Tous ces phénomènes ont été décrits pour des implants non mis en charge immédiatement après implantation. La mise en charge immédiate modifie les processus de remodelage osseux

et d'ostéointégration qui se produisent simultanément. La stabilité implantaire initiale et son maintien pendant les phases de cicatrisation osseuse semblent capitales pour l'achèvement de l'ostéointégration implantaire (Raghavendra et al. 2005).

## 2. Les études précliniques

L'ostéointégration des implants, présentant différentes surfaces, doit être étudiée à l'aide de modèles animaux présentant les caractéristiques biologiques et histomorphométriques appropriées. En première intention, un modèle animal de faible coût et présentant des phénomènes de cicatrisation rapide doit être utilisé. L'ostéointégration des surfaces implantaires peut ainsi être testé au niveau des os longs des rats ou des lapins. Dans ces modèles, le contact os-implant et la densité osseuse autour des implants peuvent être mesurés qualitativement et quantitativement après implantation (Jansen et al. 1991; Piattelli et al. 1994; Piattelli et al. 2003; McCracken et al. 2001; Darimont et al. 2002).



**Figure 15:** Ostéointégration d'implants en titane (Ti) ou recouvert de phosphate de calcium CaP après 4 semaines d'implantation dans des condyles fémoraux de lapins. Notons l'apposition osseuse au contact des implants revêtus de CaP (flèche) sur les images d'histologie (marquage à la fuschine basique et au bleu de toluidine) et de microscopie électronique (BSEM) (Lavenus et al. 2011).

Parmi, les modèles pré-cliniques, le chien peut être utilisé pour tester les implants dentaires du fait d'une anatomie dentaire et osseuse proche de celle de l'Homme. Dans toutes les études, l'ostéointégration est caractérisée en mesurant le contact os-implant par des techniques

histomorphométriques sur des images obtenues en microscopie optique ou électronique (Figure n°15) (Darimont et al. 2002; Göransson et al. 2003; Piattelli et al. 2003). Les nanostructures des surfaces implantaires semblent jouer un rôle important dans le contrôle de la différenciation cellulaire in vitro. Mais cela doit être corrélé aux propriétés d'intégration tissulaire des implants. Cependant, un manque de correspondance existe entre les études in vitro et in vivo en relation avec les surfaces nanostructurées.

Ogawa T et al. ont préparé des surfaces nanostructures par dépôt physique en phase vapeur (PVD) et ont testé leur ostéointégration dans des fémurs de rats (T Ogawa, Takeuchi et al. 2008). Dans cette étude, la surface de contact augmente jusqu'à 40 % et la qualité de l'ostéointégration des surfaces nanostructurées comparées aux surfaces mordancées est meilleure. Sul et ses collaborateurs ont réalisé des implants présentant une surface anodisée d'oxyde de titane d'épaisseur comprise entre 200 et 1000 nm. Ils les ont implantés dans des tibias de lapins pendant 6 semaines. (Sul et al. 2002). Cette étude a permis d'observer que les implants avec une couche d'oxyde fine ont une meilleure ostéointégration que les implants avec une couche d'oxyde de plus de 600 nm d'épaisseur. De plus, les forces de torsion sont significativement meilleures sur des implants en titane ( $48,02 \pm 5,92$  N/cm) que sur des implants contrôles non-traités ( $27,83 \pm 1,78$  N/cm) après 6 semaines d'implantation dans un modèle de lapin (Son et al. 2003). Ils en ont conclu que les surfaces anodisées permettent une haute force interfaciale après une courte période d'implantation comparée aux implants non-traités. Le comportement cellulaire et la cicatrisation ont été observés sur des implants en titane hydrophile et hydrophobe après 3 semaines d'implantation dans des tibias de rats (Eriksson et al. 2004). Dans cette étude, aucune différence significative dans le nombre de cellule entre les 2 types de surface n'a pu être mise en évidence, par contre, une augmentation de l'expression de certains marqueurs ostéogéniques a été observée sur les surfaces hydrophiles. Plusieurs études ont démontré que les surfaces hydrophiles jouent un rôle crucial dans les stades précoces de la cicatrisation à cause des propriétés hautement thrombogènes de ces surfaces (Hunt et al. 1997; Vogler et al. 1995). Les implants dont l'hydrophilicité est photo-induite, augmentent la formation osseuse au contact de l'implant de 28,2 % après 2 semaines d'implantation dans des tibias de rats (contrôle à 17,97 %) (Sawase et al. 2008). Certains auteurs ont corrélé les premiers événements de la formation osseuse proche de la surface avec la réponse tissulaire à long terme pour ces matériaux chez l'homme (Kohavi et al. 1992; Boyan et al. 1996). Les premiers événements de la formation osseuse au contact d'implants en céramique, en CaP ou en acier inoxydable ont été étudiés dans des tibias de rats après une ablation de moelle osseuse (Schwartz et al. 1991; Schwartz et al. 1992).

Ces différentes études tendent à démontrer que les propriétés de surface à un niveau nanométrique peuvent déterminer la nature du tissu péri-implantaire. Bien que cette hypothèse ne soit pas actuellement, complètement validée, il est possible de promouvoir la différenciation ostéogénique précoce des cellules et l'apposition osseuse plutôt que l'encapsulation fibreuse en utilisant les surfaces implantaires nanostructurées (Biggs et al. 2007; Boyan et al. 1996).

### **3. Les études cliniques**

Peu d'études cliniques multicentriques ont comparé le taux de succès de différentes surfaces implantaires. Dans les études réalisées, la comparaison portait sur les surfaces préparées par sablage à l'alumine, mordantage acide, projection plasma de titane ou revêtement d'hydroxyapatite. Les taux de succès avoisinent 95 % après 10 ans de mise en charge, quel que soit le type de surface (Jones et al. 1999; Jokstad et al. 2003; Mau et al. 2003). La comparaison entre les différents groupes d'implants est difficile à cause des nombreux paramètres intervenant dans les interactions tissu/implant notamment la géométrie de l'implant, le grade de titane et les propriétés de surface ainsi que la qualité du tissu osseux implanté. Les surfaces nanostructurées peuvent, peut être, contrôler la différenciation cellulaire vers une lignée spécifique et par conséquent, la nature du tissu péri-implantaire. Malgré des recherches actives en implantologie, la surface idéale pour prédire l'intégration tissulaire reste un défi.

## **X. Les interactions entre les cellules et les surfaces nanostructurées**

Les propriétés de surface, comme nous l'avons vu, joue un rôle important dans les interactions entre la surface implantaire et le tissu environnant. De plus, il est aujourd'hui reconnu que les nanotopographies influencent l'adsorption protéique, l'adhésion et la différenciation cellulaire ainsi que l'ostéointégration des implants. Les connaissances actuelles sur les interactions cellulaires avec des surfaces nanostructurées sont présentées dans cette partie.

## **1. Article 1: Interaction cellulaire avec les surfaces implantaires nanostructurées**

### **Cell interaction with nanopatterned surface of implants**

Sandrine Lavenus, Jean-Charles Ricquier, Guy Louarn, Pierre Layrolle

Nanomedicine 2010, 5(6), 937-947

#### Résumé :

Les métaux notamment le titane et ses alliages, sont couramment utilisés pour la fabrication d'implants orthopédiques et dentaires en raison de leurs propriétés de surface permettant une interface implantaire biocompatible avec les tissus environnants. Les stratégies actuelles pour modifier la nature de l'interface peri-implantaire impliquent des changements au niveau nanométrique, affectant aussi bien, l'adsorption protéique, les interactions cellule-surfaces et la cicatrisation tissulaire. Les techniques les plus récentes pour contrôler les interactions biologiques à un niveau nanométrique seront abordées. Les stratégies futures pour contrôler la nature du tissu implantaire seront aussi discutées.

## 2. Chapitre livre: Nanotechnologie et implant dentaire

### Nanotechnology and dental implants

Sandrine Lavenus, Guy Louarn, Pierre Layrolle

Chapter of “Nanotechnology for dental applications”, In press.

#### Résumé :

Le succès clinique à long terme des implants dentaires peut être corrélé à l'ostéointégration à court terme. Au cours de ce chapitre, les différentes étapes des interactions entre les fluides biologiques, les cellules, les tissus et la surface implantaire vont être abordées. Immédiatement après l'implantation, les implants sont en contact avec les protéines et les plaquettes du sang. La différenciation des cellules souches mésenchymateuses conditionnera alors, la cicatrisation tissulaire péri-implantaire. Un contact direct entre l'os et l'implant est voulu afin d'obtenir un ancrage biomécanique de l'implant au tissu osseux plutôt qu'une encapsulation fibreuse. Les propriétés de surface telles que la chimie et la rugosité, jouent un rôle déterminant dans ces interactions biologiques. Les caractéristiques physico-chimiques au niveau nanométrique peuvent, en fin de compte, contrôler l'adsorption protéique de protéines ainsi que l'adhésion et la différenciation cellulaire. Les nanotechnologies sont de plus en plus utilisées pour les modifications de surface des implants dentaires. Une autre approche pour augmenter l'ostéointégration consiste à l'application d'une fine couche de phosphate de calcium (CaP). Les nanocristaux de CaP bioactif déposés sur la surface implantaire sont résorbables et stimulent l'apposition osseuse et par conséquent, la cicatrisation osseuse. Les modifications futures des surfaces au niveau nanométrique pourront contrôler la nature du tissu péri-implantaire et améliorer le taux de succès cliniques.

# Nanotechnology and dental implants

Sandrine Lavenus<sup>1,2</sup>, Guy Louarn<sup>2</sup> and Pierre Layrolle<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Inserm, U957, Bone resorption physiopathology and primary bone tumors therapy, Faculty of Medicine, University of Nantes, France

<sup>2</sup> CNRS, UMR6502, Institut des Matériaux Jean Rouxel (IMN), University of Nantes, France

<sup>3</sup> ERT2004, Faculty of Dental Surgery, University of Nantes, France

## Contents

- 3.1. Introduction
- 3.2. Nanoscale surface modifications
- 3.3. Interactions of surface dental implants with blood
- 3.4. Interactions with mesenchymal stem cells
  - 3.4.1. Origin of mesenchymal stem cells
  - 3.4.2. Migration, adhesion and proliferation
  - 3.4.3. Differentiation
- 3.5. Tissue integration
- 3.6. Conclusion
- References

## **Abstract**

The long term clinical success of dental implants is related to their early osseointegration. This chapter reviews the different steps of the interactions between biological fluids, cells, tissues and surfaces of implants. Immediately following implantation, implants are in contact with proteins and platelets from blood. The differentiation of mesenchymal stem cells will then condition the peri implant tissue healing. Direct bone to implant contact is desired for a biomechanical anchoring of implants to bone rather than fibrous tissue encapsulation. Surface properties such as chemistry and roughness play a determinant role in these biological interactions. Physicochemical features in the nanometer range may ultimately control the adsorption of proteins as well as the adhesion and differentiation of cells. Nanotechnologies are increasingly used for surface modifications of dental implants. Another approach to enhance osseointegration is the application of thin calcium phosphate (CaP) coatings. Bioactive CaP nanocrystals deposited on titanium implants are resorbable and stimulate bone apposition and healing. Future nanometer controlled surfaces may ultimately direct the nature of peri-implant tissues and improve their clinical success rate.

## **3.1 Introduction**

Implants are commonly used in dental surgery for restoring teeth. One of the challenges in implantology is to achieve and maintain the osseointegration as well as the epithelial junction of the gingival with implants. An intimate junction of the gingival tissue with the neck of dental implants may prevent bacteria colonisations leading to peri-implantitis while direct bone bonding may ensure a biomechanical anchoring of the artificial dental root (Figure 1).

The first step of the osseointegration of implants is called primary stability and is related to the mechanical anchorage, design of implants and bone structure<sup>1</sup>. This primary interlock decreases with time at the benefit of the secondary anchorage, which is characterized by a biological bonding at the interface between bone tissues and implant surface. Between the primary mechanical and secondary biological anchorage, a decreased of implant stability could be observed. Many studies have attempted to enhance the osseointegration of implants by various surface modifications. The aim is to provide metal implants with surface biological properties for the adsorption of proteins, the adhesion and differentiation of cells and tissue integration. These biological properties are related to chemical composition, wettability and roughness of metal implants surfaces. However, the control of these surface properties at the protein and cell levels, thus in the nanometre range, remains a challenge for researchers and dental implants manufacturers.

Nanotechnologies may produce surfaces with controlled topography and chemistry that would help understanding biological interactions and developing novel implant surfaces with predictable tissue-integrative properties<sup>2,3</sup>. Various processing methods derived from the electronic industry such as lithography, ionic implantation, anidization, radio frequency plasma treatments may be applied to the surfaces

of dental implants to produce controlled features at the nanometer scale. These surfaces may then be screened by using high throughput biological assays *in vitro*. For instance, specific protein adsorption, cell adhesion and differentiation of stem cells should be studied in relation to the surface properties. This approach may define the ideal surface for a specific biological response. Following *in vitro* screening, nanostructured surfaces may then be tested in animal models to validate hypothesis in a complex *in vitro* environment.

New coating technologies have also been developed for applying hydroxyapatite and related calcium phosphates (CaP), the mineral of bone, onto the surface of implants (Figure 2). Many studies have demonstrated that these CaP coatings provided titanium implants with an osteoconductive surface<sup>4,5</sup>. Following implantation, the dissolution of CaP coatings in the peri implant region increased ionic strength and saturation of blood leading to the precipitation of biological apatite nanocrystals onto the surface of implants. This biological apatite layer incorporates proteins and promotes the adhesion of osteoprogenitor cells that would produce the extracellular matrix of bone tissue. Furthermore, it has been also shown that osteoclasts, the bone resorbing cells, are able to degrade the CaP coatings through enzymatic ways and created resorption pits on the coated surface<sup>5</sup>. Finally, the presence of CaP coatings on metals promotes an early osseointegration of implants with a direct bone bonding as compared to non-coated surfaces. The challenge is to produce CaP coatings that would dissolve at a similar rate than bone apposition in order to get a direct bone contact on implant surfaces.

This chapter reviews the different steps of the interactions between biological fluids, cells, tissues and surfaces of implants. Recent nanoscale surface modifications and calcium phosphate coating technologies of dental implants are

discussed. The sequence of biological events in relation to surface properties is related. Mechanisms of interaction with blood, platelets, hematopoietic and mesenchymal stem cells on the surface of implants are described. These early events have shown to condition the adhesion, proliferation and differentiation of cells as well as the osseointegration of implants. Future implant surfaces may improve the tissue-integrative properties and long-term clinical success for the benefits of patients.

### 3.2 Nanoscale surface modifications

Surfaces properties play a determinant role in biological interactions. In particular, the nanometer sized roughness and the chemistry have a key role in the interactions of surfaces with proteins and cells. These early interactions will in turn condition the late tissue integration. In this prospect, different methods have been reported for enhancing bone healing around metal implant<sup>2,6</sup>.

Modifying surface roughness has been shown to enhance the bone to implant contact and improve their clinical performance<sup>7,2</sup>. Grid-blasting, anodisation, acid etching, chemical grafting and ionic implantation were the most commonly used methods for modifying surface roughness of metal implants. Combinations of these techniques could be used such as acid-etching after grit-blasting in order to eliminate the contamination by blasting residues on implant surfaces. This grit blasting residue may interfere with the osteointegration of the titanium dental implants<sup>8,9,10</sup>. It has been shown that grit-blasting with biphasic calcium phosphate (BCP) ceramic particles gave a high average surface roughness and particle-free surfaces after acid etching of titanium implants. Studies conducted both *in vitro* and *in vivo* have shown that BCP grit blasted surfaces promoted an early osteoblast differentiation and bone apposition as compared to mirror-polished or alumina grit-blasted titanium<sup>11,12</sup>. Anodization is a method commonly used

to obtain nanoscale oxides on metals including titanium<sup>13,14</sup>. By adjusting the anodization condition such as voltage, time and shaking, nanoscale properties could be controlled. Shankar et al<sup>15</sup> have reported that the diameters of the nanotubes could be modified to a range from 20 to 150 nm in modifying voltage conditions. On the other hand, Kang et al<sup>16</sup> found that TiO<sub>2</sub> nanotube arrays were more uniform on electro-polished than machined titanium. Moreover, TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti improved the production of alkaline phosphatase (ALP) activity by osteoblastic cells. In particular, nanotubes with a diameter of 100 nm up-regulated level of ALP activity as compared to 30–70 nm diameter nanotube surfaces<sup>17</sup>. Since ALP is a marker of osteogenic differentiation, these surfaces may demonstrate enhanced bone tissue integrative properties.

Another approach for improving osseointegration of dental implants is to apply a CaP coating having osteoconductive properties<sup>18,19,20</sup>. Different methods have been developed to coat metal implants with CaP layers such as plasma spraying, biomimetic and electrophoretic deposition. Nevertheless, plasma-sprayed HA coated dental implants have been related to clinical failures due to coating delimitation and heterogeneous dissolution rate of deposited phases. An electrochemical process which consists of depositing calcium phosphate crystals from supersaturated solutions has been proposed for coating titanium implants with calcium phosphate layers<sup>21,22</sup>. Upon implantation, these CaP coatings dissolve and release Ca<sup>2+</sup> and HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> increasing saturation of blood in the peri implant region. This dissolution led to the precipitation of biological apatite nanocrystals with the incorporation of various proteins. This biological apatite layer will promote cell adhesion, differentiation into osteoblast and the synthesis of mineralized collagen, the extracellular matrix of bone tissue. In addition to dissolution, osteoclast cells are also able to resorb the CaP coatings and

activate osteoblast cells to produce bone tissue. As the result, these CaP coatings promote a direct bone-implant contact without an intervening connective tissue layer leading to a proper biomechanical fixation of dental implants.

### **3.3 Interactions of surface dental implants with blood**

During surgery, blood vessels are injured and thus, dental implant surfaces interact with blood components (Figure 3). Various plasma proteins get adsorbed on the material surface within a minute. Platelets from blood interact also with the implant surface. Plasma proteins modified the surface while activated platelets are responsible of thrombus formation and blood clotting. Subsequently, the migrations of various cell types interact with the surface through membrane integrin receptors. These early events occur prior to peri implant tissue healing. Plasma contains dissolved substances such as glucose, amino acids, cholesterol, hormones, urea and various ions (Figure 3.4). Most of these components are needed for the viability of cells and tissues. All of these blood substances could interact with implant surface thus modifying their chemical properties like charge or hydrophobicity.

Blood interactions with implants lead to protein adsorption, which is dependent on the surface properties of the material and occurs through a complex series of adsorption and displacement steps known as the Vroman effect<sup>23</sup>. A hydrophile surface is better for blood coagulation than a hydrophobic surface. Consequently, dental implants manufacturers have developed high hydrophilic and rough implant surfaces which in turn exhibited better osseointegration than conventional ones<sup>24</sup>. Adsorption of proteins such as fibronectin, vitronectin on surface of dental implants could promote cell adhesion by

cell-binding RGD domain (arg-gly-asp). This RGD sequence interacts with integrin present on the cell membrane<sup>25</sup>. Interactions between cell membrane integrins and proteins coated onto implant surface play a key role in adhesion of many cells types. After proteins absorption, the osteointegration is characterized by platelets adhesion and fibrin clots formation at the injured blood vessels site. It has been shown that implants in contact with platelet-rich plasma (PRP) with a platelet concentration of approximately 1,000,000 protein/ $\mu$ l have a positive effect on osteointegration. At lower concentrations of PRP, the effect was not optimal, while higher concentrations resulted in a paradoxically inhibitory effect of bone regeneration. Other studies were not in agreement with this PRP beneficial effect on the osseointegration of dental implants<sup>26</sup>. The assessment of bio activity of surface treated dental implants should be tested *in vitro* using biological fluids containing blood components<sup>2</sup>.

### 3.4 Interactions between surfaces and mesenchymal stem cells

Following blood clotting around dental implants, several cells interact with surfaces for tissue healing. Mesenchymal stem cells (MSCs) attracted to the injured site by chemotactic factors have a determinant role in peri implant tissue healing.

#### 4.1 Origin of mesenchymal stem cells

Mesenchymal [stem](#) cells (MSCs) are stem cells derived from somatic tissue which can be differentiated into mesenchymal lineages such bone, cartilage, fat and skin. In addition, MSCs are present in many conjonctive tissues and blood at low concentrations serving as a sort of internal repair system. Mesenchymal stem cells are distinguished from other cell types by two important characteristics. First, they are

unspecialized cells able to renew themselves through cell division, sometimes after long periods of inactivity. Second, under certain physiologic or experimental conditions, they can be induced to become tissue- or organ-specific cells with special functions. MSCs have high proliferative and multi potent capacity leading to differentiated cells under the guidance of various cues or niches. MSCs are conventionally defined as adherent, non-hematopoietic cells expressing markers such as CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, and CD166, and being negative for CD14, CD34, and CD45<sup>27,28</sup>. While originally identified in the bone marrow<sup>29</sup>. MSC have been extracted from numerous tissues including adipose<sup>30,31</sup>, heart<sup>32</sup>, dental pulp<sup>33</sup>, peripheral blood<sup>34</sup>, cord blood<sup>35</sup>. One of the major properties of MSCs is their ability to differentiate into various cells like adipocytes<sup>36</sup>, chondrocytes<sup>30</sup>, osteoblasts<sup>37</sup>, neurons<sup>38,39</sup>, muscles<sup>40,39</sup>, hepatocytes<sup>41</sup> *in vitro* after treatment with induction agents.

### 4.2 Migration, adhesion and proliferation

The integration of implant with neighboring bone and gingival tissue depends on successful crosstalk between old tissue and implant surface. The challenge in dental implant research is the capability of the surface to guide cells colonization and differentiation. Cell migration, adhesion and proliferation on implant surfaces are a prerequisite to initiate the tissue regeneration (Figure 5). Authors have shown that some factors present in tissues and secreted during the inflammatory phase are able to attract MSCs to the injured site<sup>42,43</sup>. MSCs migration and proliferation were stimulated *in vitro* by many growth factors including PDGF<sup>44,45</sup>, EGF<sup>45,46</sup>, VEGF<sup>47</sup>, TGF- $\beta$ <sup>44,48</sup>, BMP-2 and BMP-4<sup>44,47</sup>, etc. These factors are certainly released in the injured sites by cells involved in tissue healing. Furthermore, plasma clot serve as

storage to fibrin molecules and release system for a variety of bioactive factors including growth factors that attract and differentiate MSCs into specific lineages<sup>49,50,51</sup>. The platelet factors are well-known to stimulate the proliferation of MSCs<sup>52</sup>. The formation of a clot matrix with a potent chemo-attractive factor like PDGF, EGF or fibrin may further enhance MSCs numbers and peri implant tissue healing surface. Moreover, the plasma clot in contact with implant surface represents a three-dimensional microporous structure that allows diffusion of regulatory factors<sup>53,54</sup> and is involved in the migration, proliferation and differentiation of MSCs. After MSC recruitment in the injured site, cells adhere on the local extracellular matrix as well as on the implant surface beginning an extensive proliferation in order to build up new tissue. Again, surface modifications of implants in the nanometer range condition the biological responses.

#### 4.3 Differentiation

In the microenvironment, MSCs are stimulated by some specific factors to differentiate into the adequate cell line. Under the influence of these factors, MSCs switch to osteoblastic cells in contact to bone tissue while they differentiate into fibroblastic lineage in the gingival tissue region. These two differentiation pathways are in concurrence around dental implants. In some cases, implants are encapsulated by fibrous tissue due to the proliferation and differentiation of MSCs into fibroblastic cells. In response to cytokine, fibroblasts migrate and generate a capsule of collagen, the first step in generation of gingival tissue or rejection on contact to bone. This fibrous capsule prevents bonding between implant surface and juxtaposed bone and caused a failure of the implant<sup>55</sup>. On the other hand, both the differentiation of MSCs into fibroblastic lineage and the fibroblastic adhesion are desired in the gingival upper part of dental

implants. Fibroblasts adhesion has been shown to be lower on nanoscale surface compared to conventional surfaces<sup>56</sup>. Moreover, nanometer size features have been shown to decrease fibroblast adhesion and proliferation<sup>57,58</sup>. The micro and nanoscale surface properties of metal implant including chemistry, roughness, wettability, could affect bone formation<sup>59</sup>. Numerous treatment such as machining, grit-blasting, Ti/HA plasma spray, chemical etching, anodization are available to modify the implant surface. Research has specifically demonstrated that nanorough Ti<sup>60</sup> and nanostructured Ti can enhance osteoblast adhesion and differentiation compared to their nano-smooth control<sup>61</sup>. Furthermore, surface with micro- and nanopores have shown to enhance greatly osseointegration<sup>62,63</sup>. Surface properties may control the steps of adhesion, proliferation and differentiation of MSCs and thus, condition tissue integration.

#### 3.5 Tissue integration

Branemark et al<sup>64</sup> described the osseointegration as a direct structural and functional bone to implant contact under load. As previously discussed, the biological events occurring at the tissue-implant interface are influenced by the chemistry, topography and wettability of dental implant surfaces. The challenge in developing new implant surface consist in increasing the clinical success rate as well as decreasing the tissue healing time for immediate loading of implants, particularly in aesthetic situations<sup>65,66,67</sup>. One of the objectives is to develop implant surface having predictable, controlled and guided tissue healing. For instance, surfaces that promote contact osteogenesis rather than distance osteogenesis would be desired in bony site while intimate fibrous tissue healing in gingival tissue (Figure 1). In order to enhance this intimate contact between tissues and implant, surface treatments at the nanometer scale have been performed on metal implants and

tested in various animal models. Implant surface with various roughnesses have been used to increase the total area available for osteo-apposition. Kubo et al<sup>65</sup> observed a substantial increase by 3.1 times in bone–titanium interfacial strength by Ti nanotube (300 nm) at 2 weeks of implantation in femur rats. These results suggest the establishment of nanostructured surfaces for improved osteoconductivity. Moreover, Ogawa T et al<sup>68</sup> have prepared Ti nanostructure by physical vapour deposition and tested their osseointegration in femur of rats. They found an increased surface area by up to 40 % and a greater strength of osseointegration for the nanostructured compared to an acid-etched surface. Some authors have correlated the initial events in bone formation adjacent to surface with the long term tissue response to these materials in humans<sup>69,70</sup>.

By mimicking the chemical composition of natural bone, hydroxyapatite and CaP coatings on Ti greatly enhance osteointegration. As shown in Figure 6, a greater direct bone apposition was observed on CaP coated than on bare Ti implants. During the bone healing process, calcium and phosphate ions are released from the CaP coating in the peri-implant region and saturate body fluids to precipitate a biological apatite, which serves as a substrate for osteoblastic cells producing bone tissue. Several authors have shown the benefit of using CaP-coated titanium implants for improving the osteointegration<sup>71,72</sup>. In particular, Le guehennec et al<sup>20</sup> have studied the osteointegration of four implant surfaces in the femoral epiphyses of rabbits after 2 and 8 weeks of healing. In this study, the bone-implant contact and bone growth inside the chambers were compared for four different implant surfaces and shown that biomimetic coating method may enhance the bone apposition onto titanium. In order to prevent coating delamination and implant loosening, the CaP coating should

dissolve or degrade under osteoclastic activity at a similar rate than bone apposition. The final result should be a direct bone-implant coating without the presence of fibrous tissue. Another advantage of these CaP coatings is related to their preparation by biomimetic methods at physiological temperature and pH from simulated body fluids. CaP crystals have characteristics that resemble bone mineral in term of size and composition. Furthermore, it is possible to incorporate biologically active drugs such as antibiotics or growth factors during the precipitation of CaP coatings on Ti implants<sup>73</sup>. These molecules could be locally and gradually released in the peri implant region for either preventing bacterial infections or stimulating bone growth.

### **3.6. Conclusion**

Many reports have shown that nanometer controlled surfaces have a great effect on early events such as the adsorption of proteins, blood clot formation and cell behaviours occurring upon implantation of dental implants. These early events have an effective impact on the migration, adhesion and differentiation of MSCs. Nanostructured surfaces may control the differentiation pathways into specific lineages and ultimately direct the nature of peri-implant tissues. Despite an active research in dental implants, the ideal surface for predictive tissue integration remains a challenge.

### **Acknowledgments**

The authors are grateful to Jean-Charles Ricquier and Julie Rozé for contribution in figures preparation. We acknowledge the pharmaceutical company SERVIER for using some drawings taken from their website.

## Reference

1. Rozé J, Babu S, Saffarzadeh A, Gayet-Delacroix M, Hoornaert A, Layrolle P. Correlating implant stability to bone structure. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Oct;20(10):1140-1145.
2. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater.* 2007 Jul;23(7):844-854.
3. Lavenus S, Ricquier J, Louarn G, Layrolle P. Cell interaction with nanopatterned surface of implants. *Nanomedicine (Lond).* 2010 Aoû;5(6):937-947.
4. Geesink RGT. Osteoconductive coatings for total joint arthroplasty. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2002 Fév;(395):53-65.
5. Leeuwenburgh S, Layrolle P, Barrère F, de Bruijn J, Schoonman J, van Blitterswijk CA, et al. Osteoclastic resorption of biomimetic calcium phosphate coatings in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001 Aoû;56(2):208-215.
6. Geesink RG, de Groot K, Klein CP. Chemical implant fixation using hydroxyl-apatite coatings. The development of a human total hip prosthesis for chemical fixation to bone using hydroxyl-apatite coatings on titanium substrates. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1987 Déc;(225):147-170.
7. Shalabi MM, Wolke JGC, Jansen JA. The effects of implant surface roughness and surgical technique on implant fixation in an in vitro model. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Avr;17(2):172-178.
8. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur. J. Oral Sci.* 1998 Fév;106(1):527-551.
9. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur. J. Oral Sci.* 1998 Jun;106(3):721-764.
10. Müeller W, Gross U, Fritz T, Voigt C, Fischer P, Berger G, et al. Evaluation of the interface between bone and titanium surfaces being blasted by aluminium oxide or bioceramic particles. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Jun;14(3):349-356.
11. Le Guehennec L, h, h. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomater.* 2008;4(3):535-543.
12. Citeau A, Guicheux J, Vinatier C, Layrolle P, Nguyen TP, Pilet P, et al. In vitro biological effects of titanium rough surface obtained by calcium phosphate grid blasting. *Biomaterials.* 2005 Jan;26(2):157-165.
13. Oh S, Brammer KS, Li YSJ, Teng D, Engler AJ, Chien S, et al. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009 Fév 17;106(7):2130-2135.
14. Zhang L, Han Y. Effect of nanostructured titanium on anodization growth of self-organized TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Nanotechnology.* 2010 Fév 5;21(5):55602.
15. Shankar K, Mor G, Prakasam H, Yoriya S, Paulose, Varghese, et al. Highly-ordered TiO<sub>2</sub> nanotube arrays up to 220µm in length: use in water photoelectrolysis and dye-sensitized solar cells. 2007;
16. Kang SH, Kim HS, Kim J, Sung Y. An investigation on electron behavior employing vertically-aligned TiO<sub>2</sub> nanotube electrodes for dye-sensitized solar cells. *Nanotechnology.* 2009 Sep 2;20(35):355307.
17. Brammer KS, Oh S, Cobb CJ, Bjursten LM, van der Heyde H, Jin S. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO<sub>2</sub>(2) nanotube surface. *Acta Biomater.* 2009 Oct;5(8):3215-3223.
18. Geurs NC, Jeffcoat RL, McGlumphy EA, Reddy MS, Jeffcoat MK. Influence of implant geometry and surface characteristics on progressive osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002 Déc;17(6):811-815.
19. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ.* 2003 Aoû;67(8):932-949.
20. Le Guehennec L, Goyenvalle E, Lopez-Heredia M, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. Histomorphometric analysis of the osseointegration of four different implant surfaces in the femoral epiphyses of rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Nov;19(11):1103-1110.
21. Lopez-Heredia MA, Weiss P, Layrolle P. An electrodeposition method of calcium phosphate coatings on titanium alloy. *J Mater Sci Mater Med.* 2007 Fév;18(2):381-390.
22. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2002 Fév;(395):81-98.
23. Miller, Guo Z, Vogler EA, Siedlecki CA. Plasma coagulation response to surfaces with nanoscale chemical heterogeneity. *Biomaterials.* 2006 Jan;27(2):208-215.
24. Sawase T, Jimbo R, Baba K, Shibata Y, Ikeda T, Atsuta M. Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(5):491-496.
25. Balasundaram G, Sato M, Webster TJ. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials.* 2006 Mai;27(14):2798-2805.
26. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 2004 Avr;34(4):665-671.

27. Richter W. Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. *J. Intern. Med.* 2009 Oct;266(4):390-405.
28. Ichim TE, Alexandrescu DT, Solano F, Lara F, Campion RDN, Paris E, et al. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell. Immunol.* 2010;260(2):75-82.
29. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6(2):230-247.
30. Zannettino ACW, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, et al. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J. Cell. Physiol.* 2008;214(2):413-421.
31. Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2003 Jul;(412):196-212.
32. Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AMA, Van Osch GJVM, Balk AHMM, Ijzermans JNM, et al. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Dev.* 2007 Apr;16(4):597-604.
33. Jo Y, Lee H, Kook S, Choung H, Park J, Chung J, et al. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng.* 2007 Apr;13(4):767-773.
34. He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells.* 2007 Jan;25(1):69-77.
35. Oh W, Kim D, Yang YS, Lee JK. Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Cell. Immunol.* 2008 Fév;251(2):116-123.
36. Morganstein DL, Wu P, Mane MR, Fisk NM, White R, Parker MG. Human fetal mesenchymal stem cells differentiate into brown and white adipocytes: a role for ERRalpha in human UCP1 expression. *Cell Res.* 2010;20(4):434-444.
37. Marinucci L, Balloni S, Becchetti E, Bistoni G, Calvi EM, Lumare E, et al. Effects of Hydroxyapatite and Biostite((R)) on Osteogenic Induction of hMSC. *Ann Biomed Eng.* 2010;38(3):640-648.
38. Lepski G, Jannes CE, Maciaczyk J, Papazoglou A, Mehlhorn AT, Kaiser S, et al. Limited Ca<sup>2+</sup> and PKA-pathway dependent neurogenic differentiation of human adult mesenchymal stem cells as compared to fetal neuronal stem cells. *Exp. Cell Res.* 2010 Jan 15;316(2):216-231.
39. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 2006;126(4):677-689.
40. Liu Y, Yan X, Sun Z, Chen B, Han Q, Li J, et al. Flk-1<sup>+</sup> adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in mdx mice. *Stem Cells Dev.* 2007;16(5):695-706.
41. Chivu M, Dima SO, Stancu CI, Dobrea C, Uscatescu V, Necula LG, et al. In vitro hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells under differential exposure to liver-specific factors. *Transl Res.* 2009;154(3):122-132.
42. Agis H, Kandler B, Fischer MB, Watzek G, Gruber R. Activated platelets increase fibrinolysis of mesenchymal progenitor cells. *J. Orthop. Res.* 2009 Jul;27(7):972-980.
43. Vogel JP, Szalay K, Geiger F, Kramer M, Richter W, Kasten P. Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. *Platelets.* 2006 Nov;17(7):462-469.
44. Mishima Y, Lotz M. Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 2008 Oct;26(10):1407-1412.
45. Ozaki Y, Nishimura M, Sekiya K, Suehiro F, Kanawa M, Nikawa H, et al. Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007 Fév;16(1):119-129.
46. Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br. J. Haematol.* 1997 Jun;97(3):561-570.
47. Fiedler J, Leucht F, Waltenberger J, Dehio C, Brenner RE. VEGF-A and PlGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005 Aoû 26;334(2):561-568.
48. Jian H, Shen X, Liu I, Semenov M, He X, Wang X. Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF-beta1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes Dev.* 2006 Mar 15;20(6):666-674.
49. Catelas I, Dwyer JF, Helgerson S. Controlled release of bioactive transforming growth factor beta-1 from fibrin gels in vitro. *Tissue Eng Part C Methods.* 2008 Jun;14(2):119-128.
50. Wong C, Inman E, Spaethe R, Helgerson S. Fibrin-based biomaterials to deliver human growth factors. *Thromb. Haemost.* 2003 Mar;89(3):573-582.
51. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J. Thromb. Haemost.* 2005 Aoû;3(8):1894-1904.

52. Rock G, Neurath D, Lu M, Alharbi A, Freedman M. The contribution of platelets in the production of cryoprecipitates for use in a fibrin glue. *Vox Sang.* 2006 Oct;91(3):252-255.
53. Catelas I, Sese N, Wu BM, Dunn JCY, Helgerson S, Tawil B. Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. *Tissue Eng.* 2006;12(8):2385-2396.
54. Schildhauer T, Seybold D, Gebmann J, Muhr G, Koller M. Fixation of porous calcium phosphate with expanded bone marrow cells using an autologous plasma clot. *mater sci eng technol.* 2007;:1012-1014.
55. Hobkirk JA. Progress in implant research. *Int Dent J.* 1983 Déc;33(4):341-349.
56. Eisenbarth E, Meyle J, Nachtigall W, Breme J. Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts. *Biomaterials.* 1996 Jul;17(14):1399-1403.
57. Cohen A, Liu-Synder P, Storey D, Webster T. Decreased fibroblast and increased osteoblast functions on ionic plasma deposited nanostructured Ti coatings. 2007;:385-390.
58. Miller D, Vance R, Thapa A, Webster T, Haberstroch K. Comparison of fibroblast and vascular cell adhesion to nano structured poly(lactic co glycolic acid) films. *Applied Bionics and biochemics.* 2005;:1-7.
59. Streicher RM, Schmidt M, Fiorito S. Nanosurfaces and nanostructures for artificial orthopedic implants. *Nanomedicine (Lond).* 2007 Déc;2(6):861-874.
60. Puckett S, Pareta R, Webster TJ. Nano rough micron patterned titanium for directing osteoblast morphology and adhesion. *Int J Nanomedicine.* 2008;3(2):229-241.
61. Yao C, Slamovich EB, Webster TJ. Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures. *J Biomed Mater Res A.* 2008;85(1):157-166.
62. Frosch K, Barvencik F, Viereck V, Lohmann CH, Dresing K, Breme J, et al. Growth behavior, matrix production, and gene expression of human osteoblasts in defined cylindrical titanium channels. *J Biomed Mater Res A.* 2004 Fév 1;68(2):325-334.
63. Oh, Finões RR, Daraio C, Chen L, Jin S. Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes. *Biomaterials.* 2005 Aoû;26(24):4938-4943.
64. Brånemark PI, Adell R, Albrektsson T, Lekholm U, Lundkvist S, Rockler B. Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. *Biomaterials.* 1983 Jan;4(1):25-28.
65. Kubo K, Tsukimura N, Iwasa F, Ueno T, Saruwatari L, Aita H, et al. Cellular behavior on TiO<sub>2</sub> nanonodular structures in a micro-to-nanoscale hierarchy model. *Biomaterials.* 2009 Oct;30(29):5319-5329.
66. LeGeros RZ, Craig RG. Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. *J. Bone Miner. Res.* 1993 Déc;8 Suppl 2:S583-596.
67. Pilliar RM. Cementless implant fixation--toward improved reliability. *Orthop. Clin. North Am.* 2005 Jan;36(1):113-119.
68. Ogawa T, Saruwatari L, Takeuchi K, Aita H, Ohno N. Ti nano-nodular structuring for bone integration and regeneration. *J Dent Res.* 2008;:751-756.
69. Boyan BD, Schwartz Z, Hambleton JC. Response of bone and cartilage cells to biomaterials in vivo and in vitro. *J Oral Implantol.* 1993;19(2):116-122; discussion 136-137.
70. Kohavi D, Schwartz Z, Amir D, Mai CM, Gross U, Sela J. Effect of titanium implants on primary mineralization following 6 and 14 days of rat tibial healing. *Biomaterials.* 1992;13(4):255-260.
71. Jeffcoat MK, McGlumphy EA, Reddy MS, Geurs NC, Proskin HM. A comparison of hydroxyapatite (HA) - coated threaded, HA-coated cylindrical, and titanium threaded endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003 Jun;18(3):406-410.
72. McGlumphy EA, Peterson LJ, Larsen PE, Jeffcoat MK. Prospective study of 429 hydroxyapatite-coated cylindrical omniloc implants placed in 121 patients. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003 Fév;18(1):82-92.
73. Liu Y, de Groot K, Hunziker EB. BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. *Bone.* 2005 Mai;36(5):745-757.

## Figure caption

**Figure 1 :** Tissue integration of dental implant. Note the intimate contact with gingival tissue in the upper part and the desired contact osteogenesis in the tapered lower part rather than distance osteogenesis.

**Figure 2 :** Scanning electron micrographs and Energy dispersive analysis for X-ray of (a) nanostructured titanium surface obtained by anodization and (b) nanosized thin calcium phosphate (CaP) coating on titanium produced by electrochemical deposition. Note the regular array of TiO<sub>2</sub> nanopores of approximately 100 nm in diameter and the nanosized CaP crystals on titanium surfaces.

**Figure 3 :** Interactions of surface of dental implants with blood. Note the numerous proteins, red blood cells and activated platelets that lead to blood clotting on implants.

**Figure 4 :** Scheme showing blood composition and components that primary interact with surface of dental implants.

**Figure 5 :** Scheme the adhesion, proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells on nanostructured surfaces. The adhesion of stem cells is characterized by the expression of cell surface markers (VCAM, ITG, THY1) while phenotypic markers (Runx2, ALP, OCN, OPN) are specific to their osteoblastic differentiation. (OCN: osteocalcin; OPN: osteopontin).

**Figure 6:** Micrographs showing the osteointegration of bare titanium (Ti) and calcium phosphate (CaP) coated implants after implantation in femoral condyles of rabbits for 4 weeks. Note the direct bone apposition on CaP coated implants (arrows) on both histology (basic fushine, toluidine blue staining) and back-scattered electron microscopy (BSEM) images.

Figure n°1

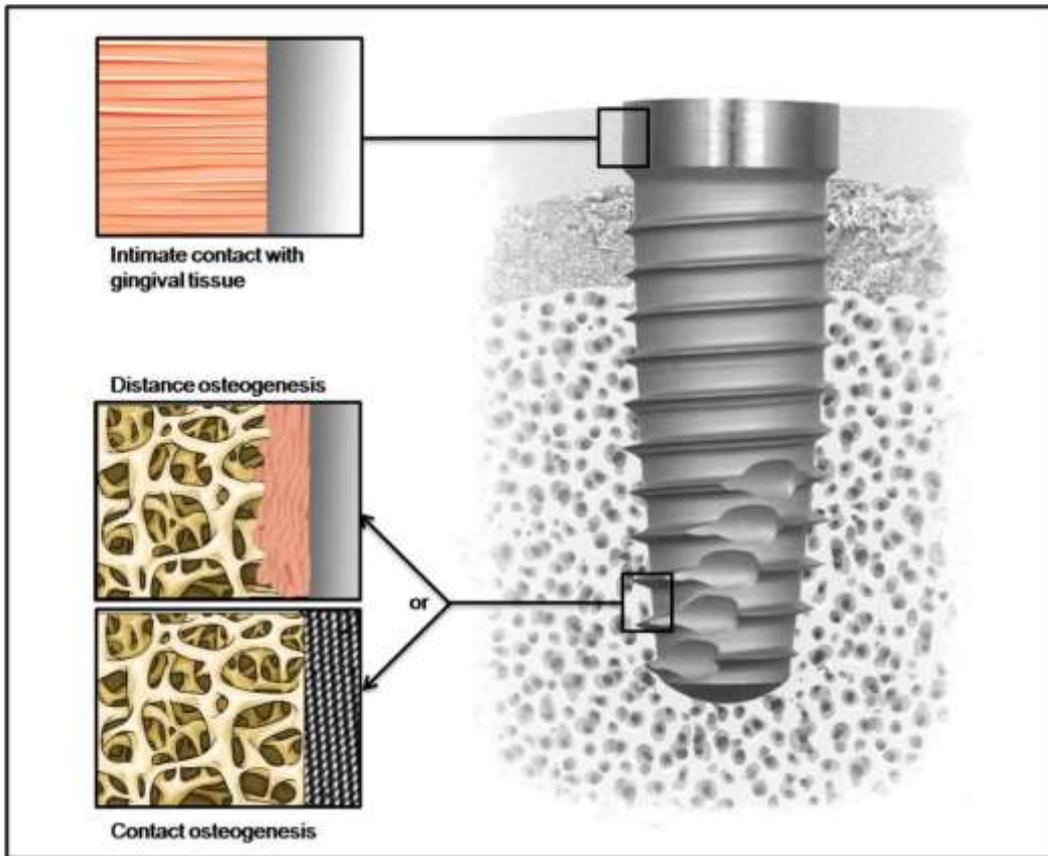


Figure n°2

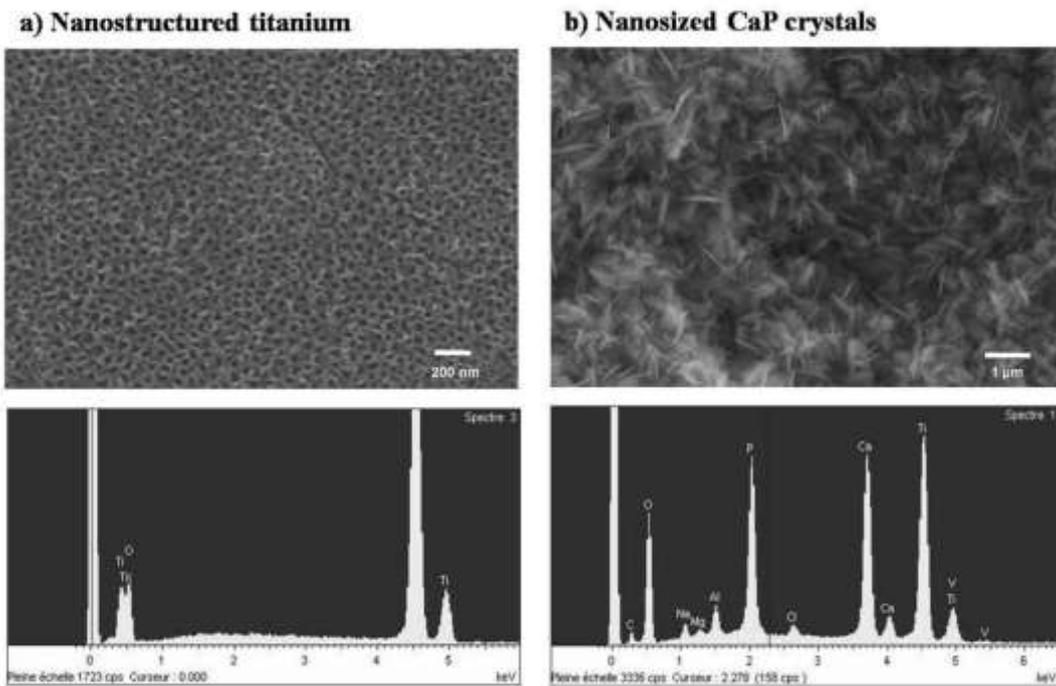


Figure n°3

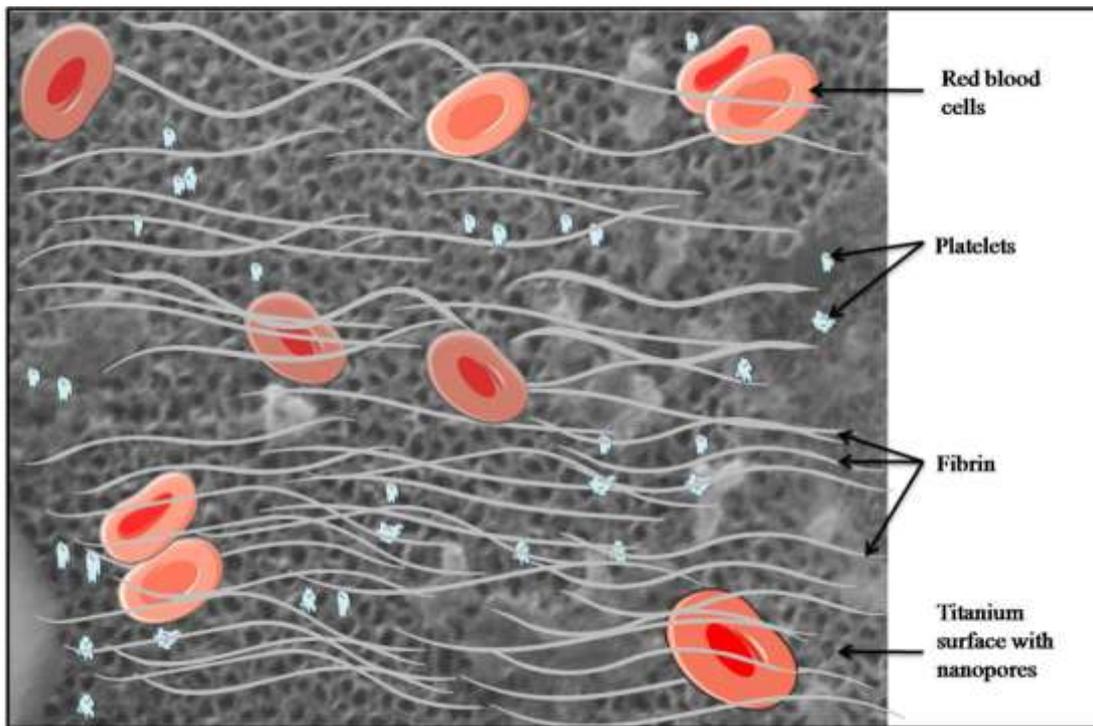


Figure n°4

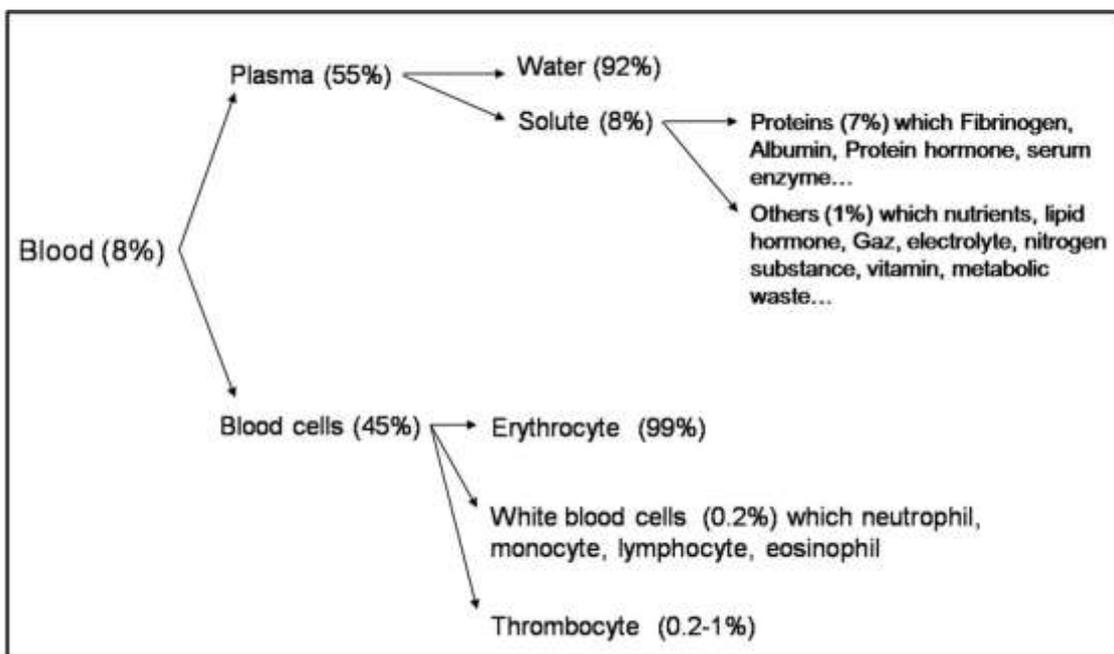


Figure n°5

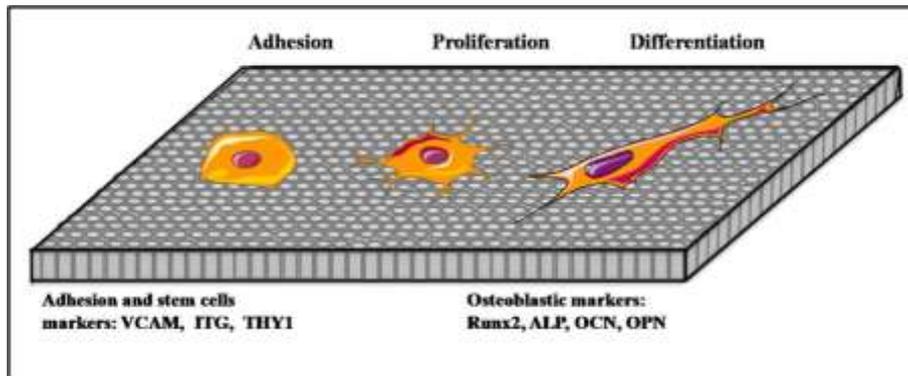
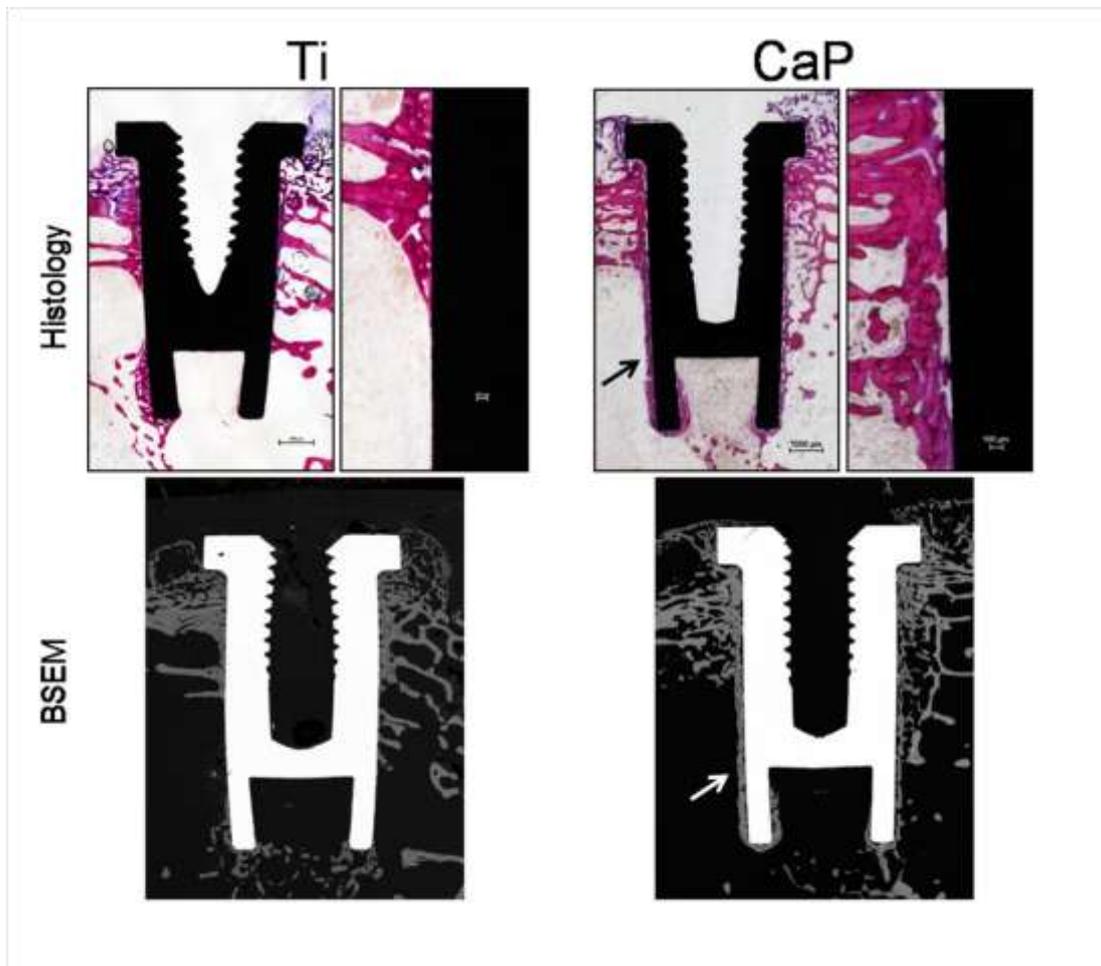


Figure n°6



## XI. Conclusion

La nanostructuration des surfaces est d'un intérêt considérable dans la recherche implantaire mais les mécanismes mis en jeu dans l'adsorption protéique, l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire, ainsi que l'intégration tissulaire, restent mal connus. De nombreuses études ont montré que les surfaces nanostructurées ont un effet bénéfique sur les événements précoces telles que l'adsorption protéiques, la formation du caillot sanguins et le comportement cellulaire après l'implantation des prothèses dentaires ce qui va avoir un impact sur la migration, l'adhésion et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. Les surfaces nanostructurées peuvent probablement contrôler la différenciation cellulaire vers une lignée spécifique et par conséquent, la nature du tissu péri-implantaire. Malgré des recherches actives en implantologies, la surface idéale pour prédire l'intégration tissulaire reste un challenge.

## **Chapitre II :**

### **Matériels et méthodes**

## **I. Les matériaux**

### **1. Le titane**

Une barre de Titane (Grade 2, ALTA Industries SARL, Arnage, France) a été usinée en disques de 14 mm de diamètre et d'un millimètre d'épaisseur. Les pastilles de titane sont polies à l'aide d'une polisseuse (Metaserv 2000, Buehler, France). Des papiers abrasifs ayant des tailles de grains différents (800, 1200, 2400, 4000) sont successivement utilisés. Une rotation d'un quart de tour est effectuée entre chaque taille de grains afin d'obtenir une surface polie finement. La dernière étape du polissage se fait avec une poudre de diamant donnant une surface polie miroir.

Les pastilles de titane ainsi traitées sont nettoyées dans des bains successifs d'acétone, d'alcool 70 % et d'eau distillée puis séchées dans une étuve à 60 °C. La stérilisation de ces surfaces est réalisée à l'autoclave à 121 °C pendant 20 minutes dans des sachets individuels.

### **2. Les pastilles de verre**

Les surfaces de verres sont des pastilles couvre-objet rondes de 14 mm de diamètre (VWR). Les pastilles de verre sont dégraissées dans un bain d'acétone, puis nettoyées dans un bain d'alcool 70 % avant d'être rincées à l'eau distillée et séchées dans une étuve à 60 °C. Les pastilles de verre sont autoclavées à 121 °C pendant 20 minutes.

### **3. Les membranes nanoporeuses**

Des membranes de polycarbonate comportant des nanopores pour la filtration ont été utilisées. Les membranes de 50 nm sont fournies par Costar. Les membranes de 200 et 400 nm sont fournies par Whatman. Les membranes sont découpées à l'emporte pièce en cercle de 14 mm de diamètre, dans le but de les déposer au fond de boîtes 24 puits.

### **4. Revêtement de titane sur les membranes nanoporeuses**

Les membranes de polycarbonate sont recouvertes par une fine couche de titane. Ce revêtement de titane est obtenu par évaporation dans une enceinte sous vide (Figure n°16). Les échantillons sont placés dans une enceinte au dessus d'un masque (shutter) permettant de contrôler l'épaisseur du dépôt. Du titane de grade 2 est placé dans un creuset et l'enceinte est mise sous vide. Un courant électrique traversant le creuset permet une fusion du titane jusqu'à évaporation de celui-ci. Après plusieurs minutes d'évaporation, le shutter est ouvert

permettant un dépôt d'épaisseur contrôlée sur les échantillons. L'épaisseur est donnée par une balance à quartz placée près du creuset et vérifiée sur 3 échantillons pris de manière aléatoire au cours de 3 évaporations différentes. Le shutter est fermé et le vide cassé afin de récupérer les échantillons.

Une fois recouvert de titane, les membranes de polycarbonate sont nettoyées dans des bains successifs d'alcool 70 % et d'eau puis séchées dans une étuve à 37 °C. Les échantillons sont ensuite placés dans une boîte de pétri entre 2 compresses stériles et stérilisés à l'oxyde d'éthylène.

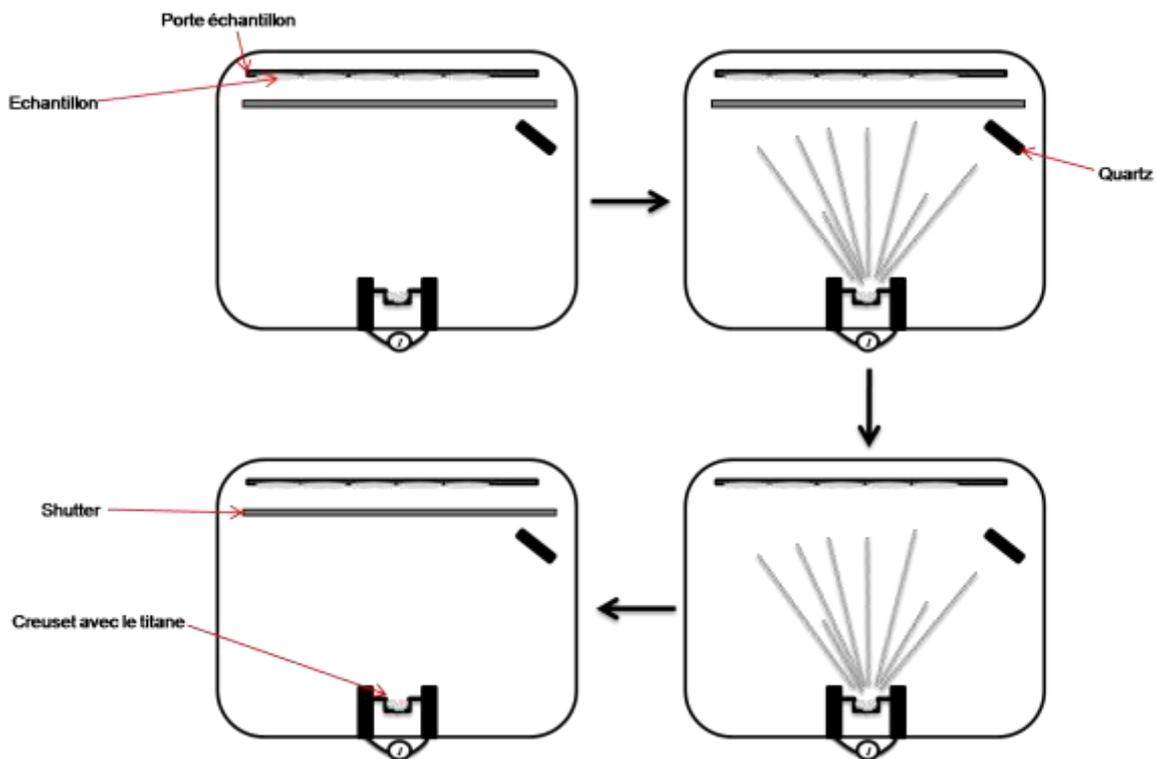
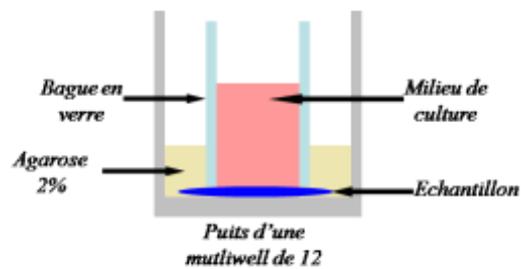


Figure 16 : Schéma de principe de la métallisation par dépôts physique en phase vapeur (PVD) des membranes de polycarbonate nanoporeuses et les pastilles de verre par du titane.

## 5. Préparation des anneaux de verre

Nous utilisons des cylindres de verre de 14,1 mm de diamètre interne pour maintenir les membranes de polycarbonate au fond des puits comme indiqué sur la figure n°17. Ces cylindres ont un diamètre externe de 18 mm et une hauteur de 15 mm afin de pouvoir tenir dans une plaque 12 puits en gardant une surface de travail de 2 cm<sup>2</sup>.



**Figure 17 : Représentation schématique de l'immobilisation des membranes de polycarbonate au fond des puits avec un cylindre de verre**

Les anneaux de verre sont lavés pendant 10 minutes dans un bain d'acétone puis d'éthanol 70 % avant d'être rincés à l'eau distillée. Les cylindres sont ensuite séchés dans une étuve à 60 °C avant d'être autoclavés à 121 °C pendant 20 minutes. Lors du montage du système, les cylindres de verre stériles vont maintenir les membranes qui seront immobilisées par 200 µl d'agarose déposés entre le cylindre et les parois du puits. Cette agarose à 2 % sera portée à ébullition dans un falcon 50 chauffé par micro-onde. Dès la surfusion atteinte, le falcon sera immédiatement fermé afin de garantir la stérilité.

## 6. Nanostructuration du titane par anodisation

Le protocole de préparation des nanostructures de titane par anodisation est similaire à celui décrit par Seughan Oh *et al* (S. Oh et al. 2009). L'anodisation est un traitement électrochimique d'une surface basé sur l'électrolyse de l'eau. Brièvement, les pores sont réalisés sur des pastilles de titane de grade 2 polies miroir comme précédemment décrit.

Un courant électrique est appliqué entre une électrode de platine servant de cathode et l'échantillon, l'anode (Figure n°18). Les pores sont formés sur la surface du titane dans une solution d'acide acétique (1 M) et d'acide fluorhydrique (0,5 % wt) à 5, 10 et 20V pendant 20 minutes afin d'obtenir différents diamètres de pores. L'acide fluorhydrique étant un composé très dangereux, toute manipulation de ce produit doit se faire obligatoirement sous hotte avec blouse, gants et lunettes. En cas de contact direct avec la peau, un antidote, le gluconate de calcium, doit être appliqué.

L'agitation a été optimisée pour chaque tension appliquée de manière à obtenir la surface la plus homogène possible. Elle sera de 550, 350 et 400 tours par minute, respectivement pour une tension de 5, 10 et 20 V. Une diminution rapide du courant (passage de 0,2 A à environ

0,02 A) est observée correspondant à la formation de la couche compacte (barrière) [E. Darque-Ceretti et V. Grand-Clément, J. Phys. IV France 10, 2000.].

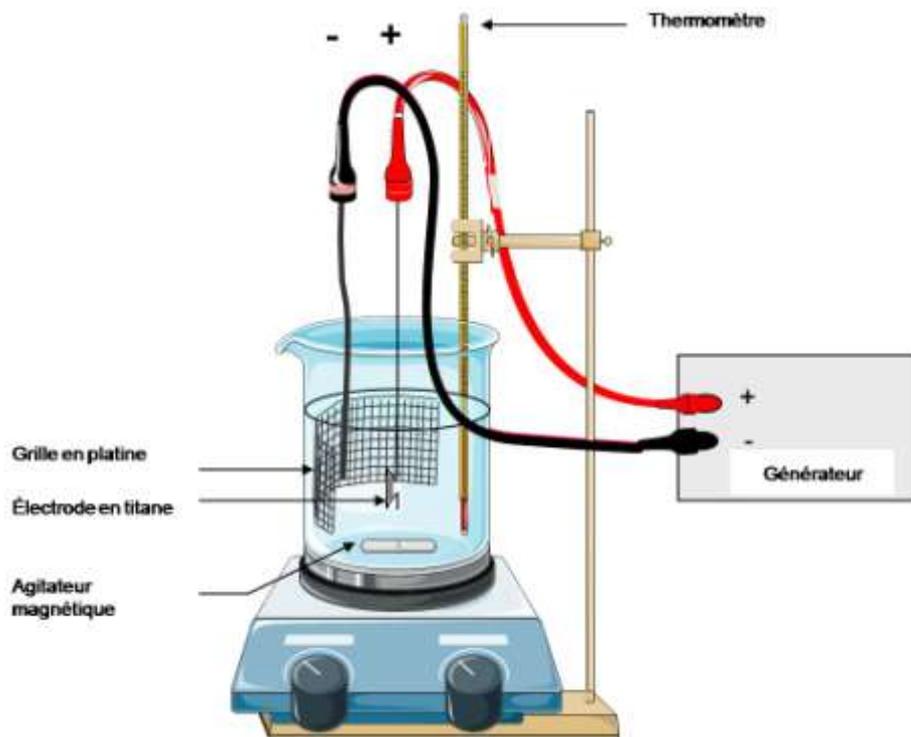


Figure 18: Schéma du montage de la technique d'anodisation

Les échantillons sont rapidement rincés avec de l'eau distillée puis séchés à 80 °C. Un traitement thermique à 500 °C pendant 2 heures permet de cristalliser la phase amorphe de l'oxyde de titane. Les échantillons sont successivement nettoyés à l'acétone, l'éthanol 70 % et l'eau distillée avant d'être autoclavés à 120 °C pendant 20 minutes en sachets individuels.

## II. Méthodes de caractérisation des matériaux

### 1. Microscopie électronique à balayage

#### a. Principe

Les différentes surfaces ont été caractérisées par microscopie électronique à balayage et par microscopie à force atomique.

La microscopie électronique à balayage (MEB) ou SEM pour Scanning Electron Microscopy en anglais), est une technique de microscopie basée sur le principe des interactions électrons-matière, capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon.

Un microscope électronique à balayage est essentiellement composé d'un canon à électrons et d'une colonne électronique, dont la fonction est de produire une sonde électronique fine sur l'échantillon, d'une platine porte-objet permettant de déplacer l'échantillon dans les trois directions et de détecteurs permettant de capter et d'analyser les rayonnements émis par l'échantillon. En outre, l'appareil doit nécessairement être équipé d'un système de pompes à vide. Les électrons émis par le canon viennent percuter l'échantillon produisant ainsi des interactions avec la matière. Ce dernier va alors émettre deux types d'électrons :

- Les électrons secondaires qui sont de faible énergie permettent de reproduire l'image,
- Les électrons rétrodiffusés, d'énergie élevée, permettent de distinguer les différences de densité électronique, donc la présence de différents matériaux.

### **b. Protocole**

Les différentes surfaces ont été métallisées avec une fine couche d'or-palladium. Les échantillons ont ensuite été placés dans l'enceinte du MEB (LEO 1640, Zeiss). Les observations ont porté sur la surface des différents substrats permettant d'observer la topographie de la surface. Les paramètres de travail sont un courant de sonde de 2 pA, une tension d'accélération de 15 kV et une distance de travail comprise entre 10 et 18 mm.

## **2. Microscopie à force atomique**

### **a. Principe**

La topographie de surface est caractérisée par microscopie à force atomique.

La microscopie à force atomique (AFM) repose sur la lecture de la surface grâce à une pointe réfléchissant la lumière. La position sur les photodiodes de la lumière indiquera la position de la pointe de l'AFM et donc de l'état de rugosité de la surface. Il faut donc régler la référence de la lumière au centre de la photodiode dès le début de la manipulation de manière à obtenir

$$- (A+B)-(C+D)=0$$

$$- (A+C)-(B+D)=0.$$

Puis on règle la netteté de la pointe avec celle de la surface.

Il est possible de travailler selon deux modes : - par contact,

- par tapping ou contact intermittent.

Dans notre cas, nous utiliserons le mode tapping car le contact direct avec l'échantillon dégrade les échantillons biologiques.

Une fois la pointe et l'échantillon en contact, c'est uniquement l'échantillon qui bougera entraînant ainsi une modification de la position dans l'espace de la pointe. Ce changement se répercute sur la photodiode. Un logiciel permet la conversion de la position du laser sur la photodiode en image et la reconstruction tridimensionnelle.

Les matériaux piézoélectriques se déforment selon x, y et z en fonction du champ électrique qui est appliqué.

#### **b. Protocole**

Les différentes surfaces ont été nettoyées à l'acétone puis à l'eau afin de retirer toutes les impuretés et séchées sous flux d'azote sec. Les échantillons ont ensuite été placés sur le porte objet dans l'enceinte de l'AFM. Les observations ont porté sur la surface des différents substrats permettant d'observer la topographie de la surface sur des carrés de 5  $\mu\text{m}$  de côté.

### **3. Analyse de la composition chimique**

#### **a. Principe**

L'analyse de la composition chimique sera réalisée par microsonde EDX et/ou spectroscopie de photoélectrons XPS.

Les analyses XPS permettent d'informer sur la composition chimique, la formulation empirique, chimique et l'état électronique. Pour cela, l'échantillon est irradié par des rayons X monochromatiques qui provoquent l'ionisation de ses atomes par effet photoélectrique. L'énergie cinétique de ces photoélectrons est mesurée, ce qui donne le spectre en intensité des électrons en fonction de l'énergie mesurée. L'énergie du photon X incident est de l'ordre de grandeur de l'énergie d'ionisation d'électrons de cœur. Leur émission donne le pic XPS essentiellement caractéristique de la nature de l'atome alors que l'information chimique est tirée des petits déplacements du pic XPS correspondant à la variation entre couches de valence, ce dernier est faible devant celle des rayons X.

On a finalement accès à la composition chimique de la surface du matériau analysé sur une profondeur de 10 nanomètres environ, par comparaison avec des spectres connus. Des analyses semi-quantitatives peuvent également être extraites des spectres XPS normalisés en se basant sur l'aire surface des pics.

### **b. Protocole**

Les différentes surfaces ont été nettoyées à l'acétone puis à l'eau afin de retirer toutes les impuretés et enfin séchées. Les échantillons ont ensuite été placés dans l'enceinte de l'XPS. Les observations ont porté sur la surface des différents substrats permettant d'observer la chimie de la surface.

## **4. La mesure de l'angle de contact**

### **a. Principe**

Les mesures d'angle de contact et d'énergie de surface ont été réalisées par la technique de la goutte posée. Le mouillage est une technique qui donne des informations sur les propriétés des toutes premières couches atomiques ou moléculaires d'une surface solide. Le principe de cette méthode consiste à mesurer l'angle fait par la tangente d'une goutte déposée sur le substrat avec la surface du substrat. Cette technique peut donner une information qualitative ou quantitative sur l'énergie de surface :

- En utilisant une goutte d'eau, on peut déduire le caractère hydrophobe (grand angle, faible énergie de surface) ou hydrophile (petit angle, grande énergie de surface) du substrat ;
- En utilisant plusieurs liquides différents, on peut calculer l'énergie libre de la surface et les composantes polaires ou apolaires de cette énergie, en utilisant, par exemple, le modèle d'Owens et Wendt (Owens et Wendt, 1969)

### **b. Protocole**

L'angle des gouttes a été mesuré avec un Goniomètre DATAPHYSICS OCA 20 (CTTM Le Mans). Pour chaque échantillon, l'angle de contact a été mesuré en 3 points de la surface, en y déposant 10 µl de liquide, respectivement, de l'eau, du formamide et du diiodométhane.

## **5. Le potentiel zêta**

### **a. Principe**

Cette technique permet de mesurer la charge de surface d'une particule ou d'un substrat. Pour un substrat plan, la technique développée par la société Anton Paar consiste à effectuer la mesure entre 2 surfaces ayant subi le même traitement de surface, se faisant face à une distance de l'ordre du dixième de millimètre. Les échantillons sont placés dans une cellule spécifique qui permet à un électrolyte de s'écouler entre les 2 échantillons par application d'une différence de pression. La mesure du potentiel électrique aux bornes de la cellule de

mesure en fonction de la différence de pression permet de déterminer le potentiel d'écoulement et d'en déduire le potentiel de surface.

### **b. Protocole**

Le potentiel zêta a été mesuré avec un zétamètre SurPass (Anton Paar, France).

La cellule est équipée de 2 électrodes Ag/AgCl placées à l'entrée et à la sortie de la zone d'écoulement de l'électrolyte dans l'échantillon (canal d'écoulement) et connectées à un multimètre pour mesurer la différence de potentiel développée dans la solution sur la longueur de l'échantillon. Cette différence de potentiel est enregistrée alternativement pour les 2 directions d'écoulement, pour des valeurs de pression qui augmentent progressivement de 10 à 300 mbar. Le logiciel de pilotage permet de contrôler différents paramètres notamment la pression de départ, la durée de maintien de cette pression, le saut de pression, la périodicité d'enregistrement du potentiel et de la pression. La conductivité électrique de l'électrolyte ( $\lambda$ ) et la température (T) sont mesurées en permanence.

Pour les mesures de potentiel zêta, nous avons utilisé une cellule rectangulaire adaptée spécialement aux surfaces planes. Le canal d'écoulement résulte de l'assemblage face à face de 2 échantillons plans ayant subi le même traitement et maintenus séparés par 2 entretoises latérales en téflon. La distance entre les 2 surfaces est de 100  $\mu\text{m}$ . Pendant la mesure, l'électrolyte sera une solution KCl  $10^{-3}$  M. Les mesures ont été effectuées à température ambiante.

## **III. Culture cellulaire**

### **1. hCSM/MC3T3-E1/HGF-1**

Les cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSM) sont fournies par l'Etablissement Français du Sang (EFS Centre Atlantique) dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Luc SENSEBE et le Prof. Philippe Rosset du Service d'orthopédie du CHU de Tours. Les patients sont informés et signent un consentement éclairé. Les données personnelles (nom du patient) ne sont pas transmises. Après avoir été prélevées par ponction au niveau des crêtes iliaques du patient, les hCSM sont mises en culture dans une boîte de culture F75. Après 2 à 3 jours, la fraction adhérente composée de hCSM est récupérée, comptée et isolée par centrifugation (1200 tours/min, 37 °C, 8 min, SIGMA, 3K15). Les cellules sont ensuite reprises avec du sérum de veau fœtal (SVF, Dominique Dutcher) contenant 10 % de diméthylsulfoxyde

(Sigma), à raison de 1 à 2 millions de cellules par cryotubes. Enfin elles sont congelées et conservées dans un container d'azote liquide à -195 °C.

Les MC3T3-E1 sous-clone 4 sont des préostéoblastes d'origine murine provenant de la calvaria. Elles proviennent de l'ATCC numéro CRL-2593. Les sous-clones de la lignée cellulaire MC3T3-E1 sont sélectionnés selon leur degré de différenciation et leur capacité à minéraliser en présence d'acide ascorbique dans le milieu de culture. Le sous-clone 4 présente un haut degré de différenciation ostéoblastique en présence d'acide ascorbique et de phosphate inorganique.

Les HGF-1 sont des fibroblastes gingivaux humains. Elles proviennent de l'ATCC numéro CRL-2014.

## **2. Décongélation/entretien/milieus**

Le milieu contrôle des hCSM et des MC3T3-E1 est composé d' $\alpha$ -Minimum Essential Medium ( $\alpha$ -MEM, Gibco) et de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Pan), 1 % de L-glutamine (L-Glu, Gibco) et de 1 % de pénicilline/streptomycine (P/S, Gibco). Celui des HGF-1 est composé de Dulbecco's Modified Eagles's Meduim (DMEM, Gibco) supplémenté par 10 % de SVF et de 1 % de P/S.

Le milieu ostéogénique pour les 3 types cellulaires est composé du milieu contrôle respectif supplémenté par du  $\beta$ -glycérophosphate ( $\beta$ -Gly, Sigma), du dexaméthasone (Dex, Sigma) et de l'acide Ascorbique (AA, Sigma) respectivement à 10 mM,  $10^{-8}$  M et 0.2 mM final.

Les cellules sont sorties de l'azote, puis réchauffées. Le milieu contenant les cellules est mélangé à du milieu contrôle, puis centrifugé pour éliminer le diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma). Le culot est repris et les cellules sontensemencées dans une F75, à raison de 10 000 cellules/cm<sup>2</sup> et incubées à 37 °C dans une atmosphère humide sous 5 % de CO<sub>2</sub> (95 % d'air). Le milieu de culture est renouvelé 2 à 3 fois par semaine. Les passages (ou repiquage) sont réalisés à 80 % de confluence. Le milieu de culture est éliminé et le tapis cellulaire est lavé par l'ajout de phosphate buffer saline (PBS, Gibco). Les cellules sont ensuite incubées dans la trypsin/EDTA (0.05 % v/v, Gibco) pendant 5 minutes à 37 °C. La trypsine est inactivée par ajout de 2 volumes de milieu contrôle puis centrifugé à 125 g pendant 8 minutes. Un

comptage au bleu Trypan est réalisé à la cellule de Malassez et les cellules sont réensemencées dans de nouvelles flasques à une densité de 10 000 cellules par cm<sup>2</sup> pour les hCSM et les MC3T3-E1 et de 4000 cellules/cm<sup>2</sup> pour les HGF-1.

### 3. Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses humaines

#### a. Cytométrie de flux

Cette technique permet d'étudier l'expression membranaire ou intracellulaire de protéines. Les hCSM isolées à partir du prélèvement de moelle osseuse selon le protocole décrit précédemment sont cultivées jusqu'à confluence. Les cellules sont décollées grâce à une solution de trypsine/EDTA (0.05 % v/v) pendant 5 minutes à 37 °C. La trypsine est inactivée par ajout de 2 volumes de milieu contrôle puis centrifugée à 125 g pendant 8 minutes. Un comptage au bleu trypan est réalisé à la cellule de Malassez et la concentration cellulaire est rapportée à 2.10<sup>6</sup> cellules par ml. Les cellules sont réparties dans 5 puits d'une plaque 96 puits à fond conique à raison de 2.10<sup>5</sup> cellules par puits.

Les cellules réparties dans la plaque 96 sont lavées avec du PBS et centrifugées 2 fois. Les culots, ensuite, repris dans du PBS/BSA 1 % (Sigma) contenant l'anticorps dirigé contre la protéine. Afin de caractériser les hCSM, 4 anticorps vont être utilisés à raison d'un anticorps par puits. Le dernier puits servira de contrôle négatif de fluorescence. Les anticorps utilisés au 1/100<sup>ème</sup> sont résumés dans le tableau n°1.

**Tableau 1: Anticorps utilisé pour la caractérisation des CSM par cytométrie en flux**

Nom	Origine	Fournisseur	Référence
Fitc, isotype control	Mouse igG1	BD plasmigen	Cat 556-026
PE, isotype control	Mouse igG2b	BD plasmigen	Cat 559-529
CD 34	Fitc anti-human CD 34, clone 4H11	Biolegend	Cat 316-405
CD 45	PE anti-human CD45, clon Hi30	Biolegend	Cat 304-007
CD 90	PE anti-human CD90	BD plasmigen	Cat 555-596
CD 105	PE anti-human CD105	Biolegend	Cat 323-205

Après 20 minutes d'incubation sur glace et 2 lavages successifs au PBS, les cellules sont reprise dans du PBS/PFA (1 %), puis analysées par cytométrie en flux (FACScalibur, BD Biosciences, San José, USA). L'analyse est réalisée grâce au logiciel Cell Quest Pro (BD Biosciences). La figure n° 19 illustre les résultats obtenus.

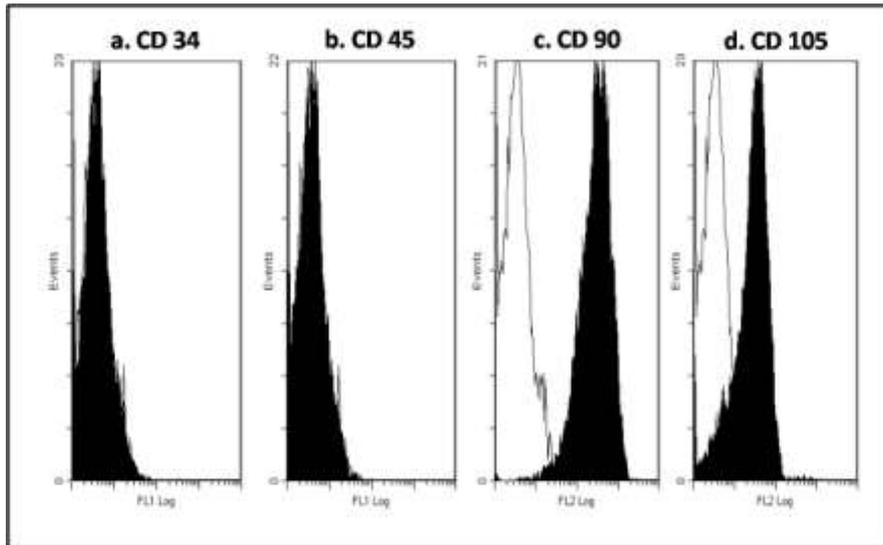


Figure 19: Analyse par cytométrie en flux des marqueurs cellulaires CD34, CD45, CD90 et CD105. Les isotypes appropriés à chaque marqueur apparaissent en blanc alors que les pics noirs représentent les résultats obtenus pour les CSM lors de la caractérisation. Les histogrammes montrent une absence d'expression des marqueurs CD 34 et CD 45 ainsi que la présence de CD 90 et CD 105 sur la surface cellulaire. Ce profil (CD 34<sup>-</sup>, CD 45<sup>-</sup>, CD 90<sup>+</sup> et CD 105<sup>+</sup>) est caractéristique des CSM.

### b. Différenciation ostéoblastique

Après ensemencement de 6 puits dans une plaque 24 puits à raison de  $1.10^4$  cellules par  $cm^2$ , les cellules sont cultivées pendant 21 jours en présence de milieu contrôle et de milieu ostéogénique (n=3). Le milieu de culture est renouvelé tout les 2 à 3 jours. Après 21 jours de culture, le tapis cellulaire est fixé pendant 20 minutes au paraformaldéhyde (PFA) 4 % puis une coloration au rouge alizarine est réalisée (voir section 6.3 du matériel et méthode).

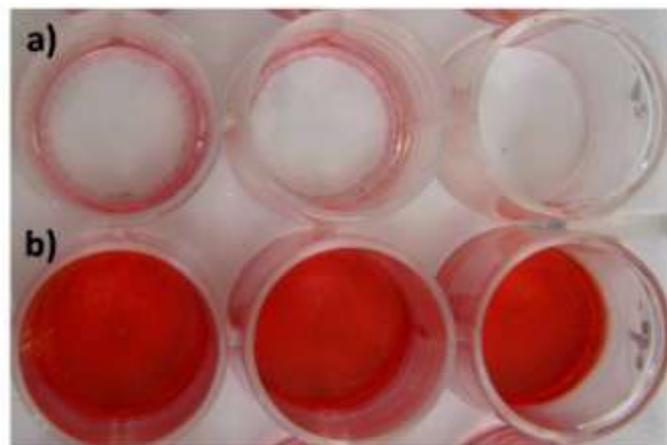


Figure 20: Coloration au rouge alizarine de CSM cultivées pendant 28 jours en milieu contrôle (a) et en milieu de différenciation (b).

Lors de la caractérisation de CSM, une coloration au rouge alizarine est observée sur les tapis cellulaires de CSM cultivées en milieu ostéogénique alors qu'une absence de coloration est obtenue en milieu contrôle (Figure n°20). Ses résultats ainsi que ceux obtenus par cytométrie en flux, confirment l'isolation de cellules souches mésenchymateuses à partir des prélèvements de moelle.

## **IV. Etude de l'adhésion**

### **1. L'ensemencement**

Les cellules sont détachées de la surface des flasks 75 cm<sup>2</sup> par l'incubation à 37 °C avec 2 ml de trypsine/EDTA (0.05 % v/v). 8 ml de milieu de culture contrôle sont ajoutés afin de désactiver la trypsine et la suspension est homogénéisée par pipetage. Un comptage direct par la méthode d'exclusion au bleu Trypan et à l'aide d'une cellule de Malassez est réalisé pour évaluer le nombre de cellule en suspension et la solution est centrifugée pendant 8 minutes à 125 g. Après centrifugation, le milieu est éliminé et le culot cellulaire est resuspendu dans un volume approprié de milieu de culture afin d'obtenir une suspension cellulaire de densité fixée à 40 000 cellules par ml pour les hCSM et les MC3T3-E1 et de densité de 16 000 cellules par ml pour les HGF-1.

20 000 cellules pour les hCSM et les MC3T3-E1 et 8000 cellules pour les HGF-1 sont ensemencées sur les substrats stériles placés au fond des puits par ajout de 0,5ml de la suspension cellulaire sus-décrite.

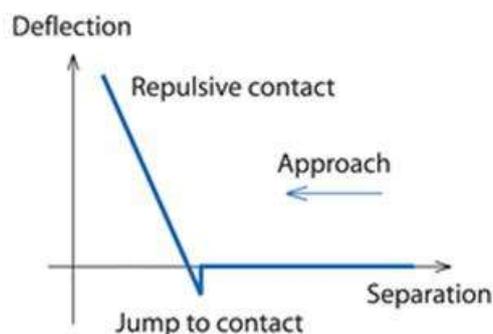
Après ensemencement, les cellules sont cultivées pendant 1, 2, 4, 6 et 8 heures sur les substrats. Le milieu de culture n'est pas changé au cours de cette expérience.

### **2. La mesure de la force d'adhésion par AFM liquide : cellHesion**

La spectroscopie de force appliquée à une cellule unique (appelée SCFS dans la suite de ce travail pour Single Cell Force Spectroscopy) est une technique qui nécessite l'utilisation d'un microscope à force atomique (AFM). Le principe consiste à mesurer la force mécanique de détachement d'une cellule posée sur la surface d'intérêt. Pour ce faire, un micro-levier de type AFM mais sans pointe (dit "tipless") est préalablement fonctionnalisé avec des protéines d'adhésion de la matrice extracellulaire. Ce microlevier est alors mis en contact avec une cellule qui va pouvoir s'y lier de manière forte et covalente. Cette-dernière est ensuite mise en contact avec divers substrats durant un temps déterminé. Finalement le système levier-cellule est relevé jusqu'au décrochement complet de la cellule, tout en mesurant simultanément la

force appliquée au levier. La courbe obtenue, dite courbe de force, peut alors être étudiée et ainsi fournir des informations quantitatives sur les propriétés d'adhésion.

Les expériences sont effectuées à température ambiante avec le microscope à force atomique Nanowizard II de "JPK Instruments". Le microscope est équipé du module spécifique "CellHesion" qui permet de relever le levier sur plus de 100 $\mu$ m, débattement indispensable pour atteindre le détachement complet de la cellule et son substrat.. Les micro-leviers sans pointe (NanoSensors Arrow™ TL1 sensors, 0.03 N/m, 7KHz) sont immergés 30 minutes dans 75  $\mu$ l de fibronectine humaine, une protéine responsable de l'adhésion des cellules. Sa constante de raideur est mesurée à l'air libre par la méthode du bruit thermique. La sensibilité du système est parallèlement déterminée ce qui permet de calibrer précisément les mesures et de déterminer les forces mises en jeu. Pour cela, une approche de la pointe à l'air sur substrat dur permet d'obtenir le type de graphe montré sur la Figure 21 avec la déflexion verticale en ordonnée et la distance micro-levier surface en abscisse.



**Figure 21: Spectre d'approche du micro levier sur une surface dur et à l'air**

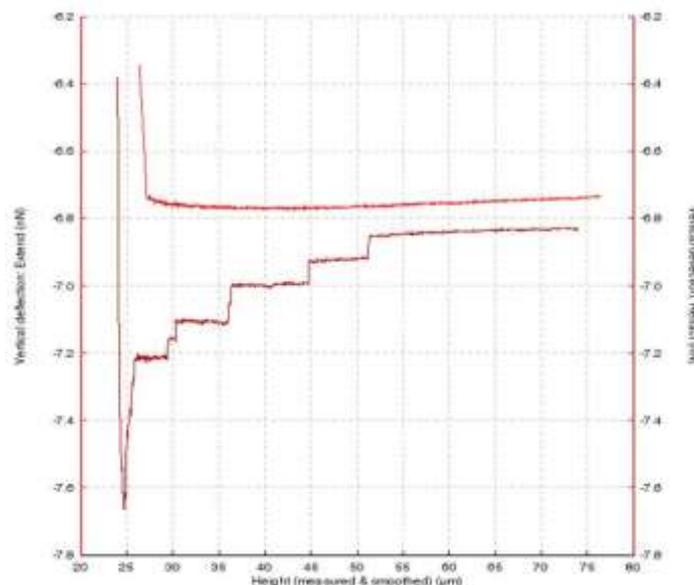
La pente de la courbe sur la partie de contact répulsif permet de déterminer la sensibilité de la photo-diode en m/V. L'étape suivante consiste à laisser vibrer le micro-levier à l'air libre afin de mesurer les fluctuations thermiques, méthode basée sur les travaux de J.L. Hutter et J. Bechoefer et qui permet de déterminer la constante de raideur du micro-levier (méthode valable pour des micro-leviers souples ( $< 0,5$  N/m). Cette constante de raideur doit ensuite être multipliée par un facteur de correction de 0,817 prenant en compte les caractéristiques géométriques du micro-levier utilisée dans cette étude. La constante de raideur du levier obtenue se situe en moyenne entre 20 et 40 mN/m. Elle permet de relier directement la

déflexion du micro-levier à une force (en N), en multipliant la déflexion (en V) par la sensibilité de la photo-diode (m/V) puis par la constante de raideur du micro-levier (N/m).

Une fois, le levier calibré dans le milieu de culture, les hCSM sont déposées au fond d'une boîte de pétri. Les différentes surfaces sont préalablement placées sur le fond de la boîte d'une boîte de pétri et fixées avec de l'albumine bovine (BSA). Le fond de la boîte de pétri nous servira de contrôle positif d'adhésion cellulaire.

Une fois la tête AFM mise en place, le micro-levier est positionné 100  $\mu\text{m}$  au-dessus d'une CSM, en se repérant grâce au microscope optique inversé (Nikon). La cellule est choisie sphérique, preuve qu'elle est en "bonne santé". Le micro-levier est approché de la cellule à la vitesse de 5  $\mu\text{m/s}$ , mis en contact avec elle tout en exerçant une force de l'ordre de 1,5 nN pendant 30 s. Cela permet l'adhésion de la cellule au micro-levier. L'opération est répétée autant de fois que nécessaire jusqu'à ce que la cellule reste sur le micro-levier lorsque celui-ci est éloigné de la surface de la boîte. Un temps de latence de 10 minutes est nécessaire avant de commencer toute manipulation afin que la cellule adhère suffisamment au micro-levier.

Une acquisition de 6 spectres de force sur la surface de la boîte de Pétri « TCPS » est réalisée, puis des mesures sont effectuées sur les différentes surfaces. Plusieurs cycles de mesures sont ainsi effectués en veillant à inverser le sens de rotation des substrats, par exemple, TCPS, titane anodisé, titane poli puis TCPS, titane poli et titane anodisé. Un maximum de cycles est réalisé jusqu'à la dégradation des spectres de force correspondant à la mort cellulaire.



**Figure 22: Spectre de force mesuré lors du détachement d'une cellule souche mésenchymateuse après que cette dernière ait été mise au contact pendant 30 secondes sur du TCPS.**

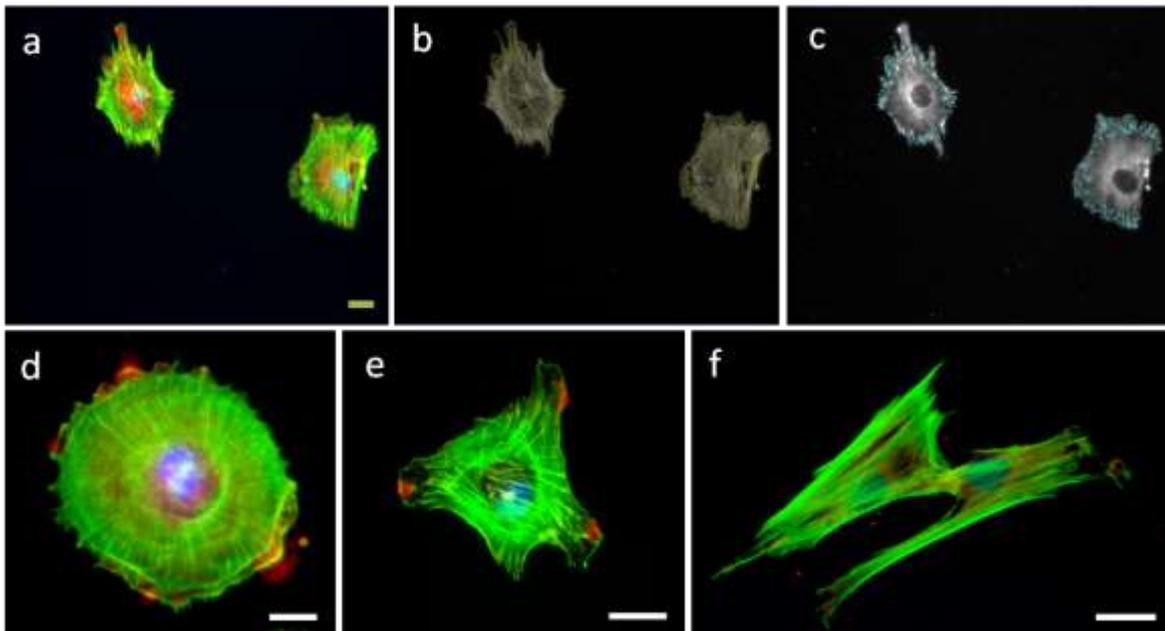
Le résultat direct de ce type de mesures est un spectre de force d'adhésion de la cellule sur le substrat concerné, comme présenté sur la figure 22. La courbe d'approche du micro-levier est présentée en rouge ("extend"). Dans la première phase d'approche, l'ensemble micro-levier/cellule ne rencontre aucune résistance, la courbe « extend » est donc plane jusqu'à ce que la cellule entre en contact avec le substrat. Une force répulsive, exercée par la cellule dont la taille est de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$ , est alors ressentie par le micro-levier, matérialisée sur la courbe par le changement brutal de direction lorsque la distance entre le substrat et le micro-levier est égale ou inférieure à 10  $\mu\text{m}$ . La courbe de retrait est représentée en rouge foncée et contient les informations qui nous intéressent. En effet, l'attachement de la cellule au substrat modifie la position du micro-levier pendant sa remontée (il est comme retenu par la surface), le micro-levier revient finalement à sa position initiale (correspondant à celle de l'extend) uniquement lorsque la cellule n'est plus du tout attachée au substrat. C'est ainsi que nous pouvons extraire de ces courbes la force maximale de détachement (ou d'adhésion) entre la cellule et le substrat, la longueur de détachement (ou d'adhésion)...

### 3. L'immunomarquage et facteurs de formes

Les cellules sont ensemencées sur les différents substrats étudiés pendant 2, 4 heures, 1 ou 6 jours comme précédemment décrit. Après avoir retiré le milieu de culture, les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS, fixées avec de paraformaldéhyde (PFA, 4 %, Sigma) pendant 20 minutes et enfin lavées 3 fois de plus pour retirer l'excédent de PFA. Les échantillons sont conservés à 4 °C en attendant le marquage de l'actine et des noyaux et l'immunomarquage de la vinculine. Les cellules fixées sont perméabilisées avec 0,5 % de triton (x100, Sigma) dans du PBS à 4 °C pendant 15 minutes. Pour réduire le bruit de fond, les échantillons sont ensuite immergés dans du PBS/BSA 1 % (Sigma) pendant 10 minutes à 37 °C. Après le blocage des sites aspécifiques, le PBS/BSA est aspiré. Les échantillons sont, d'abord, incubés pendant 1 heure avec la phalloïdine Alexafluor 488 (Molecular probe, Invitrogen) à une dilution de 1 :40 dans du PBS contenant 10 mg de BSA à 37 °C dans le noir. Entre chaque incubation, les échantillons sont rincés 2 fois avec du PBS- 0,05 % de tween (Sigma). L'anticorps anti-vinculine (monoclonal anti-vinculine clone hVIN-1, Sigma) à une dilution de 1 :100 dans du PBS/BSA (1 %) est ajouté sur chaque échantillon pendant 1 heure à 37 °C puis l'anticorps secondaire (secondary rabbit anti-mouse antibody, A11061, molecular probe, Invitrogen) à une dilution de 1 :200 pendant 30 minutes à température ambiante. les échantillons sont ensuite incubés pendant 10 minutes avec du Hoechst (Sigma) à température ambiante puis

rincés avec de l'eau distillée. Les échantillons sont conservés à 4 °C avant l'observation au microscope à fluorescence (Nikon Eclipse, TE200E).

Après les différents marquages, les images prises au microscope à fluorescence sont analysées avec un « programme maison » utilisant l'analyse d'image du quantimet Q550 (Leica). 4 images sont prises au grossissement x10 et x20 de chaque marquage. Un traitement binaire semi-automatique est réalisé sur chaque image (Figure n°23). Le nombre de cellules adhérentes sur chaque substrat est déterminé grâce au marquage des noyaux. Le marquage de l'actine est utilisé pour discriminer la forme cellulaire en une morphologie ronde, étoilée ou allongée. L'aire cellulaire est aussi mesurée pour chaque type de morphologie, donnant des informations sur l'étalement cellulaire sur les différents substrats. Le nombre de points focaux est compté pour chaque type de cellule et pour chaque morphologie à partir des images de l'immunomarquage de la vinculine. Ce nombre est normalisé par l'aire cellulaire de chaque morphologie pour chaque type de cellule donnant une densité de points focaux. Pour chaque condition, une gamme de 80 à 300 cellules a été analysée.



**Figure 23:** Analyse de la morphologie cellulaire des CSM par marquage de l'actine (vert), de la vinculine (rouge) et du noyau (bleu) de CSM cultivé sur du TCPS pendant 2 heures dans du milieu contrôle. a) Superposition des marquages (a) et images en pseudo couleur du cytosquelette (b) et des points focaux (c). (Grossissement x20, échelle : 40µm). Illustration des morphologies rondes (d), étoilées (e) et allongées (f) (échelle : 20 µm).

## V. Etude de la prolifération

Les hCSM et les MC3T3-E1 sontensemencées à une concentration de  $4 \times 10^5$  cellules/ml dans de l' $\alpha$ -MEM complet et les HGF-1 à une concentration de  $3.2 \times 10^5$  cellules/ml dans du DMEM complet. La suspension cellulaire est distribuée dans une plaque 24 puits contenant les surfaces (n=4/surface). Chaque puits reçoit 500  $\mu$ l de suspension cellulaire (soit 20 000 cellules/puits pour les hCSM et les MC3T3-E1 et 16 000 pour les HGF-1). Les cellules sont incubées à 37 °C dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'humidité, pendant 1, 2, 4, 8 et 16 jours heures dans un volume final de 500  $\mu$ l. Chaque test est réalisé en 3 exemplaires. A la fin de la période d'incubation, les cellules sont lavées par 500  $\mu$ l de PBS qui est ensuite éliminé. Les cellules sont détachées du substrat par ajout de 0,2 ml de trypsine EDTA et incubé à 37 °C pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré dans un eppendorf et le substrat est lavé par 0,8 ml de milieu. Le milieu de lavage est placé dans le tube eppendorf avec la trypsine. Le comptage est réalisé par la méthode d'exclusion eu bleu Trypan comme décrit dans le paragraphe 4.1.

## VI. Etude de la différenciation

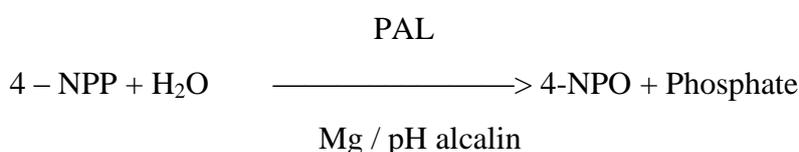
### 1. L'ensemencement

hCSM, HGF-1 et MC3T3-E1cells sontensemencées and cultivées comme précédemment décrit. Le dosage de la phosphatase alcaline et la coloration au rouge alizarine sont réalisés pour chaque type cellulaire et sur chaque substrat. Les cellules sont cultivées en milieu contrôle et en milieu ostéogénique utilisé comme témoin positif de la différenciation ostéoblastique.

### 2. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)

#### a. Principe

La PAL est composée d'un groupe d'enzyme (au moins 5) qui hydrolysent les phosphates à un pH alcalin (6-8). La PAL se trouve dans pratiquement tous les tissus du corps mais à des concentrations élevées dans les ostéoblastes du squelette. Le dosage de la PAL est basé sur la réaction de catalyse suivante :



Au pH de la réaction, le 4-nitrophenoxide a une couleur jaune intense dont l'absorbance est mesurable à 405 nm.

### **b. Protocole de dosage**

Le dosage PAL est effectué après 7, 14 et 21 jours de culture. Le milieu de culture est retiré et le tapis cellulaire est lavé 2 fois avec du PBS froid. Les échantillons sont congelés afin de réaliser le dosage de toutes les conditions le même jour.

Le tapis cellulaire est lysé par ajout d'une solution aqueuse contenant 0,2 % de Nonidet P-40 (NP-40, Sigma). La suspension est transférée dans un tube à hémolyse, soniquée sur glace pendant 30 secondes et finalement centrifugée à 3 000 rpm pendant 5 minutes. La quantité de protéines totales est mesurée à partir d'un aliquot du surnageant par la technique au bleu de coomassie (Coomassie Plus assay reagent; Pierce, Rockford, IL, USA). L'activité de la PAL est mesurée par colorimétrie à pH 10,3 dans 0,1 M de 2-amino-2-méthyl-1-propanol (AMP, Sigma) contenant 1 mM de MgCl<sub>2</sub> (Sigma) et 10 mM de para-nitrophényl phosphate (pNPP, Sigma) dans une plaque 96 puits. La densité optique est mesurée à 405 nm avec un spectrophotomètre (Victor<sup>3</sup>V, Perkin Elmer, Waltham, USA). Les résultats obtenus sont normalisés par la quantité totale de protéines. Il faut que toutes les densités optiques soient inférieures à 0.9 sinon, diluer l'échantillon.

## **3. La coloration et l'extraction du rouge alizarine**

Une coloration au rouge alizarine a été réalisée après 14, 21 et 28 jours de culture sur les différents substrats dans le milieu contrôle et le milieu ostéogénique. Pour cela, le milieu de culture a été enlevé, le tapis cellulaire est lavé 2 fois avec du PBS et fixé pendant 20 minutes au PFA 4%. Après fixation, le PFA est retiré et le tapis cellulaire est recouvert de rouge alizarine S (2 %, pH 4,2, Merck) pendant 2 minutes. Le surnageant est ensuite retiré et le tapis cellulaire est lavé 3 fois avec de l'eau distillée. La coloration est visualisée avec une loupe binoculaire et par contraste de phase avec un microscope inversé (Nikon).

Pour quantifier la minéralisation, une extraction de la coloration au rouge alizarine est réalisée (Gregory et al. 2004). 300 µl d'une solution contenant 10 % d'acide acétique et 20 % de méthanol sont ajoutés dans chaque puits. Les échantillons sont incubés à température ambiante et mis sous agitation pendant 15 minutes. Le surnageant est retiré et placé dans un eppendorf. Une lecture de la densité optique à 405 nm est effectuée et une dilution est réalisée afin d'obtenir une valeur de densité optique comprise entre 0,1 et 2.

## VII. Etude de l'expression des transits par PCR en temps réel

La technique de Reverse Transcription-polymérase Chain Reaction (RT-PCR) est utilisée dans cette étude pour mettre en évidence et comparer l'expression de gènes d'intérêt en fonction des différents substrats. Cette technique consiste dans un premier temps en l'extraction des ARN totaux exprimés par les cellules dans des conditions données, puis ces ARN sont rétrotranscrits en ADNc afin d'amplifier les différents gènes d'intérêt et d'évaluer le niveau d'expression.

### 1. Extraction des ARN totaux

Après les différents temps de culture, les ARN totaux sont extraits en utilisant le kit RNeasy de Qiagen. L'ARN total est élué par 30  $\mu$ l d'eau RNase free et quantifié par mesure de l'absorbance par rapport à l'eau seule. Le rapport DO260/DO280 doit être compris entre 1,8 et 2, signifiant l'absence de contamination protéique. La concentration en ARN total est donnée en ng/ $\mu$ l par la mesure de l'absorbance à 280 nm avec un nanodrop.

Les solutions finales sont conservées à -20 °C.

### 2. Reverse-transcription (RT)

L'objectif de la RT est de transformer l'ARN issu des cellules en ADN complémentaire (ADNc). Cette réaction est permise grâce à l'action de la MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus-Retro Transcriptase, Invitrogen) capable de synthétiser un brin d'ADNc à partir d'un brin d'ARN.

La transcription inverse est réalisée en ajoutant 1  $\mu$ g d'ARN totaux à une solution contenant du tampon 5 X, 10 mM de DTT (Dithiothreitol, Invitrogen), 0,5  $\mu$ g de Randoms Primers (Promega, Madison, USA), 0,5 mM de dNTP (Eurobio, Courtaboeuf, France), 20 unités de RNase out (Recombinant Ribonucléase Inhibitor, Invitrogen) et 400 unités de MMLV-RT. La réaction se fait à 37 °C pendant 1 heure. Les produits de RT sont refroidis sur la glace et conservés à -20 °C jusqu'à la réalisation de la qPCR.

### 3. PCR en temps réel

La PCR est utilisée pour réaliser une amplification génique, c'est-à-dire qu'elle permet l'amplification spécifique d'un fragment d'ADN précis, même si celui-ci est présent en faible quantité dans le mélange initial. Cette technique utilise de manière répétitive l'une des propriétés des ADN polymérase qui est de pouvoir synthétiser le brin complémentaire d'un

brin d'ADN matrice à partir d'une amorce. L'enzyme utilisé est la Taq polymérase, une ADN polymérase thermorésistante dont la température optimale d'action est de 72 °C, mais qui est capable de résister à des passages successifs à 95 °C. La Taq polymérase permet l'élongation de l'ADN à partir de 2 amorces sens et anti-sens encadrant la séquence d'ADN à amplifier. La synthèse des brins d'ADNc est réalisée avec les éléments de base que sont les dNTPs. Une PCR correspond à une succession de cycles comportant chacun 3 étapes :

1. La dénaturation de la matrice d'ADN double brin à 95 °C,
2. l'hybridation des amorces de 50 à 65 °C,
3. L'élongation des brins complémentaires à 72 °C par la Taq polymérase.

Au fil des cycles, la quantité d'ADN double brin borné par les amorces augmente de façon exponentielle, en théorie  $2^n$  copies pour  $n$  cycles de PCR.

Le principe de la PCR en temps réel (ou qPCR) repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR (PCR point final) ou au cycle  $n < 40$  (PCR semi-quantitative). Des sondes fluorescentes se fixent soit sur l'ADN double brin (technologie SYBR green) ou sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman et Beacon). Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN (soit à cause d'un "quencher" soit car la fluorescence nécessite un ADN double brin). Un seuil de fluorescence est établi par le programme de la machine de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil alors on obtient un numéro de cycle PCR appelé "Ct" pour "Cycle Threshold" ou cycle seuil. C'est cette valeur qui est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative. Il est important de connaître l'efficacité de la PCR. Pour cela, on effectue une PCR en temps réel sur des échantillons de dilution croissante pour obtenir une courbe étalon correspondant au couple d'amorces utilisé (spécifiques du locus d'intérêt). Par exemple, une série de dilution au 1/2 doit, en théorie, donner des courbes d'amplification décalées d'un cycle PCR à chaque fois. Si tel est le cas, la réaction a alors une efficacité égale à 2 (la quantité d'ADN double à chaque cycle).

Dans cette étude, nous utiliserons la technique de SYBR green pour l'étude de l'expression de différents transcrits dont le nom et les séquences des amorces sont rapportés dans le tableau n°2.

La solution utilisée pour la PCR est constituée :

- 2 µL de produits de RT obtenus précédemment,
- 48 µL de milieu réactionnel pour PCR : 2 µL primer sens et antisens (5 µM), 4 µL de dNTP (10 mM), 6 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) et 0.25 µL Taq (5 U/µL) qsp 50 µL (eau stérile).

Une fois la PCR terminée, les produits qui en sont issus peuvent être conservés à 4 °C. L'analyse des données est réalisée selon la méthode de Livak (Livak et al. 2001).

**Tableau 2: Séquence des amorces utilisées en qPCR**

Gene	Name	Séquence (5'3')		Taille
		Pimer sens	Primer anti-sens	
RPL19	<i>Ribosomal protein L19</i>	gctctttcctttcgtctgt	cattggtctcattgggtct	122 nt
ITG α3	<i>Intégrine α3</i>	tccgagtcfaatgtccacaga	gctgggctaccctattctc	88 nt
ITG α4	<i>Intégrine α4</i>	ccttgtttagttcaattactcttg a	ccggccatccattttaga	104 nt
ITG αV	<i>Intégrine αV</i>	ccttgctgctcttggaaactc	attctgtggctgtcggagat	74 nt
ITG β1	<i>Intégrine β1</i>	acaccagcagccgtgtaac	ttcgatgccatcatgcaa	73 nt
ITG β5	<i>Intégrine β5</i>	gaggatgctaccgaccacag	gtccaacctgaccgtctc	88 nt
LAMA2	<i>Laminine 2</i>	aattgaagaagccggatttg	tgttttggcccctgtatctg	76 nt
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>	ggccccaaaatctcagatcggt	caactggcgctgcaacaaga c	184 nt
SOX9	<i>(sex determining region Y)-box 9</i>	gtaccgcactgcacaac	tcgctctcgttcagaagtctc	72 nt
COL1a1	<i>Collagen type 1a1</i>	acatggaccagcagactggca	tcaactgtcttgccccaggct	153 nt
COL3a1	<i>Collagen Type 3a1</i>	gcaccaccttcacccttacc	agggaaagatggcccaag	87 nt
VCAM1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>	aactgaacacttgactgtgatcg	tggaaaaaggaatccaggt g	107 nt
BSP	<i>Bone sialoprotein</i>	cgaatacacgggctgcaatg	gtagctgtactcatctcataggc	109 nt
OCN	<i>Osteocalcin</i>	ggcgtacctgtatcaatgg	tcagccaactgtcacagtc	106 nt
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i>	aacaccaccaggggaac	ggtcacaatgcccacagatt	78nt

## 4. PCR array

Des PCR arrays pour les molécules de l'adhésion et de la matrice extracellulaire ainsi que pour l'ostéogénèse ont été réalisés afin de caractériser l'influence des nanostructures sur l'expression génique. Pour cela, des CSM ont été mises en culture sur les différents substrats à une densité de 10 000 cellules par cm<sup>2</sup>. Afin d'obtenir une quantité suffisante d'ARN total, 4 à 12 puits ont été réunis lors de la lyse cellulaire. L'extraction de l'ARN total a été réalisée en utilisant le kit RNeasy de Qiagen. L'ARN total est quantifié à 260 nm et l'intégrité est évaluée par mesure du ratio des sous unités 28 et 18 S par la technique de l'Agilent (BioAnalyser 2100 Agilent). Après quantification et contrôle de la qualité des ARN totaux, les PCR sont réalisés suivant les instructions du fournisseur.

## VIII. Etude in vivo

### 1. Préparation des implants

Des nanostructures contrôlées par anodisation sont obtenues à la surface de fils de titane de grade 2 de diamètre 1 mm et de 5 cm de hauteur par un traitement électrochimique selon le protocole précédemment décrit. 3 types d'implants avec des nanopores de 30, 50 et 100 nm sont préparés et caractérisés. Un fil de titane natif sert de contrôle négatif. Les implants sont stérilisés par autoclave à 121°C pendant 20 min sous sachets.

Plusieurs groupes d'implants sont préparés :

- Groupe contrôle : fil de titane non anodisé,
- Groupe Ti 30: fil de titane anodisé à 5 V présentant des pores de 30 nm,
- Groupe Ti 50: fil de titane anodisé à 10 V présentant des pores de 50 nm,
- Groupe Ti 100 : fil de titane anodisé à 20 V présentant des pores de 100 nm.

### 2. Modèle animal et site d'implantation

Les expérimentations ont été réalisées sous la conduite du Dr. Alain Hoorneart, chirurgien dentiste. Un protocole d'expérimentation animale a été rédigé, soumis et approuvé par le comité éthique local. 24 rates adultes Wistar Han (WH, 176-200 g) ont été fournies par un éleveur certifié (Laboratoire Charles River). Les animaux ont été hébergés dans des cages réglementaires à raison de 3 individus maximum par cage, au sein de l'UTE de la faculté de médecine de Nantes, conformément aux recommandations de la directive européenne 86/609/CEE du 24 novembre 1986 relative aux conditions d'hébergement. Une période de

quarantaine de 7 jours a été instaurée. Les cages sont identifiées par le nom du responsable de l'étude, le type et le nombre d'animaux ainsi que la date de livraison. Les animaux sont observés et contrôlés périodiquement, sont nourris tous les jours et disposent d'eau et de nourriture à volonté.

Les sites d'implantations ont été réalisés au niveau des épiphyses tibiales distales (gauche et droite). Les différents groupes d'implants ont été répartis selon un schéma aléatoire prédéfini. La période de cicatrisation était de 1 et 3 semaines pour tous les groupes d'implants.

### **3. Anesthésie et préparation du site opératoire**

L'induction et l'anesthésie seront assurées par une inhalation d'un composé halogéné, fluoéthane (isoflurane à 2,5% dans de l'air) avec un débit de 2,5 L/min, qui sera maintenue pendant l'intervention chirurgicale, mais avec un débit de 1 L/min.

En raison de l'acte chirurgical, un analgésique sera administré aux animaux 15 minutes avant le début de l'intervention et maintenu pendant 48 heures. La douleur sera prise en charge par l'injection intramusculaire de Buprécare (Buprémorphine, 300 µg/ml) à raison d'une injection de 10 µg dans 100 µl avant la chirurgie et d'une injection quotidienne pendant 2 jours.

Un traitement antibiotique préventif post-opératoire sera administré par une injection unique sous cutanée de Marbocyl FD (2 mg/kg) diluée 1/10<sup>e</sup> avec solution saline pour injection soit 0.4 ml pour un rat de 200 g.

Les membres opérés sont tondu avant désinfection par une solution iodée à 1 % (Bétadine solution).

### **4. Abord chirurgical**

Les 2 membres d'un même animal sont opérés successivement. L'animal avec les membres inférieurs tondu et désinfectés, est positionné sur le dos sur un champ opératoire stérile. Une incision cutanée est réalisée au niveau de l'articulation tibia-fémorale sur la face externe. Le plan musculaire et la capsule articulaire sont incisés afin d'exposer l'épiphyse tibiale. Un trou de 1 mm de diamètre et de 3 mm de profondeur est réalisé au milieu de l'épiphyse tibiale à travers la corticale sous irrigation saline grâce à une fraise boule et un micromoteur de chirurgie dentaire. Le fil de titane est implanté et sectionné avec une pince au ras de la corticale. Les plans musculaires et cutanés sont suturés indépendamment avec des sutures biodégradables (Vicryl 4.0). Les animaux implantés sont surveillés quotidiennement avec un contrôle de l'état général, des abords des sites d'implantations, de la mobilité et de l'appétit.

La perte de mobilité suite à la chirurgie est estimée à 48 h après l'acte chirurgical. Afin de palier la perte de mobilité, des croquettes hydratées seront placées au fond des cages.

## **5. Procédure d'explantation**

Après 1 et 3 semaines, les rates sont euthanasiées par injection intra cardiaque d'une overdose de pentobarbital sodique (Dolethal). L'explantation est réalisée par dissection et les tibias entiers sont immédiatement placés dans un fixateur (formol neutre 1/9<sup>e</sup>) et conservés à 4 °C. Le tissu musculaire autour de l'implant et du tibia est réduit pour ne conserver que le tissu osseux, à l'aide d'une pince et d'une lame de bistouri.

## **6. Analyse de l'attachement implantaire**

L'arrachement des implants est obtenu pas des tests biomécaniques en traction ou en rotation permettant d'évaluer la fixation primaire et secondaire des implants. Dans cette étude, l'ostéointégration des implants a été mesuré par un test de force de traction (Zwisch Roell 72.5). Pour cela, le tibia est fixé dans un mors tandis que le fil de titane à l'extérieur de l'os est maintenu par le dispositif principal. Un capteur de force (Zwisch Roell 8125) avec une force maximale de 50 Newton et une précision de 0.1 N est utilisé. Le test de traction uni axiale est réalisé à vitesse constante de 1 mm/minute. La courbe de force-déplacement ainsi obtenue est traitée à l'aide du logiciel Xpert II ce qui nous permet de connaître la force maximum d'arrachement enregistrée pour chaque échantillon.

## **7. Histologie et histomorphométrie**

Les explants sont déshydratés dans des bains successifs d'alcool 70, 80, 95 et 100 % pendant 24 heures chacun. Les explants sont ensuite placés dans un bain d'acétone pendant 48 heures. Deux imprégnations successives de 7 jours sont réalisées dans une solution de méthylmétacrylate (MMA, Sigma) supplémentés par du peroxyde de benzoyle (Merck) et de polyéthylène glycol (PEG, Merck) puis les explants sont inclus dans la résine MMA à 4 °C. Une coupe est réalisée à la leitz de manière perpendiculaire à l'implant et au centre de celui-ci. Une seconde coupe de 20 µm d'épaisseur est effectuée, montée sur lame et colorée au bleu de méthylène et à la fuchsine basique. Les tissus calcifiés sont colorés en rose violacé et les non calcifiés restent en bleus violacés. Les noyaux sont colorés en bleu.

Les blocs sont polis et métallisés à l'or-palladium (Denton Vaccum LLC, desk III) pour l'observation au microscope électronique à balayage (MEB, LEO VP 1450). Une image des

implants au grossissement x40 est prise en mode électron rétrodiffusé (BSEM). Sur ces images BSEM, le titane apparaît blanc, l'os minéralisé en gris et le tissu fibreux en noir. Le contact os-implant (BIC) ainsi que la repousse osseuse à 0,5 mm autour de l'implant (BS/TS 0,5 mm) ont ensuite été mesurés par analyse d'images (Leica Quantimet 4).

## **Chapitre III :**

# **Etude du comportement des cellules souches sur des surfaces lisses**

Article 2 :

**Behaviour of mesenchymal stem cells on smooth surfaces**

Lavenus S., Pilet P., Guicheux J., Weiss P., Louarn G., Layrolle P.

Soumis à ActaBiomateriala

## I. Introduction

La compréhension des interactions cellules-surfaces est nécessaire pour de nombreuses applications thérapeutiques des biomatériaux, ainsi que pour l'ingénierie tissulaire (Anselme et al. 2000). De nombreuses études ont montré que les propriétés des surfaces implantaires affectent directement le comportement cellulaire et, par conséquent, la cicatrisation tissulaire. Ainsi, l'intégration osseuse des implants orthopédiques et dentaires en titane est corrélée à leurs propriétés de surface (Takeuchi et al. 2008; Sawase et al. 2008). Les mécanismes impliqués lors de l'adhésion et de la différenciation des cellules sur les surfaces ont été intensivement étudiés *in vitro* afin de modéliser la cicatrisation péri-implantaire (Olivares-Navarrete et al. 2008; Faghihi et al. 2007; Cai et al. 2006; Zhao et al. 2005). Dans le contexte de l'ingénierie tissulaire, l'adhésion cellulaire est une étape critique pour l'isolation, l'amplification et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSM) à partir de la moelle osseuse (Friedenstein et al. 1968) ou du tissu adipeux (Zuk et al. 2002). Les hCSM sont isolées de la moelle osseuse par leur capacité d'adhésion au plastique de culture (TCPS, Tissue culture polystyrene). Des microbilles de verre ont aussi été utilisées pour amplifier les hCSM dans des bioréacteurs (Sautier et al. 1992). Les hCSM sont des cellules multipotentes pouvant se différencier en cellules adipogéniques (Morganstein et al. 2010), chondrogéniques (Zannettino et al. 2008), ostéoblastiques (os, (Marinucci et al. 2010)), myoblastiques (muscle) et fibroblastiques (tissu conjonctif) (Engler et al. 2006; Liu et al. 2007). De plus, les cellules souches circulent dans la circulation sanguine vers leur niche, et ainsi vont se greffer et se différencier en fonction du microenvironnement tissulaire afin de régénérer le tissu lésé.

La présence des biomatériaux ou des implants peut grandement influencer le processus de cicatrisation tissulaire. Les propriétés de surface des implants notamment la chimie, la topographie, la mouillabilité et l'élasticité, jouent un rôle essentiel dans l'adhésion cellulaire, mais aussi dans leur différenciation. L'adhésion des hCSM sur différentes surfaces ayant différentes propriétés de surface, peut entraîner la différenciation vers des lignées cellulaires spécifiques (Engler et al. 2006; Dalby et al. 2007). Par conséquent, les implants avec des propriétés de surface différentes vont présenter différents types d'intégration tissulaire. Par exemple, basé sur des observations empiriques, les fabricants ont produits des implants ayant une surface lisse au contact du tissu gingival et une surface rugueuse près de l'os (Hämmerle et al. 1996; Könönen et al. 1992). Cette topographie permet de limiter l'infection bactérienne

par un contact intime entre l'implant et la gencive ainsi qu'un ancrage mécanique par la rugosité de la visse implantaire placée dans l'os. De plus, les cellules ostéoblastiques adhèrent, prolifèrent et se différencient mieux sur des surfaces rugueuses comparé aux surfaces lisses (Anselme et al. 2000; Martin et al. 1995; Suh et al. 2003). D'un autre côté, les fibroblastes adhèrent et prolifèrent plus rapidement sur des surfaces lisses que sur des surfaces rugueuses (Cohen et al. 2007; Miller et al. 2005). Cependant, il est difficile de discriminer les effets des différentes propriétés sur le comportement cellulaire en raison de leur dépendance les unes aux autres.

Dalby et al. ont récemment montré que des surfaces ayant une nanotopographie aléatoire, induisent une différenciation ostéoblastique des hCSM sans ajout de facteurs ostéogéniques (Dalby et al. 2007). Des études ont montré que la topographie et l'énergie de surface (mouillabilité) des substrats influencent l'expression de l'intégrine  $\alpha 2$ , laquelle est requise pour l'expression de marqueurs ostéogéniques (Olivares-Navarrete et al. 2008). Les hCSM sont capables de 'sentir' l'élasticité du substrat et traduisent cette information en se différenciant en lignée spécifique différente selon le substrat (Engler et al. 2006). Les intégrines liées au cytosquelette, permettent la transmission des forces d'adhésion entre la matrice extracellulaire et l'intérieur de la cellule. Dans cette étude, les hCSM se différencient en neurones, myoblastes et ostéoblastes, respectivement sur des substrats ayant une élasticité faible, intermédiaire et dure sans ajouter de facteurs de différenciation. À part ces études, le comportement des hCSM sur des surfaces lisses avec des chimies et des mouillabilités différentes n'est pas élucidé.

Le but de cette étude est de comparer l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSM), des fibroblastes gingivaux (HGF-1) et d'ostéoblastes (MC3T3-E1) sur du plastique de culture (TCPS), du verre et du titane poli miroir. Le TCPS est utilisé comme contrôle positif de l'adhésion cellulaire et de la prolifération alors que le verre, sert de contrôle négatif en raison de l'absence de traitement de surface. Le titane poli miroir correspond à la surface implantaire au contact de la gencive et est utilisé comme surface implantaire. Les propriétés de surface sont caractérisées par microscopie à force atomique, spectroscopie photoélectronique de rayon X, mesure de l'angle de contact et du potentiel zêta. L'adhésion des 3 types cellulaires est comparée sur les différents substrats. Pour cela, le nombre de cellules adhérentes, la morphologie cellulaire et la densité des points focaux sont déterminés en utilisant un programme d'analyse d'image

‘maison’ basé sur le marquage des noyaux, de l’actine et l’immunomarquage de la vinculine. L’influence des surfaces sur la différenciation ostéoblastiques des hCSM, des fibroblastes et des ostéoblastes est aussi examinée par la mesure de l’activité de la phosphatase alcaline et la coloration au rouge alizarine de la minéralisation.

## II. Article 2: Comportement des cellules souches mésenchymateuses sur des surfaces lisses

### Behaviour of mesenchymal stem cells on smooth surfaces

Lavenus S., Pilet P., Guicheux J., Weiss P., Louarn G., Layrolle P.

Submitted to Acta Biomaterialia

Résumé:

La compréhension des interactions entre les cellules et les surfaces est essentielle dans les domaines de l'ingénierie tissulaire et des biomatériaux. Le but de cette étude est de comparer l'adhésion, la prolifération et la différenciation de cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSM), d'ostéoblastes (MC3T3-E1) et de fibroblastes (HGF-1) sur du plastique de culture (TCPS), du verre et du titane (Ti). Le TCPS, le verre et le Ti ont une rugosité et une mouillabilité similaires, mais une chimie de surface différente. L'immunomarquage et l'analyse d'images nous a permis de quantifier le nombre et la morphologie des cellules adhérentes ainsi que la densité des points focaux. Indépendamment des substrats, les hCSM et les ostéoblastes ont, principalement, une morphologie étoilée. Les fibroblastes montrent un nombre de points focaux significativement plus important sur le Ti que sur le TCPS et le verre. La quantification de la coloration au rouge alizarine indique que les hCSM et les ostéoblastes sont plus différenciés sur les TCPS que sur le Ti et le verre. Les propriétés de surface des substrats, telles que la rugosité, la mouillabilité et la composition de surface, modulent le comportement cellulaire. Les événements à court terme tels que l'adhésion cellulaire, peuvent influencer la différenciation des hCSM et par conséquent, la cicatrisation tissulaire autour de l'implant.

## **Behaviour of mesenchymal stem cells on smooth surfaces**

Sandrine Lavenus<sup>1,2,3</sup>, Paul Pilet<sup>3</sup>, Jérôme Guicheux<sup>3</sup>, Pierre Weiss<sup>3</sup>, Guy Louarn<sup>2</sup>,  
Pierre Layrolle<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Inserm U957, Bone resorption physiopathology and primary bone tumor therapy, Faculty of Medicine, University of Nantes, France

<sup>2</sup> Institut des Matériaux Jean Rouxel (IMN), CNRS – University of Nantes, France

<sup>3</sup>Inserm U791, Laboratory for Osteoarticular and Dental Tissue Engineering Faculty of Dental Surgery, University of Nantes, France

\*Corresponding author:

Pierre layrolle

Tel.: (33) 2 72 64 11 43; Fax : (33) 2 40 41 28 60

E-mail address: pierre.layrolle@univ-nantes.fr

To be submitted to: ActaBiomaterialia

Date of submission: August 2010

## Abstract

Understanding of the interactions between cells and surfaces is essential in the field of tissue engineering and biomaterials. This study aimed to compare the adhesion, proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSC), osteoblasts (MC3T3-E1) and gingival fibroblasts (HGF-1) on tissue culture polystyrene (TCPS), glass and titanium (Ti). TCPS, glass and Ti substrates had similar surface roughness and wettability, but different chemistries. Immunocytochemistry and image analysis made it possible to quantify the number and morphology of adherent cells as well as the density of the focal points. Regardless of the substrate, both hMSC and osteoblasts were mainly branch-shaped. HGF-1 exhibited a significantly higher number of focal points on Ti than on TCPS and glass. Alizarin red quantification indicated that both hMSC and osteoblasts were more differentiated on TCPS than on Ti and glass. The surface properties of substrates, such as roughness, wettability and chemical composition, modulated the behaviour of the cells. Early events, such as cell adhesion, may influence the differentiation of hMSC and consequently tissue healing around implanted biomaterials.

## Keywords:

Mesenchymal stem cells, osteoblasts, fibroblasts, adhesion, osteogenic differentiation.

## 1. Introduction

A complete understanding of cell-surface interactions is necessary for many therapeutic applications of biomaterials, as well as in tissue engineering (Anselme et al. 2000). Many studies have shown that the properties of the implant material's surface directly affect cell behaviour and, consequently, tissue healing. It has been shown that bone tissue integration of orthopaedic or dental titanium implants is correlated to their surface properties (T Ogawa, L Saruwatari et al. 2008; Sawase et al. 2008). The mechanisms of adhesion and differentiation of cells on surfaces have been extensively studied *in vitro* in order to model peri-implant healing (R Olivares-Navarrete et al. 2008; Faghihi et al. 2007; Zhao et al. 2005; Cai et al. 2006). In the context of tissue engineering, cell adhesion is a critical step for isolating, amplifying and differentiating human mesenchymal stem cells (hMSC) from bone marrow (Friedenstein et al. 1968) or adipose tissue (Zuk et al. 2002). hMSC have been isolated from bone marrow based on their adhesion to tissue culture polystyrene (TCPS). Glass bead microcarriers have also been used to amplify hMSC in spinner flask bioreactors (Sautier et al. 1992). It is known that hMSC are multipotent cells that can give rise to adipogenic (fat) (Morganstein et al. 2010), chondrogenic (cartilage), (Zannettino et al. 2008), osteoblastic (bone) (Marinucci et al. 2010), myoblastic (muscle) and fibroblastic (connective tissues) lineages (Engler et al. 2006; Yanning Liu et al. 2007). Mesenchymal stem cells are believed to circulate from their niche, then engraft and differentiate depending on tissue microenvironment to regenerate the injured tissue (A I Caplan 1991).

The presence of biomaterials or implants may greatly influence the tissue healing process. The surface properties of implants, such as chemistry, topography, wettability and elasticity, play an essential part in cell adhesion, but also in their

differentiation. The adhesion of mesenchymal stem cells to different topographies and chemistries of implant may involve the differentiation into specific lineages (Engler et al. 2006; Dalby et al. 2007). Consequently, implants with different surface properties may present different types of tissue integration. For instance, based on empirical studies, manufacturers of dental implants have prepared a smooth surface in contact with gingival tissue and a rough, sand-blasted surface near bone (Könönen et al. 1992; Hämmerle et al. 1996). Osteoblastic cells attached, proliferated and differentiated better on rough than on smooth titanium surfaces (Anselme et al. 2000; Martin et al. 1995; Suh et al. 2003). On the other hand, fibroblasts attached, spread and grew more rapidly on mirror-polished than on microrough titanium (Cohen et al. 2007; Miller et al. 2005). It is, however, difficult to discriminate between the effects of multiple factors on the behaviour of cells, as surface properties are dependent on each other. Dalby *et al.* (Dalby et al. 2007) have recently shown that nanoscale disorders on substrates induced osteogenic differentiation of hMSC in the absence of osteogenic supplements. It has been shown that the topography and surface energy (wettability) of substrates regulated integrin alpha-2 expression, which is required for osteoblastic marker expression (R Olivares-Navarrete et al. 2008). Engler *et al.* (Engler et al. 2006) have also demonstrated that hMSC sensed substrate elasticity and transferred the information into different lineage specifications. Integrins linked to cytoskeleton provide the pathway for force transmission from the elastic matrix to the inside of the cell. For instance, hMSC differentiated into neurons, myoblasts and osteoblasts on soft, intermediate and hard substrates without adding differentiating factors. Apart from the above reports, the behaviour of hMSC on smooth surfaces with different chemistries and wettabilities have been poorly investigated.

The aim of this study was to compare the adhesion, proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSC), gingival fibroblasts (HGF-1) and osteoblasts (MC3T3-E1) on TCPS, glass and titanium (Ti). TCPS was used as control of the cell adhesion and proliferation. On the other hand, Ti was the surface of implant in contact with gingival tissue and used as implant surface. The properties of these substrates were carefully analysed by atomic force microscopy, X-ray photo electron spectroscopy, contact angle and zeta potential measurements. The adhesion of the three types of cell was compared on the different substrates. The number of adherent cells, cell morphology and the density of the focal points were determined by using a custom-made image analysis system based on staining of nuclei, actin and vinculin. The influence of surfaces on the osteogenic differentiation of hMSC, fibroblasts and osteoblasts were also investigated by alkaline phosphate activity measurements and alizarin red staining of the mineralization.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Materials**

All experiments were performed in standard 24-well plates made of tissue culture polystyrene (TCPS) treated for adherent cells (Costar, Corning, Schiphol, Netherlands). Glass coverslip discs, 14 mm in diameter and fitting the bottom of the wells, were used (VWR, Fontenay sous Bois, France). Pure titanium bars (Grade 2, ALTA Industries SARL, Arnage, France) were machined into discs measuring 14 mm in diameter and 1 mm in thickness in order to fit 24-well plates. The titanium (Ti) discs were polished by using silicon carbide grinding papers (Buehler, France) of increasing mesh size # 220, 500, 800, 1200, 2400 and 4000. A grinder-polishing machine (Buehler, Metaserv 2000, France) was used at 150 rpm under running tap water. The titanium discs were polished on

each grinding paper for 30 s, then turned 90 ° and ground for 30 s. Mirror-polished Ti surfaces were finally obtained by grinding using a 3 µm diamond paste (Buehler, France) and cloth. Both the glass coverslips and Ti discs were ultrasonically degreased in acetone and ethanol for 10 min. Samples were then rinsed in demineralised water for 10 min under ultrasound and finally air dried at 60 °C in an oven for 4 hours. Samples were packaged and sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min.

## 2.2. Characterising the surfaces

Surface topography was recorded using an atomic force microscope (AFM, VEECO Nanoscope IIIa, Veeco Instrument, Santa Barbara, USA). Surface roughness measurements at the nanometer scale were taken in intermittent contact mode on 5 µm<sup>2</sup> area. Classical silicon cantilevers were used (Tap300AL, Nanoandmore, France). The average force constant and resonance were approximately 40 N/m and 300 kHz, respectively. AFM analysis on different sites of the surface was taken *ex situ* at atmospheric pressure and room temperature. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis of the surfaces was conducted using a Leybold LHS12 Spectrometer equipped with an aluminium K<sub>α</sub> X-ray radiation source at 1486.6 eV and Scan system control. The pressure in the chamber was less than  $2 \times 10^{-9}$  Torr before the data were taken, and the current of the anode was 12 kV. Measurements of dynamic contact angles using distilled water, formamide and diiodomethane were taken using a video-based optical contact measuring system (OCA20, Dataphysic, Filderstadt, Germany). The Zeta potential of surfaces was determined using a Zetameter (SurPASS, Anton Paar, Courtaboeuf, France) by measuring the streaming potential. Briefly, a KCl electrolyte ( $1.10^{-3}$  M) was circulated through the measuring cell containing the solid sample. For all surface characterizations, 3 samples of

each group (n=3) were analysed at room temperature.

## 2.3. Cell culture

Human mesenchymal stem cells (hMSC) were obtained from bone marrow cell aspirations harvested in the iliac crest of patients undergoing orthopaedic surgery and after receiving informed consent (Etablissement Francais du Sang, Centre-Atlantique, Tours, France). Bone marrow cells were plated in 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (Corning) with 15 ml of culture medium. Standard culture medium consisted of alpha modified Eagle medium (α-MEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA) supplemented with 10 % foetal calf serum (FCS, biotech GmbH, Aidenbach, Germany), 2 mM of L-glutamine, 100 µg/ml of streptomycin and 100 Units/ml of penicillin. The culture medium was refreshed every 2 days and adherent hMSC were cultured until 80 % confluence in a humidified atmosphere, 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C. Cells were detached by trypsin/EDTA (0.05 % v/v, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA) for 5 min and counted on a haemocytometer. In order to test the different substrates with a homogenous cell population, the hMSC were cryopreserved at the end of the first passage. Human Gingival Fibroblasts (HGF-1) were purchased from the American Tissue Culture Collection (ATCC, LGC standart, Molsheim, France). The fibroblasts were cultured in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA) supplemented with 10 % FCS, 2 mM of L-Glutamine and 100 Units/ml of penicillin, 100 µg/ml of streptomycin according to the supplier's protocol. Osteoblast cell lines derived from murine calvaria (MC3T3-E1, Subclone 4) were also purchased from the ATCC. The osteoblasts were cultured in α-MEM supplemented with 10 % FCS, L-Glutamine and streptomycin/penicillin. Prior to seeding on the different substrates, the cells were thawed and cultured in 75 cm<sup>2</sup> flasks for 2-4 days. At confluence,

cells were harvested using trypsin-EDTA and counted on Malassez's haemocytometer by using trypan blue exclusion dye.

#### **2.4. Cell adhesion**

Sterile glass coverslips and Ti discs were put into 24-well plates. Three samples per group were used and the experiments were reproduced at least three times. Cell seeding densities of 10,000, 4,000 and 10,000 cells/cm<sup>2</sup> were used for hMSC, HGF-1 and MC3T3-E1, respectively according to ATCC recommendation. Cells were counted and diluted in culture medium without osteogenic factor. Cell suspensions (500  $\mu$ l) were rapidly (less than 10 min) poured into each well. Cells were allowed to adhere to the different substrates for 1, 2, 4 and 8 hours at 37 °C in humidified air with 5 % CO<sub>2</sub>. At the end of each time point, the cell culture medium was removed and collected for cell counting. Each well was rinsed with phosphate buffer saline (PBS, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA) and discarded. Adherent cells on the different surfaces were detached using trypsin/EDTA for 5 min at 37 °C and finally thinned in medium. Cell counting was performed on the haemocytometer. Numbers of adherent cells were expressed at a relative percentage of cell adhesion on the substrates. Data were averaged as mean  $\pm$  standard error of the mean for each time and surface.

#### **2.5. Actin, vinculin and nuclei staining**

hMSC, HGF-1 and MC3T3-E1 were seeded and incubated on the different substrates (TCPS, Glass, Ti) for 4 hours as previously described in section 2.4. After removing the culture medium, the cells were rinsed three times with PBS, fixed with 4 % paraformaldehyde (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) for 20 min and then washed three more times to remove excess paraformaldehyde. Samples were stored at 4 °C until staining for actin, vinculin and nuclei. Fixed cells were first

permeabilised with 0.5 % triton (x100, Sigma, St. Quentin Fallavier, France) in PBS at 4 °C for 15 min. In order to reduce non-specific background, samples were blocked with PBS/BSA 1 % (Sigma) for 10 min at 37 °C. After blocking, PBS/BSA was aspirated and the samples were first incubated for 1 hour with Alexafluor 488-phalloidin (Molecular Probe, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) at a dilution of 1:40 in 10 mg/ml BSA in PBS at 37 °C in the dark. Between each incubation, the samples were rinsed twice with PBS-0.05 % Tween (Sigma). Antivinculin (Monoclonal Anti-vinculin clone hVIN-1, Sigma) at a dilution of 1:100 in 1 % BSA/PBS was added to each well for 1 hour at 37 °C in the dark and 30 min with secondary rabbit anti-mouse antibody (A11061, Molecular Probe, Invitrogen) at a dilution of 1:200 at room temperature. Ultimately, samples were incubated with Hoechst (Sigma) for 10 min at room temperature, and washed twice with deionised water. Samples were stored at 4 °C before fluorescence imaging (Nikon Eclipse, TE2000E, Champigny Sur Marne, France).

#### **2.6. Image analysis of cell morphology**

After staining the actin, vinculin and nuclei, fluorescent images were analysed by a custom-made programme using an image analysis system (Quantimet Q550, Leica, UK). Four images were recorded at a magnification of x10 and x20 for each staining. A semi-automatic binary treatment was performed on each image. The number of cells attached to the substrates was automatically counted using nuclei staining. Actin staining was used for identification of cell shapes into round, branched and spindle cell morphology. Cell areas were also measured for each type of cell morphology, giving insights into the spreading of cells on surfaces. The number of focal points was counted per cell for each type of cell morphology and normalized by the cell areas for each cell

morphology.. For each condition, a range of 80 to 300 cells was analysed.

### **2.7. Cell proliferation**

As previously described in section 2.4, hMSC, HGF-1 and MC3T3-E1 cells were seeded and incubated on the different substrates (TCPS, glass, Ti) for 1, 2, 4, 8, and 16 days. The medium was changed every two days. At the end of the time period, the cells were counted using a haemocytometer.

### **2.8. Alkaline phosphatase activity and red alizarin staining**

hMSC, HGF-1 and MC3T3-E1 cells were seeded and cultured as explained before. Alkaline Phosphatase (ALP) activity and alizarin red staining were assayed for each cell type and substrate. Cells were cultured in both standard and osteogenic medium as positive controls.

The osteogenic medium was supplemented with 10 mM of  $\beta$ -Glycerophosphate (Sigma), 0.2 mM ascorbic acid (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) and  $10^{-8}$  M dexamethaxone (Sigma). ALP was determined after 7, 14 and 21 days of culture. The culture medium was discarded and cells were washed with cold PBS before being frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Frozen cells were lysed by adding 0.2 % aqueous solution of Nonidet P-40 (NP-40, Sigma). The suspension was then transferred to haemolysis tubes, sonicated on ice for 30 s and finally centrifuged at 3,000 rpm for 5 min. Total protein content was measured in aliquots of supernatants (Coomassie Plus assay reagent; Pierce, Rockford, IL, USA). ALP activity was measured by colorimetry at pH 10.3 in 0.1 M 2-amino-2-methyl-1-propanol (Sigma) containing 1 mM  $\text{MgCl}_2$  (Sigma) with an equal amount of 10 mM para-nitrophenyl phosphate (Sigma) in 96 multi-wells. The optical density was read at 405 nm using a Quant spectrophotometer (Victor<sup>3</sup>V, Perkin Elmer, Waltham, USA). Measurements were normalized using the total protein

amounts obtain by blue Coomassie method (Coomassie plus protein assay reagent, Pierce, Thermo Scientific).

Alizarin red staining was performed after 14, 21 and 28 days of culture. As before, the mineralisation was determined on each substrate in both standard and osteogenic media. The culture medium was discarded, confluent cell layers were washed with PBS and staining with Alizarin Red S (2 %, pH 4.2, Merck) was performed for 2 minutes. After aspiration of the overflow, cells were washed 3 times with water. Staining layers were visualised with binoculars and phase microscopy using an inverted microscope (Nikon). To quantify the mineralisation, extraction of alizarin red staining was performed (Gregory et al. 2004). 300  $\mu\text{l}$  of solution containing 10 % acetic acid and 20 % methanol was added to each well. The plates were incubated at room temperature and shaken for 15 min. The supernatant was removed into a 1.5 ml tube and 200  $\mu\text{l}$  was used to read at 450 nm the 96-well plates. To obtain an optical density of between 0.1 and 2, all samples cultured in osteogenic medium were diluted 4 times and measured at 450 nm.

### **2.9. Statistical analysis**

Samples were prepared and characterized in triplicate in order to ensure consistency of analysis ( $n=3$ ). Cell culture experiments were reproduced at least twice using 3 samples per group. Data were averaged with SEM. Statistical analysis was performed using ANOVA (SPSS 16.0 software) and considered significant for  $p < 0.05$ .

## **3. Results**

### **3.1. Characterization of surfaces**

The surface average roughness (Ra) values of the different surfaces are shown in Table 1. The TCPS and glass surfaces had a similar average surface roughness, with an Ra in the 0.1-5 nm range. The Ra value for the Ti surface was around 40 nm. Surface composition of the different substrates was

determined by XPS and is summarised in Table 1. The main elements of the TCPS surface were carbon (C) and oxygen (O) corresponding to polystyrene after plasma treatment in air. Glass substrates contained silicon (Si) and oxygen, with traces of sodium (Na) and carbon. This composition corresponded to a sodium silicate glass with some traces of organic contaminants. The XPS analysis confirmed the presence of titanium oxide ( $\text{TiO}_2$ ) on the Ti substrates and pollution by carbon contaminants. The wettability and charge of the different surfaces were determined by measuring the contact angle ( $\theta$ ) and zeta potential ( $\zeta$ ). The most hydrophilic surface was glass, with a contact angle of around  $45^\circ$ , while the Ti surface exhibited a contact angle of  $75^\circ$ . TCPS presented intermediate wettability between glass and Ti with a contact angle of around  $64^\circ$ . Concerning the zeta potential, all surfaces presented negative charge at pH 7 in  $1.10^{-3}$  M of KCl. The most negative surface was glass, with approximately -42 mV. TCPS and Ti exhibited, respectively, -29 and -35 mV in the same medium condition. Summarising their properties, the 3 surfaces studied had comparable roughness, hydrophilic nature and a negative charge.

### 3.2. Cell adhesion to surfaces

The adhesion of hMSC, fibroblast and osteoblast cells to the different substrates was determined at 1, 2, 4 and 8 hours. Fig. 1 shows the relative percentage of adherent cells on TCPS, glass and Ti. For hMSC (Fig. 1a), the relative number of adherent cells increased with time on the 3 substrates. The adhesion yield was greater on TCPS than on glass and Ti. Nevertheless, the maximum number of adherent hMSC on TCPS reached a plateau at approximately 60 % after 4 and 8 hours. The maximum number of adherent cells on glass and Ti were 41 and 26 %, respectively. Cell adhesion was significantly higher on glass than on Ti after 4 and 8 hours. For fibroblasts, the

number of adherent cells on TCPS reached the maximum of 100 % after 4 hours (Fig. 1b). The adhesion was progressive on glass and Ti, with a maximum of 60 % after 8 hours of seeding for both substrates. The fibroblast adhesion yield was significantly higher on TCPS than on glass and Ti ( $p < 0.05$ ). There was no significant difference in the fibroblast adhesion percentage between glass and Ti at any of the time points. For osteoblasts, the maximum cell adhesion on TCPS was obtained after 1 hour of seeding (Fig. 1c). The relative number of adherent osteoblastic cells increased steadily until 4 hours on glass and Ti. The maximum adherent cells on glass and Ti were 28 and 19 %, respectively.

### 3.3. Image analysis of cell morphology

Representative images of adherent hMSC after 2 hours on TCPS are shown in Fig. 2. The cell actin cytoskeleton and vinculin for focal points are exhibited in Fig. 2 b and c, respectively. The overlay of staining is shown in Fig. 2a, d, e and f. An image analysis programme was used to determine the cell numbers, cell morphology and the number of focal points. A good correlation was found between the number of adherent cells determined by trypan blue exclusion dye counting and staining of nuclei (data not shown).

In order to discriminate the state of cell adhesion on the substrates, 3 different cell shapes were determined. As shown in Fig. 3, round, branched and spindle cell shapes were determined after 4 hours for the 3 types of cell on the different substrates. The initial state of adhesion was characterized by round morphology for the 3 types of cell (Fig. 2d). The morphology of the hMSC, fibroblastic and osteoblastic cells was observed after 24 and 48 hours corresponding to the end state of adhesion. Examples of branched and spindle cell morphology are shown in Fig. 2 e and f. After 24 and 48 hours, hMSC and fibroblasts had a prominent spindle shape while osteoblasts exhibited a branched

shape. For hMSC, cell morphology was principally branched (65 %) after 4 hours regardless of which substrate, was being taken into consideration (Fig. 3b). A small number of round cells (10 %) and a remainder of spindles (25 %) were observed. No statistical difference was found between cell shapes on the different substrates. As shown in Fig. 3b, the fibroblastic cell shape distributions were different on the 3 substrates. Fibroblasts were more round on glass than on TCPS and Ti. Round cells accounted for 56, 20 and 37 % on glass, TCPS and Ti, respectively. Cell spreading was greater on TCPS with 25 % of spindle cells than on glass and Ti, where 8 % of fibroblasts had a spindle shape. Most osteoblastic cells had a branched shape regardless of the substrate (Fig. 3c). Approximately 73 and 74 % of branched cells were counted on TCPS and Ti while 66 % were found on glass. No statistical difference was observed between TCPS and glass. The number of round cells was slightly lower on Ti than on TCPS and glass ( $p < 0.05$ ). A small number of spindle cells was found on the 3 substrates.

The number of focal points was also measured for the 3 types of cell on the different substrates after 4 hours of culture (Fig. 4). The number of focal points was also identified as a function of cell morphology and cell surface as previously defined. For hMSC, the number of focal points was greater on TCPS than on the other substrates and regardless of which cell shape was considered. For instance, about 0.13, 0.072 and 0.065 focal points per  $\mu\text{m}^2$  were counted for round hMSC cells on TCPS, glass and Ti, respectively. The number of focal points for branched and spindled cells was significantly lower on glass and Ti than on TCPS ( $p < 0.05$ ). No statistical difference was observed between glass and Ti (Fig. 4a). Concerning fibroblasts, the number of focal points for branched and spindle shapes were higher on Ti than on TCPS and glass. No statistical difference in the number of focal

points per  $\mu\text{m}^2$  was observed for round fibroblast cells regardless of the substrate (Fig. 4b). For osteoblasts, the number of focal points for branched and spindle shapes were lower on glass than on TCPS and Ti (Fig. 4c). No statistical difference for the number of focal points in round osteoblastic cells was found between the 3 substrates.

### **3.4. Cell proliferation**

The number of cells was determined on the different substrates up to 16 days of culture (Fig. 5). For hMSC, the number of adherent cells increased with time on the 3 substrates (Fig. 5a). The proliferation was higher on TCPS than on glass and Ti. A plateau could be observed between 2 and 4 days of culture on all substrates. This plateau corresponded to cell confluence. After 14 days of culture, the number of hMSC cells had been multiplied by 13, 11 and 8 times compared to day 1 on TCPS, glass and Ti, respectively. For fibroblasts, the number of cells increased 8 times after 16 days on TCPS (Fig. 5b). The cell proliferation rate was progressive on glass and Ti, with a maximum of 4 fold after 16 days. The proliferation rate of fibroblasts was significantly higher on TCPS than on glass and Ti ( $p < 0.05$ ). No statistical difference in cell proliferation between glass and Ti was observed at any of the time points. For MC3T3, the number of cells increased with time on the 3 substrates but proliferation was more rapid on TCPS than on Glass and Ti (Fig. 5c). The number of MC3T3 cells increased by a factor 30 on TCPS and by only 17 and 10 on glass and Ti after day 16 compared to day 1. Significant differences in proliferation rate were observed after 4, 8 and 16 days. The number of cells reached a plateau after day 8 on glass and Ti.

### **3.5. Alkaline phosphatase activity and red alizarin staining**

Osteogenic differentiation was studied for the 3 cell types on the different substrates by measuring ALP activity and alizarin red

under control and osteogenic cell culture media. Fig. 6 shows ALP activity after 7, 14 and 21 days. For hMSC, ALP activity was significantly higher in the osteogenic than in the control medium (Fig. 6a). No statistical difference was observed between substrates or culture time. In the osteogenic medium, ALP activity increased with time on the 3 substrates. The level of ALP activity was significantly higher on glass after 21 days than on TCPS and Ti ( $p < 0.05$ ). No statistical difference was observed between TCPS and Ti at any of the time points. Fibroblastic cells expressed low ALP activity in both control and osteogenic media (Fig. 6b) as compared to osteoblastic cells. Maximum ALP activity was observed on glass with a value of 32 and 137 nmol/min/mg of protein after 21 days in control and osteogenic media, respectively. For osteoblasts, high levels of ALP activity were observed in both control and osteogenic media regardless of the substrate considered (Fig. 6c). ALP activity increased with time in both media, but was slightly higher in the osteogenic than in the control medium. Comparison of the substrates indicated that ALP activity was significantly lower on Ti than on TCPS and glass after 7 and 14 days of culture but no difference was observed after 21 days in the control medium. In osteogenic conditions, ALP activity increased between 7 and 14 days but reached a plateau after this time. ALP activity was higher on TCPS than on glass and Ti after 21 days ( $p < 0.05$ ).

Osteogenic differentiation was also studied by alizarin red S staining for each substrate after 14, 21 and 28 days in control and osteogenic media. Alizarin red staining is an indicator of mineralisation of the extracellular matrix. As shown in Fig. 7, hMSC, fibroblasts and osteoblasts cultured on TCPS in control medium for 28 days were negative for Alizarin staining. Similarly, staining for mineralisation was negative for each type of cell cultured in control medium on glass and Ti (data not

shown). In the osteogenic medium, alizarin staining was positive for all types of cell on TCPS after 28 days. hMSC and osteoblasts exhibited classical mineralisation nodules, but alizarin red staining was more intense for osteoblasts than hMSC. Alizarin staining was also observed on fibroblast cultures in the osteogenic medium, but appeared more uniform without nodules than for the previous types of cell.

As Ti is not a transparent substrate, extraction of alizarin red staining was performed and measured by optical density in overall conditions (Fig. 8). As previously observed for ALP activity, the alizarin red assay was significantly higher for hMSC cultured in the osteogenic than in the control medium (Fig. 8a). For instance, the optical density of alizarin red extraction reached 1.3 in the osteogenic medium while it was only 0.09 for hMSC cultured on TCPS for 28 days in the control. In the osteogenic medium, the alizarin red was significantly higher on TCPS than on glass and Ti after 21 and 28 days. For fibroblasts cultured in the control medium, no difference in alizarin red extraction was detected between any of the substrates and time points (Fig. 8b). In the osteogenic medium, alizarin red staining was observed on TCPS and Ti. Surprisingly, low alizarin red staining was detected on glass. The optical density of the extraction of alizarin red staining increased with time to a maximum of 1.5 after 28 days for TCPS and Ti. Absorbance showed a higher alizarin red staining on Ti than on TCPS after 14 and 21 days ( $p < 0.05$ ) but it was similar on these substrates after 28 days.

For osteoblasts, alizarin red extraction in the control medium reached a plateau after 14 days. No statistical difference was observed between the substrate at any of the time points. In the osteogenic medium, the alizarin red extraction necessitated a dilution by 4 to be able to read the optical density. Mineralisation by osteoblasts increased with time on TCPS, remained

relatively low for glass and reached a plateau for Ti after 21 days. The absorbance of alizarin red extraction was significantly higher on TCPS than on glass and Ti at each time point ( $p < 0.05$ ) and higher on Ti than on glass at this time point ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

In this study, the behaviour of hMSC on different substrates was investigated and compared to that of fibroblasts and osteoblasts. At the micrometer level, which is also the cell level, TCPS, glass and Ti substrates had similar surface roughness. However, the substrates had different surface compositions (Table 1). These differences in chemistry have been shown to strongly influence the adsorption of proteins (Roach et al. 2007; Woo et al. 2003; Sigal et al. 1998). Once immersed in culture medium, the substrates were immediately covered by proteins from foetal calf serum. The nature and conformation of these proteins depended on the chemistry of the surfaces (Roach et al. 2007). The adhesion of cells to surfaces is favoured by the presence of adsorbed proteins and mediated by cell adhesion molecules (CAMs) known as integrins. Resulting from differences in chemistry, TCPS and Ti exhibited hydrophobic surfaces while glass was more hydrophilic. The contact angle values agreed well with those found in the literature (Le Guehennec, h et al. 2008). Most proteins in blood or the extracellular matrix have hydrophobic and hydrophilic domains and may interact with surfaces prior to cell adhesion. The charge of the surfaces also plays a determining role in the adsorption of proteins. At physiological pH 7.4, the 3 substrates considered were electronegatively charged. The Zeta

potential values found for TCPS, glass and Ti agreed well with previous reports (Oliva et al. 2003; Zimmermann et al. 2005; Katsikogianni & Missirlis 2010).

Regarding the role of surface properties on cell adhesion, we found that attachment of hMSC was significantly higher on TCPS than on glass and Ti (Fig. 1). This result was corroborated by counting nuclei by staining. The fibroblast and osteoblast adhesion yield was significantly higher on all substrates than for hMSC. Since the work of Fridenstein in 1976 (Lalykina et al. 1976), TCPS is the standard substrate for isolation and culture of hMSC. Many authors have improved hMSC adhesion on biomaterials by coating them with fibronectin or collagen type I (Ogura et al. 2004; Salaszyk et al. 2004). Depending on the surfaces and properties considered, hMSC may use different adhesion mechanisms than osteoblasts and fibroblasts.

In order to study the difference in cell adhesion on surfaces, we developed a quantitative method using staining of vinculin and image analysis. The number of focal points, given by vinculin immunostaining, was determined for the 3 types of cell on each substrate (Fig. 4). Vinculin is a plasma membrane associated protein found in adhesion complexes and can therefore be used as an ideal marker protein to label integrin-associated adhesion subtypes (D R Critchley 2000). The density of hMSC focal points on TCPS was comparable to those of osteoblasts, regardless of cell shape. Corroborating adherent cell counting, the number of hMSC focal points on glass was lower than on TCPS and Ti. We also found that the number of focal points was similar for hMSC and fibroblasts on Ti.

Cell proliferation on the different substrates was in line with the adhesion yield. The correlation between cell adhesion (Fig. 1) within a few hours and the proliferation rate over days (Fig. 5) was well defined. Other reports have also

described similar trends (Deligianni et al. 2001; Zhou et al. 1993).

The main objective of our work was to find a possible correlation between the initial adhesion steps, cell differentiation and substrate properties. Some authors have found that hMSC adhesion on different topographies and chemistries of implants commits cells to different lineages (Engler et al. 2006; Dalby et al. 2007). For instance, osteoblastic differentiation was observed on rough grit-blasted acid-etched titanium, while fibroblastic-type cells developed on smooth, mirror-polished titanium surfaces (Cohen et al. 2007; Miller et al. 2005; Anselme et al. 1999; Perizzolo et al. 2001). Others have found that hydrophilic implant surfaces promoted cell adhesion, osteogenic differentiation and consequently the osseointegration of implants (SLA active Straumann) (Eriksson et al. 2004; Scacchi et al. 2000). During cell adhesion, different integrins are expressed and transfer the 'surface information' to the nuclei via the actin cytoskeleton. Integrins are expressed differently during adhesion, and control genetic expression. For instance, Olivares *et al.* have recently found that cells interacted with substrate via  $\alpha_2\beta_1$  integrin expression and secrete dkk2, a factor involved in Wnt signalling pathways which activate osteoblastic differentiation (R Olivares-Navarrete et al. 2008; R Olivares-Navarrete et al. 2010). Engler *et al.* (Engler et al. 2006) demonstrated that cells are able to sense the elasticity of substrates and differentiate into osteogenic, myoblastic or neuronal cells depending on the stiffness of the substrates. They observed different cell morphologies and gene expression depending on elasticity. By adding blebbistatin, they blocked the nonmuscle myosin II (NMM II) and proved its implication in cell differentiation. They demonstrated that NMM IIA–C is likely to be involved in the matrix-elasticity sensing that drives lineage specification. In our study, hMSC exhibited different morphologies (i.e. round, branched or

spindle) as a function of their adhesion state to the substrate. However, we did not demonstrate differences in cell morphology as a function of the substrate.

In order to demonstrate a possible role of surface properties on osteoblastic differentiation of hMSC, we measured ALP activity and mineralisation. The results were compared to that of osteoblasts and fibroblasts on the different substrates in both standard and osteogenic media. After 28 days of culture in osteogenic medium, nodule of mineralization was observed for osteoblastic cells. On the contrary, fibroblasts cells shown a red alizarin staining without nodule of mineralization (Fig. 7) as previously describe by Yajima *et al.* (Yajima et al. 1984). Osteogenic differentiation of hMSC on TCPS seemed to be comparable with osteoblastic cells. Alizarin red staining of hMSC cultures on Ti was comparable to those of fibroblastic cells (Fig. 7). We also found that the number of hMSC focal points on Ti was comparable to the number found in fibroblasts. These results suggest that hMSC differentiated into a fibroblastic lineage on smooth titanium. Other reports have corroborated that hMSC differentiated into an osteoblastic lineage on rough rather than on smooth titanium surfaces (Puckett et al. 2008; Yao et al. 2008). However, this hypothesis needs to be confirmed by a systematic study of osteogenic gene expression and cell markers.

## 5. Conclusion

In this study, the adhesion, proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSC), osteoblasts (MC3T3-E1) and gingival fibroblasts (HGF-1) were compared on tissue culture polystyrene (TCPS), glass and titanium (Ti). The TCPS, glass and Ti substrates had similar surface roughness but different chemistries. TCPS and Ti had a hydrophobic surface while glass was more

hydrophilic. As previously found, hMSC attachment was significantly higher on TCPS than on other substrates. This better adhesion was corroborated with a higher number of focal points and branched cell morphology observed using a custom-made image analysis system. A good correlation was found between adhesion yield and cell growth rates. Alizarin red quantification indicated that both hMSC and osteoblasts were more differentiated on TCPS than on Ti and glass. Overall, the substrate surface properties such as roughness, wettability and chemical composition modulated the behaviour of the cells. Consequently, early events such as cell adhesion may influence the differentiation of hMSC that conditions tissue healing around implanted biomaterials.

**Conflict of interest:**

None to declare.

**Acknowledgments:**

The authors would like to acknowledge R. Bareille and J. Amédée for their technical assistance with cell immunostaining. The authors would also like to thank P. Marmey from CTTM for contact angle and surface energy measurements. The Regional Council (Bioregos), Inserm, SFBTM and the French Ministry of Research are acknowledged for supporting the PhD thesis of S. Lavenus. The authors are grateful to Kirsty Snaith of Medicis Traduction for grammar and spelling corrections of the manuscript.

## Bibliography

- [1] Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, Hardouin P. *J. biomed. mater. res* 2000;49:155-166.
- [2] Ogawa T, Saruwatari L, Takeuchi K, Aita H, Ohno N. *J. dent. res* 2008;87:751-756.
- [3] Sawase T, Jimbo R, Baba K, Shibata Y, Ikeda T, Atsuta M. *Clin oral implants res* 2008;19:491-496.
- [4] Olivares-Navarrete R, Raz P, Zhao G, Chen J, Wieland M, Cochran DL, Chaudhri RA, Ornoy A, Boyan BD, Schwartz Z. *Proc. natl. acad. sci. u.s.a* 2008;105:15767-15772.
- [5] Faghihi S, Azari F, Zhilyaev AP, Szpunar JA, Vali H, Tabrizian M. *Biomaterials* 2007;28:3887-3895.
- [6] Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Boyan BD. *J biomed mater res a* 2005;74:49-58.
- [7] Cai K, Frant M, Bossert J, Hildebrand G, Liefelth K, Jandt KD. *Colloids surf b biointerfaces* 2006;50:1-8.
- [8] Friedenstien AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. *Transplantation* 1968;6:230-247.
- [9] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. *Mol. biol. cell* 2002;13:4279-4295.
- [10] Sautier JM, Nefussi JR, Forest N. *Calcif. tissue int* 1992;50:527-532.
- [11] Morganstein DL, Wu P, Mane MR, Fisk NM, White R, Parker MG. *Cell res* 2010;20:434-444.
- [12] Zannettino ACW, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, Gronthos S. *J. cell. physiol* 2008;214:413-421.
- [13] Marinucci L, Balloni S, Becchetti E, Bistoni G, Calvi EM, Lumare E, Ederli F, Locci P. *Ann biomed eng* 2010;38:640-648.
- [14] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. *Cell* 2006;126:677-689.
- [15] Liu Y, Yan X, Sun Z, Chen B, Han Q, Li J, Zhao RC. *Stem cells dev* 2007;16:695-706.
- [16] Caplan AI. *J. orthop. res* 1991;9:641-650.
- [17] Dalby, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, Wilkinson CDW, Oreffo ROC. *Nat mater* 2007;6:997-1003.
- [18] Könönen M, Hormia M, Kivilahti J, Hautaniemi J, Thesleff I. *J. biomed. mater. res* 1992;26:1325-1341.
- [19] Hämmerle CH, Brägger U, Bürgin W, Lang NP. *Clin oral implants res* 1996;7:111-119.
- [20] Martin, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. *J. biomed. mater. res* 1995;29:389-401.
- [21] Suh J, Jang B, Zhu X, Ong JL, Kim K. *Biomaterials* 2003;24:347-355.
- [22] Cohen A, Liu-Synder P, Storey D, Webster T. 2007;385-390.
- [23] Miller D, Vance R, Thapa A, Webster T, Haberstroch K. *Applied bionics and biochemics* 2005:1-7.
- [24] Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. *Anal. biochem* 2004;329:77-84.
- [25] Roach P, Eglin D, Rohde K, Perry C. *J mater sci mater med* 2007;1263-1277.
- [26] Woo K, Chen V, Ma P. *J biomed mater res a* 2003:531-537.
- [27] Sigal G, Mrksich M, Whitesides G. 1998:3464-3473.
- [28] Le Guehennec L, Lopez-Heredia M, Enkel B, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. *Acta biomater* 2008;4:535-543.
- [29] Oliva FY, Avalue LB, Cámara OR, De Pauli CP. *J colloid interface sci* 2003;261:299-311.
- [30] Zimmermann R, Norde W, Cohen Stuart MA, Werner C. *Langmuir* 2005;21:5108-5114.
- [31] Katsikogianni MG, Missirlis YF. *Acta biomater* 2010;6:1107-1118.
- [32] Lalykina KS, Latsinik NV, Epikhina SI, Fridenshtein. *Biull eksp biol med* 1976;81:239-242.
- [33] Ogura N, Kawada M, Chang W, Zhang Q, Lee S, Kondoh T, Abiko Y. *J oral sci* 2004;46:207-213.
- [34] Salaszyk RM, Williams WA, Boskey A, Batorsky A, Plopper GE. *J. biomed. biotechnol* 2004;2004:24-34.
- [35] Critchley DR. *Curr. opin. cell biol* 2000;12:133-139.
- [36] Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF. *Biomaterials* 2001;22:87-96.
- [37] Zhou, Dziak E, Opas M. *J. cell. physiol* 1993;155:14-26.
- [38] Anselme K, Noël B, Hardouin P. *J mater sci mater med* 1999;10:815-819.
- [39] Perizzolo D, Lacefield WR, Brunette DM. *J. biomed. mater. res* 2001;56:494-503.
- [40] Eriksson C, Nygren H, Ohlson K. *Biomaterials* 2004;25:4759-4766.
- [41] Scacchi M, Merz BR, Schär AR. *Clin oral implants res* 2000;11 Suppl 1:22-32.
- [42] Olivares-Navarrete R, Hyzy S, Hutton D, Erdman C, Wieland M, Boyan B, Schwartz Z. *Biomaterials* 2010:2728-2735.
- [43] Yajima T, Kumegawa M, Hiramatsu M. *Arch. histol. jap.* 1984:43-55.
- [44] Puckett S, Pareta R, Webster TJ. *Int j nanomedicine* 2008;3:229-241.
- [45] Yao C, Slamovich EB, Webster TJ. *J biomed mater res a* 2008;85:157-166.

## Table and Figure captions:

**Table 1:** Average roughness (Ra), composition, contact angle ( $\theta$ ) and zeta potential ( $\zeta$ ) of the different surfaces used for culturing hMSC, fibroblasts and osteoblasts (\* surface contamination).

**Figure 1:** Comparative study of the adhesion of different cell types on TCPS, glass, and Ti. a) human mesenchymal stem cells (hMSC), b) human gingival fibroblasts (HGF-1) and c) osteoblasts (MC3T3-E1) (expressed as relative percentage. Mean  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$  compared with TCPS and # $p < 0.05$  compared with glass)

**Figure 2:** Analysis of cell morphology by staining of actin (green), vinculin (red) and nuclei (blue) in human mesenchymal stem cells (hMSC) on TCPS substrate after 2 hours in control medium. a) Overlay of staining, pseudo coloured images of b) cytoskeleton and c) focal points (magnification  $\times 20$ , bar scale: 40  $\mu\text{m}$ ) d) round, e) branched and f) spindle cell morphology (bar scale: 20  $\mu\text{m}$ ).

**Figure 3:** Cell morphology (round, branched and spindle) as a function of substrates. a) human mesenchymal stem cells (hMSC), b) human gingival fibroblasts (HGF-1) and c) osteoblasts (MC3T3-E1) 4 h after cell seeding on TCPS, glass and Ti surfaces.  $n = 80-300$  cells per condition. (Mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$  compared with TCPS, # $p < 0.05$  compared with glass).

**Figure 4 :** Number of focal adhesion points per surface area for each type of cell morphology a) human mesenchymal stem cells (hMSC), b) human gingival fibroblasts (HGF-1) and c) osteoblasts (MC3T3-E1) 4 h after cell seeding on TCPS, glass and Ti surfaces.  $n=80-300$  cells per condition. (Mean  $\pm$  SEM) \*: Significant difference with TCPS from the corresponding value  $p < 0.05$  and #: Significant difference with glass from the corresponding value  $p < 0.05$ .

**Figure 5:** Comparative study of cell proliferation on the different substrates a) human mesenchymal stem cells (hMSC), b) human gingival fibroblasts (HGF-1) and c) osteoblasts (MC3T3-E1) (Mean  $\pm$  SEM , \* $p < 0.05$  compared with TCPS and # $p < 0.05$  compared with glass).

**Figure 6:** Osteogenic differentiation time course study by Alkaline Phosphatase (ALP) assay on TCPS, glass and Ti in control and osteogenic media. a) human mesenchymal stem cells (hMSC), b) human gingival fibroblasts (HGF-1) and c) osteoblasts (MC3T3-E1). ALP activity after 7, 14 and 21 days of culture expressed in nmol/min/mg of protein (Mean  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$  compared with TCPS and # $p < 0.05$  compared with glass).

**Figure 7:** Red alizarin staining on TCPS in control and osteogenic media for human mesenchymal stem cells (hMSC), human gingival fibroblasts (HGF-1) and osteoblasts (MC3T3-E1) after 28 days of culture (bar scale: 1000  $\mu\text{m}$ ).

**Figure 8:** Time course study of osteogenic differentiation by acid extraction of Alizarin Red S staining on the different surfaces in control and osteogenic media. a) human mesenchymal stem cells (hMSC), b) human gingival fibroblasts (HGF-1) and c) osteoblasts (MC3T3-E1) after 14, 21 and 28 days of culture. Samples in osteogenic conditions were diluted 4 times. Data are expressed as the absorbance (405 nm) mean ( $n=4$ ) with error bars representing  $\pm$  SEM (\* $p < 0.05$  compared with TCPS and # $p < 0.05$  compared with glass).

**Table 1**

Surfaces	Ra ( $\mu\text{m}$ )	XPS	Contact angle (degree)	Zeta potential (mV)
TCPS	$0.005 \pm 0.002$	C, O	$64,8 \pm 2,1$	$-29.4 \pm 0,4$
Glass	$0,00021 \pm 0.00003$	Si, O, Na, C*	$45,8 \pm 4,8$	$-42.5 \pm 0.3$
Ti	$0.04 \pm 0.015$	Ti, O, C*	$75,3 \pm 3,0$	$-35.9 \pm 0.8$

Figure n°1

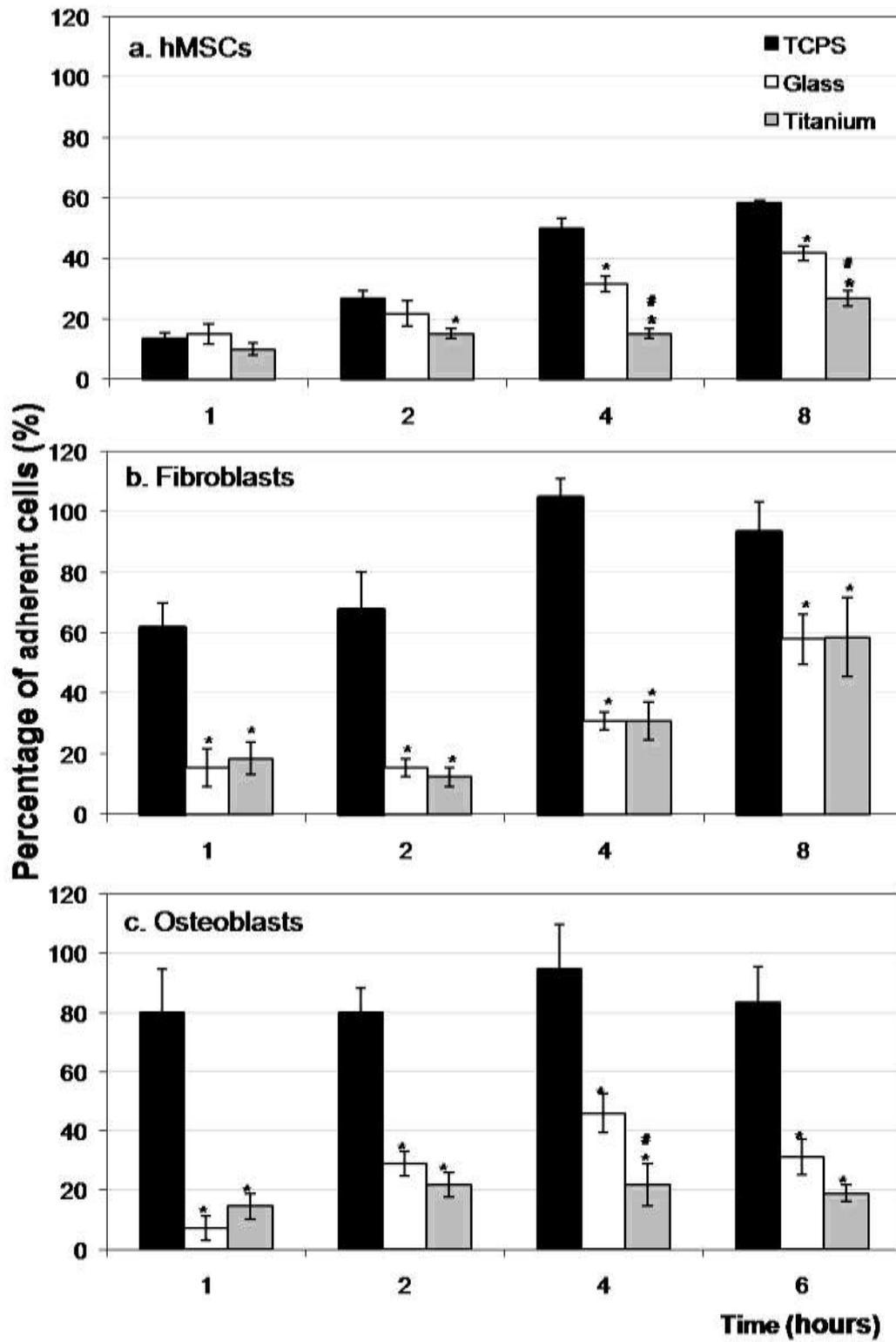


Figure n° 2

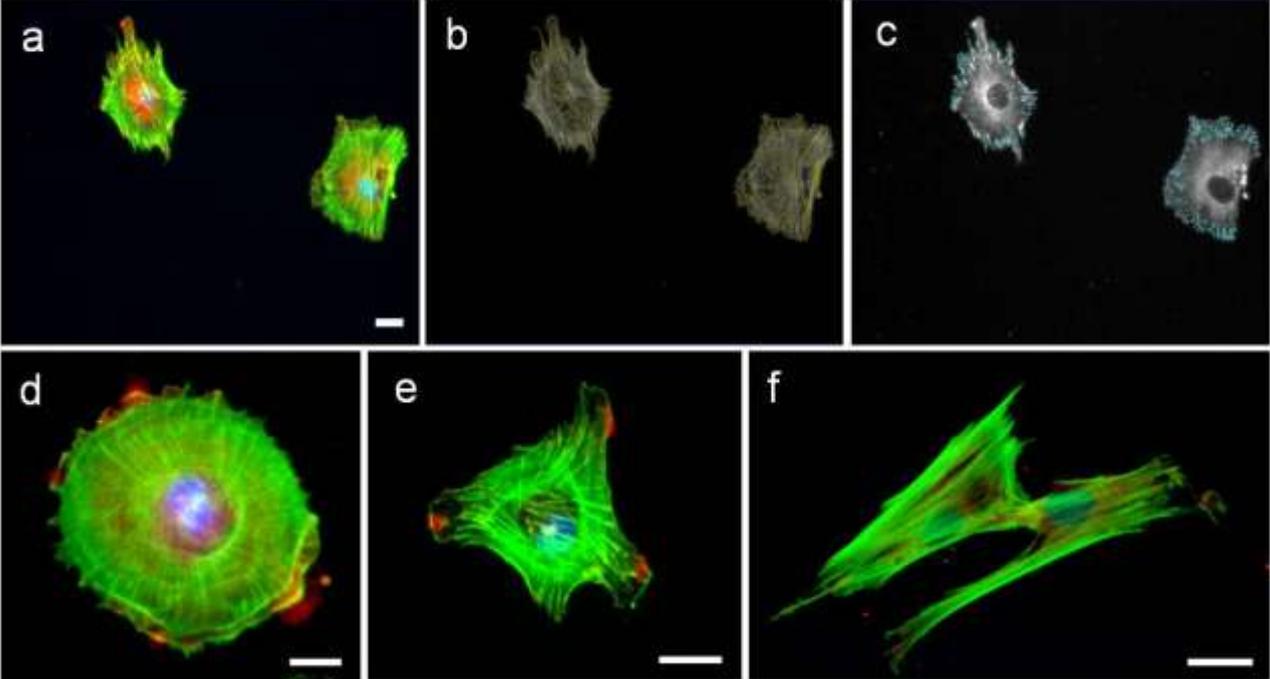


Figure n°3

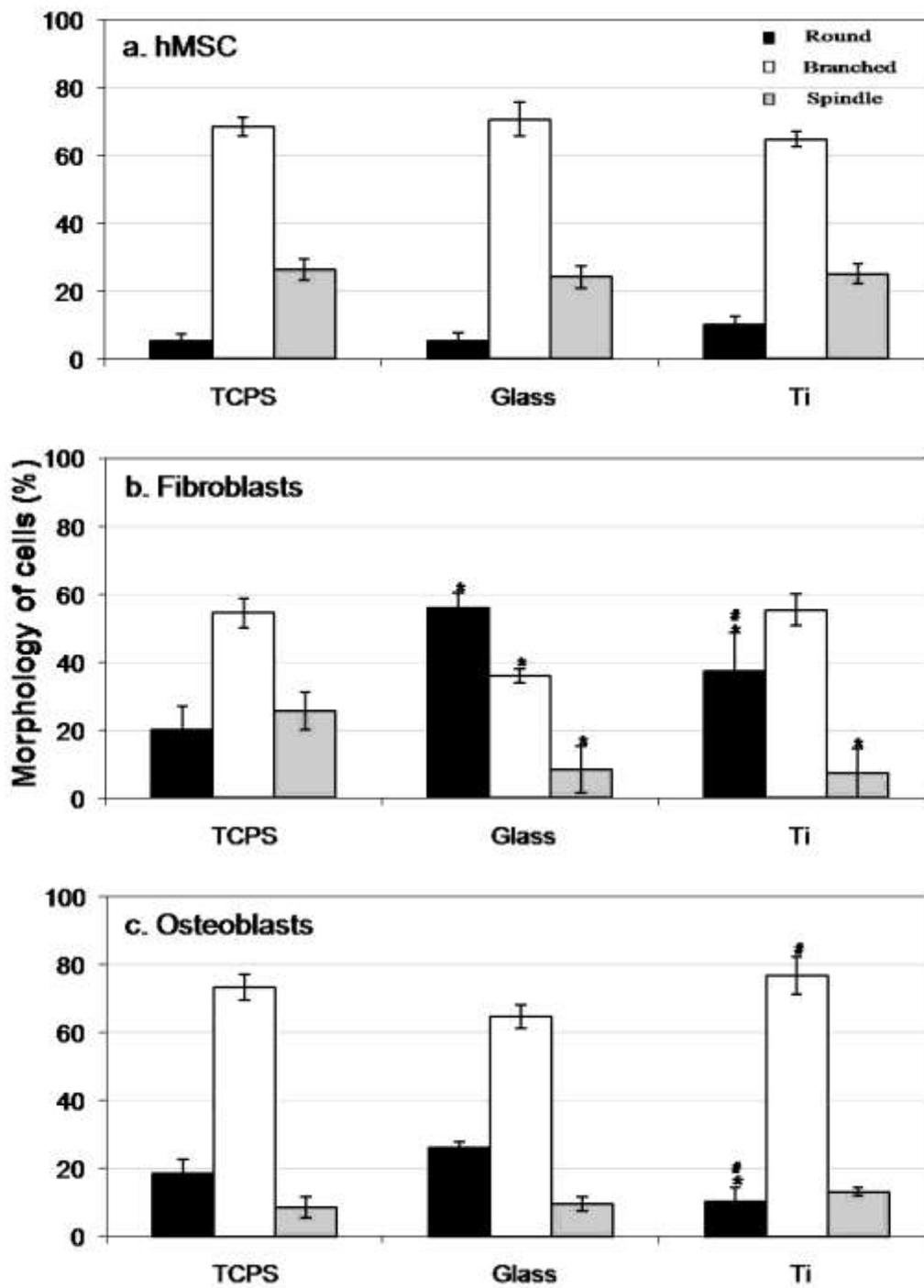


Figure n°4

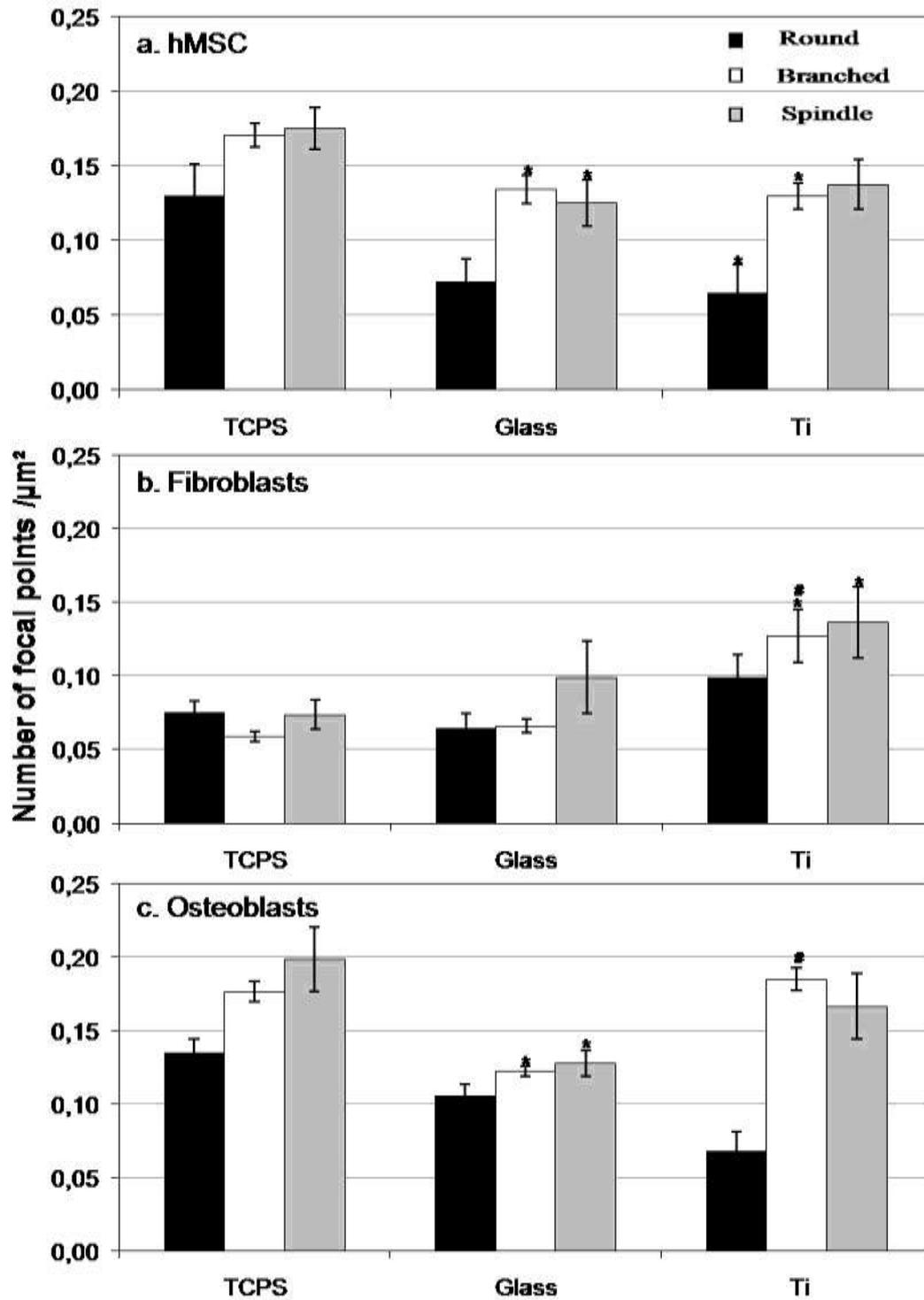


Figure n°5

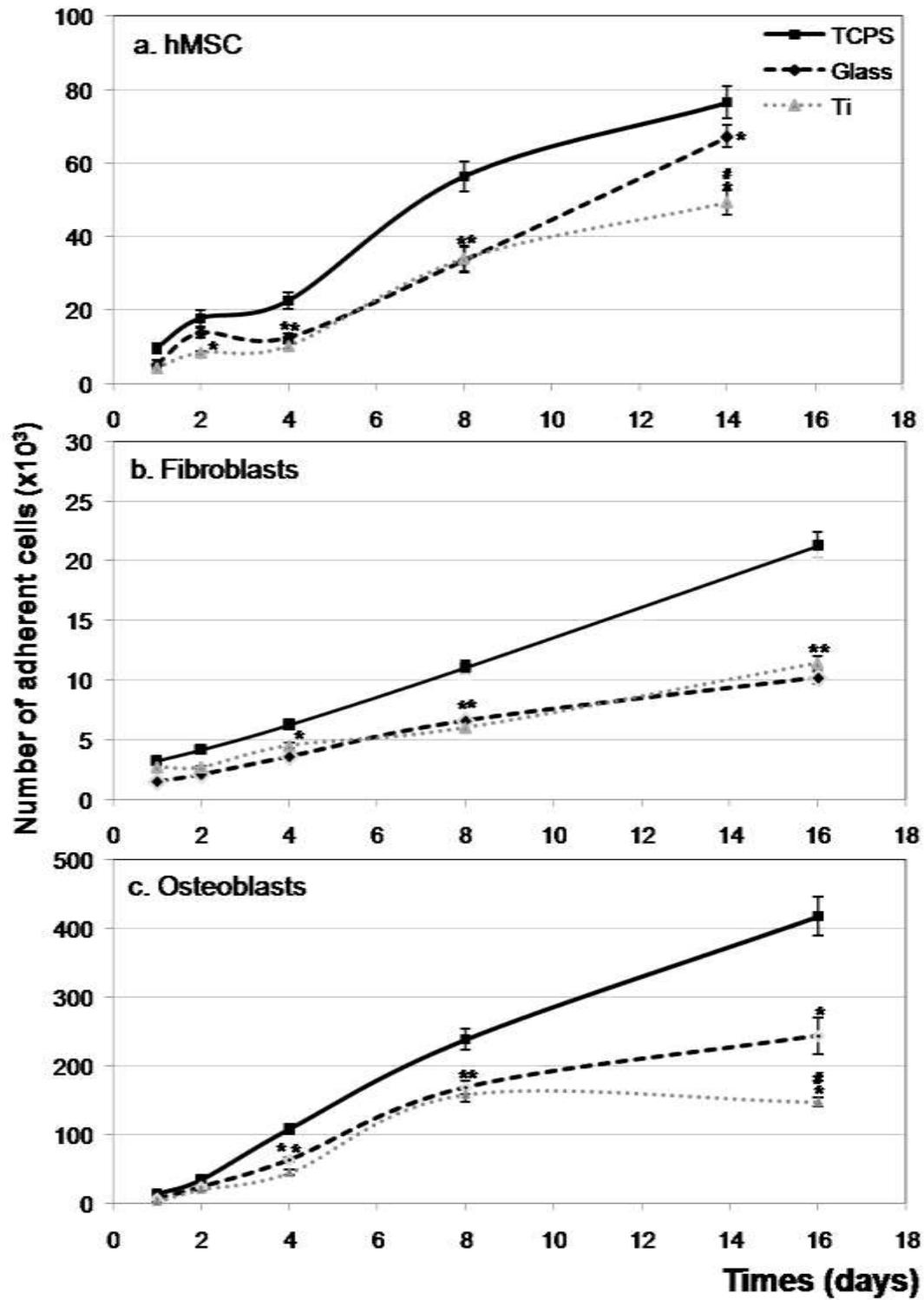


Figure n° 6

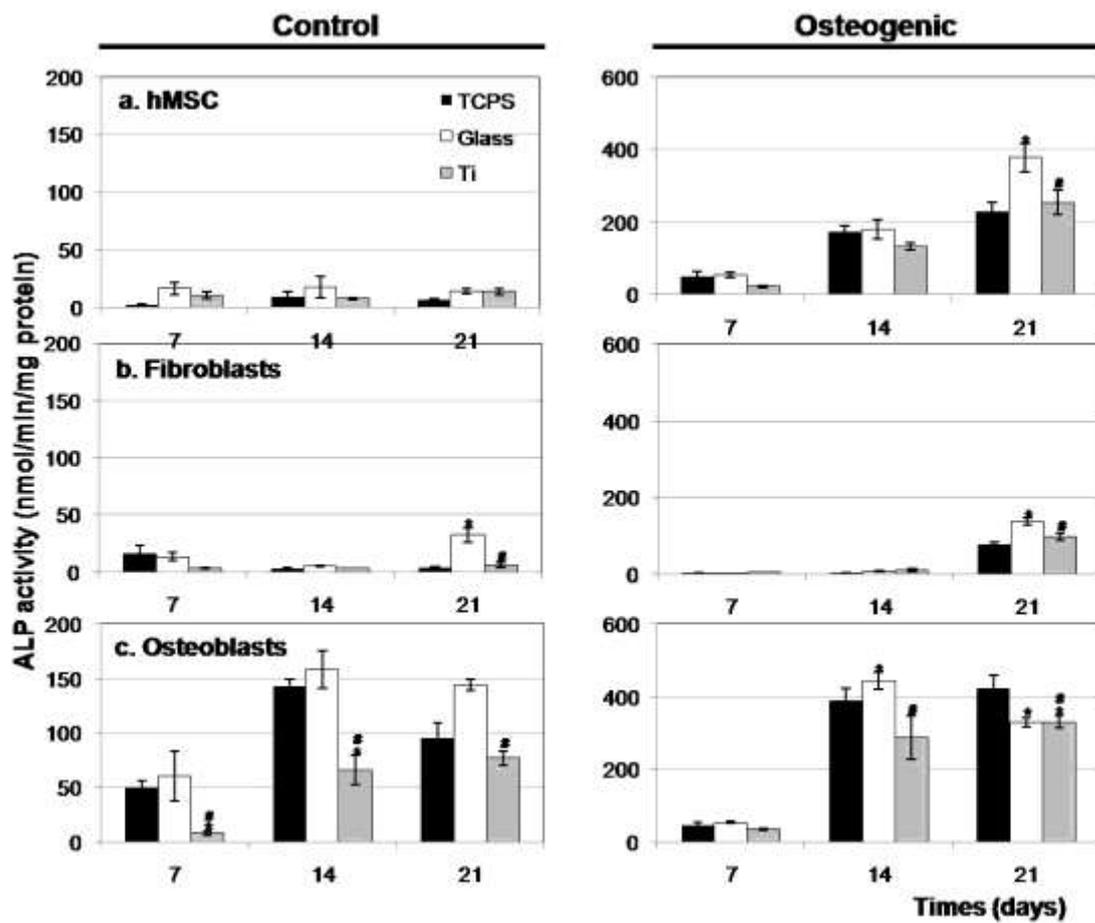


Figure n°7

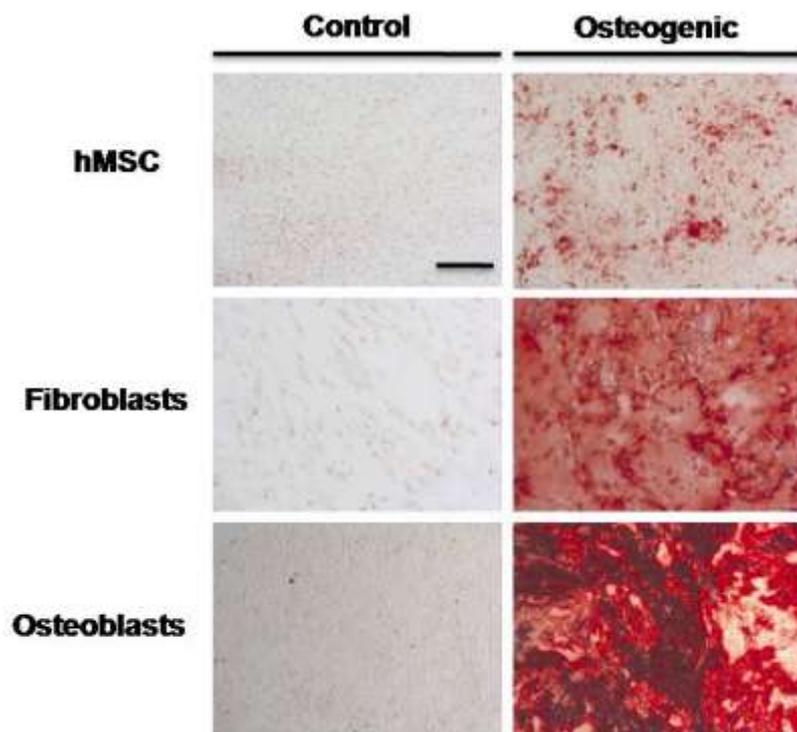
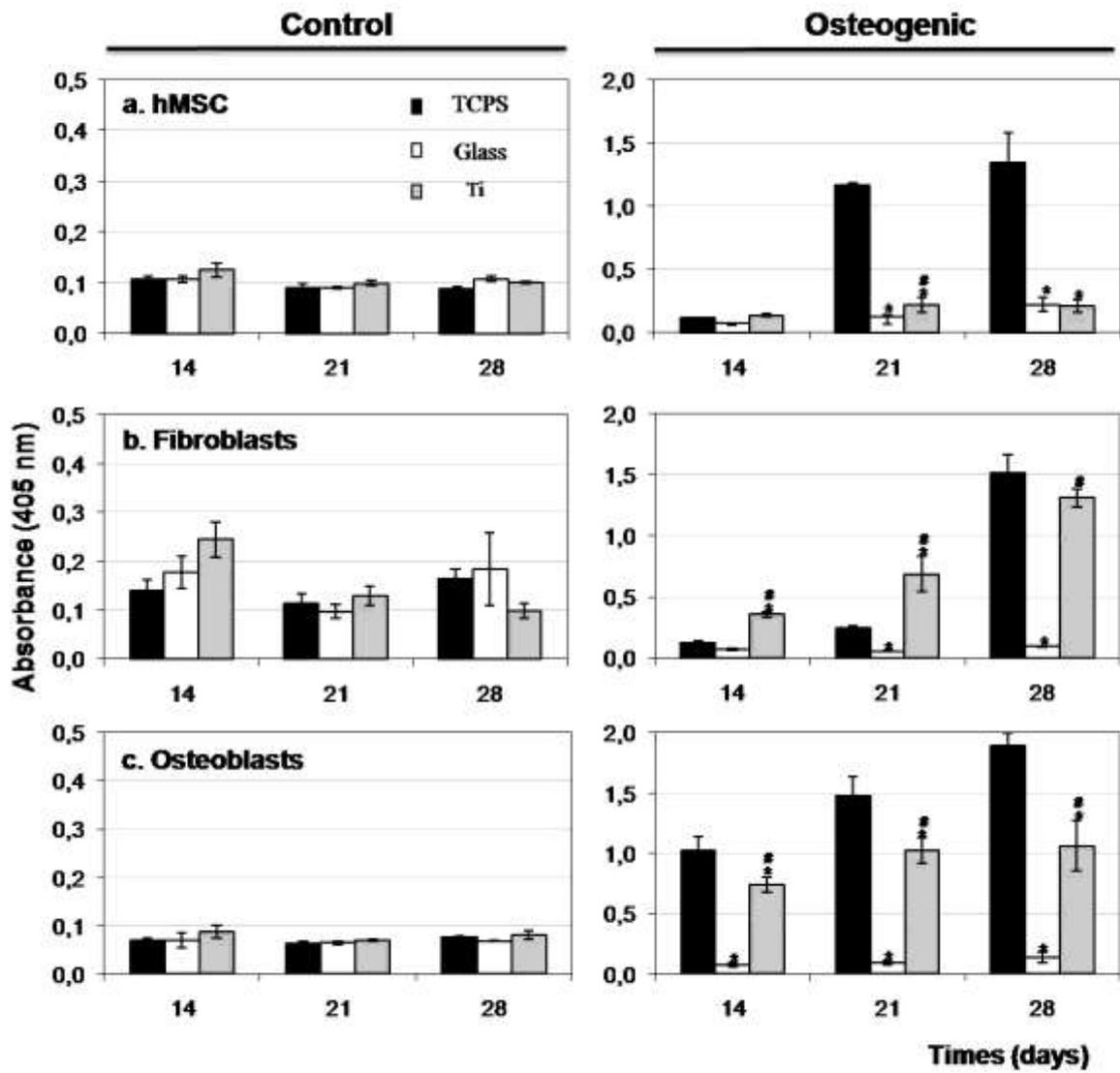


Figure n°8



### III. Discussion

Dans cette étude, le comportement de hCSM sur différents substrats lisses a été examiné et comparé à celui de fibroblastes et d'ostéoblastes. Le TCPS, le verre et le titane (Ti), présentaient une rugosité similaire à un niveau micrométrique.

L'objectif principal de cette étude était de trouver une corrélation possible entre les premières étapes de l'adhésion, la différenciation cellulaire et les propriétés de surface. Des auteurs ont constaté que l'adhésion cellulaire sur des implants ayant une topographie et une chimie différentes permet une différenciation vers différents types cellulaires (Engler et al. 2006; Dalby et al. 2007). Par exemple, la différenciation ostéoblastique a été observée sur des surfaces de titane rugueuses obtenues par traitement chimique alors que sur des surfaces de titane lisse, poli-miroir, la différenciation est de type fibroblastique. Pendant l'adhésion cellulaire, différentes intégrines sont exprimées et transfèrent les informations de la surface au noyau via le cytosquelette d'actine modifiant l'expression génique. Olivares-Navarrete et al. ont récemment constaté que les cellules interagissent avec le substrat via l'intégrine  $\alpha2\beta1$  et sécrète du dkk2 (Dickkopf-related protein 2), un facteur impliqué dans les voies Wnt lequel active la différenciation ostéoblastique (Olivares-Navarrete et al. 2008; Yajima et al. 1984). Engler et collaborateur (Engler et al. 2006) ont démontré que les cellules peuvent 'sentir' l'élasticité de la surface et se différencier en lignée ostéoblastique, myoblastique et neuronale en fonction de la rigidité des substrats. Ils ont observé des morphologies cellulaires et l'expression génique en fonction de l'élasticité de la surface.

Dans notre étude, les hCSM présentaient des morphologies différentes (ronde, étoilée ou allongée) en fonction de l'état d'adhésion sur les substrats. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence une différence de répartition de la morphologie cellulaire en fonction des substrats. De plus, nous avons constaté que l'attachement des hCSM est significativement plus important sur le TCPS que sur le verre et le Ti. Ce résultat a été confirmé par le comptage des noyaux marqués au hoestch. La quantité des fibroblastes et des ostéoblastes adhérentes étaient significativement plus importante sur tous les substrats comparés aux hCSM. Depuis les travaux de Friedenstein en 1976, le TCPS est le substrat standard pour l'isolement et la culture des hCSM (Lalykina et al. 1976). De nombreux auteurs ont amélioré l'adhésion des hCSM sur les biomatériaux par des revêtements de fibronectine ou de collagène de type I (Ogura et al. 2004; Salaszyk et al. 2004). En fonction des surfaces et des

propriétés considérées, les hCSM peuvent utiliser des mécanismes d'adhésion cellulaire différents par rapport à ceux des ostéoblastes et des fibroblastes.

Afin d'étudier les différences d'adhésion cellulaire sur les différentes surfaces, nous avons développé une méthode quantitative utilisant l'immunomarquage de la vinculine et l'analyse d'image. Le nombre de point focaux donné par l'immunomarquage de la vinculine, a été déterminé pour les 3 types cellulaires sur chaque substrat. La vinculine est une protéine membranaire associée aux complexes d'adhésion et peut ainsi être utilisée comme un marqueur des complexes associés aux intégrines (Critchley 2000). La densité des points focaux des hCSM sur le TCPS était comparable à celles des ostéoblastes indépendamment de la forme cellulaire. En corroborant les cellules comptées, le nombre de points focaux des hCSM sur le verre est plus faible que sur le TCPS et le Ti. Nous avons aussi constaté que le nombre de points focaux est similaire entre les hCSM et les fibroblastes sur le Ti.

Afin de démontrer un rôle possible des propriétés de surface sur la différenciation ostéoblastique des hCSM, nous avons mesuré l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) et la minéralisation par coloration au rouge alizarine. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus pour les ostéoblastes et les fibroblastes sur les différents substrats dans les milieux contrôle et ostéogénique. Après 28 jours de culture dans le milieu ostéogénique, des nodules de minéralisation ont été observés pour les cellules ostéoblastiques. Au contraire, un marquage au rouge alizarine sans nodule de minéralisation a été observé pour les cellules fibroblastiques comme décrit précédemment par Yajima et ses collaborateurs (Yajima et al. 1984). La différenciation ostéogénique des hCSM sur le TCPS semble être comparable à celle des cellules ostéoblastiques. La coloration au rouge alizarine de hCSM cultivées sur le Ti est comparable à celle des cellules fibroblastiques. Nous avons aussi constaté que le nombre de points focaux sur le Ti est comparable à celui trouvé sur les fibroblastes. Ces résultats suggèrent que les hCSM se différencient en cellules fibroblastiques sur le titane poli miroir. D'autres études ont confirmé que les hCSM se différencient en lignée ostéoblastique sur des surfaces en titane rugueuses plutôt que sur du titane lisse (Puckett et al. 2008; Yao et al. 2008). Cependant, cette hypothèse doit être confirmée par des études systématiques d'expression de gènes ostéoblastiques et de marqueurs cellulaires.

En conclusion de cette étude, l'adhésion, la prolifération et la différenciation de hCSM, de fibroblastes gingivaux et d'ostéoblastes ont été comparées sur du TCPS, du verre et du Ti poli

miroir. Comme précédemment décrit, l'adhésion des hCSM est plus importante sur le TCPS que sur les autres substrats. Cette meilleure adhésion est corrélée à un nombre important de point focaux et de cellules ayant une morphologie étoilée observée en utilisant un système d'analyse d'image. Une bonne corrélation a été trouvée entre le nombre de cellules adhérentes et le taux de prolifération cellulaire. La quantification de la coloration au rouge alizarine a indiqué que les hCSM et les ostéoblastes étaient plus différenciées sur le TCPS que sur le verre et le Ti.

En général, les propriétés de surface telles que la rugosité, la mouillabilité et la composition chimique modulent le comportement cellulaire. Par conséquent, les premiers événements notamment l'adhésion cellulaire, peuvent influencer la différenciation des hMSC qui conditionne la cicatrisation tissulaire autour des biomatériaux implantés.

# Chapitre IV

## Etude des interactions cellules/surfaces nanostructurées

### Article 3:

**Adhesion and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on titanium nanopores**

Lavenus S., Berreur M., Trichet V., Louarn G., Layrolle P.

Under soumission, Nanoletters

### Article 4:

**Cell differentiation and osteointegration influenced by nanoscale anodized titanium surfaces**

Lavenus S., Trichet V., Lechevalier S., Amiaud J., Hoorneart A., Louarn G., Layrolle P.

Under soumission, Biomaterials

## I. Introduction

Les implants en titane sont couramment utilisés dans la chirurgie dentaire pour restaurer la dentition et en orthopédie pour les replacements d'articulation du genou et les prothèses totales de hanche. Un des challenges de l'implantologie est d'obtenir une ostéointégration rapide pour une mise en charge immédiate. De nombreuses études ont montré qu'il existe une relation étroite entre les événements à court terme de la cicatrisation osseuse dans la région péri-implantaire et le taux de succès cliniques à long terme. Afin de promouvoir l'ancrage biologique des implants métalliques au squelette, différents traitements de surface ont été développés. L'objectif est de modifier les propriétés biologiques de surface afin d'en améliorer l'adsorption protéique, l'adhésion et la différenciation cellulaire et par conséquent, l'intégration tissulaire. Les propriétés biologiques sont liées à la composition chimique, la mouillabilité et la rugosité des surfaces implantaires métalliques. De récentes études ont montré que l'adhésion ainsi que la différenciation cellulaire sont modifiées par la taille de la topographie au niveau nanométrique (Le Guehennec et al. 2008). L'implication de la topographie doit cependant être confirmée par l'étude de l'expression génique de CSM sur différentes surfaces nanostructurées. Afin de comprendre ces interactions cellules, des surfaces normalisées, bien caractérisées et reproductibles doivent être utilisées.

Le premier événement après l'implantation est l'adsorption de protéines du sang sur la surface implantaire. La nature et la conformation des protéines sur l'implant sont influencées par les propriétés de surface dont la composition chimique, la mouillabilité et la micro- et la nanotopographie (Protivínský et al. 2007; Cai et al. 2006). Des études ont montré que la nanotopographie ne contrôle pas seulement l'adsorption protéique, mais aussi la morphologie et l'adhésion cellulaire (Yang et al. 2002; Zhao et al. 2007). La plupart des études ont examiné le potentiel ostéogénique des surfaces implantaires *in vitro* en utilisant des ostéoblastes immatures ou des lignées ostéoblastiques (Dalby et al. 2007; Dalby et al. 2006; Dalby et al. 2006). Cependant, les premières cellules qui colonisent la surface implantaire, sont les cellules souches mésenchymateuses. Les CSM périphériques sont attirées autour de la région péri-implantaire par des molécules chimio-attractantes et sont capables de migrer à travers le clou plaquettaire pour coloniser la surface implantaire (Caplan 1991; Caplan 2009). Les CSM sont des cellules multipotentes présentes dans le sang, la moelle osseuse et les autres tissus à faible concentration. Sous le contrôle de facteurs spécifiques tels que les cytokines, les facteurs de croissance ou le micro-environnement, les CSM ont la capacité de se différencier en ostéoblastes, chondroblastes, myoblastes ou adipocytes. L'expérimentation *in vitro* a mis en

évidence la capacité des cellules à répondre à leur microenvironnement (Curtis & Varde 1964). Par exemple, l'élasticité du substrat contrôle la différenciation de CSM comme récemment démontré par Engler et coll (Engler et al. 2006). D'autres études ont démontré que nanotopographie influence le comportement cellulaire (Curtis et al. 2001; Dalby et al. 2007; Stevens & George 2005). La nature des tissus autour de l'implant est donc dépendante de la différenciation des CSM induite par les propriétés de surface (Kassem 2006).

La topographie de surface va induire un stress mécanique au niveau du cytosquelette qui va modifier l'expression génique et ainsi la différenciation (Kilian et al. 2010; Olivares-Navarrete et al. 2010; Watson 1991). Tandis que la nature de l'adhésion cellulaire et le degré de tension du cytosquelette sont largement acceptés comme les effecteurs du comportement des cellules souches, le rôle précis de la nanotopographie sur l'adhésion, la morphologie et la différenciation des cellules n'est pas encore établi. Il a été montré que l'utilisation de nanopores disposés de manière aléatoire stimule la différenciation ostéoblastique des CSM et permet la minéralisation *in vitro* en absence de facteurs ostéogéniques (Dalby et al. 2007). Cependant, ces études n'ont pas été reproduites sur des substrats en titane pouvant avoir une haute importance pour les applications dentaires et orthopédiques. Dans cette perspective, Olivares-Navarrete et al. ont étudié l'expression de l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  et la différenciation ostéogénique de cellules ostéoblastiques sur du titane microstructurés. Néanmoins, l'influence des propriétés de surface sur l'expression des intégrines en corrélation avec les contraintes mécaniques du cytosquelette et la différenciation des CSM n'a pas encore été étudié sur du titane nanostructuré.

De récentes études ont mis en évidence que les nanotubes de titane obtenu par anodisation contrôlent l'adhésion et la différenciation ostéogénique des CSM (Oh et al. 2009; Park et al. 2007). Ces études ont montré que des nanotubes de 30 nm de diamètre promeuvent l'adhésion mais sans différenciation notable, tandis que des nanotubes de plus grand diamètre (70 ou 100 nm) induisent l'allongement cellulaire, la tension du cytosquelette et la différenciation sélective en cellules ostéoblastiques. D'autre part, des études ont mis en évidence l'ostéointégration d'implants en titane anodisés implantés dans des modèles animaux (Sul 2002a; Sul et al. 2005; Sul et al. 2002). Au mieux de notre connaissance, il n'y a aucune corrélation entre la nanostructure permettant la meilleure différenciation ostéoblastique et l'intégration tissulaire osseuse.

Dans ce contexte, l'objectif de ce chapitre est l'étude des interactions à court et à long terme des cellules souches mésenchymateuses avec des surfaces nanostructurées en utilisant des techniques de biologie cellulaire et moléculaire ainsi que la confirmation de l'ostéointégration du titane anodisé implanté dans des tibias de rats par des études histologiques et des essais mécaniques. Les nanostructures avec des pores de 30, 50, 100, 200 et 400 nm ont été préparées par 2 techniques puis caractérisées.

Dans la première étude, nous avons utilisé une technique d'évaporation en phase gazeuse (PVD : Physical Vapor Deposition) pour couvrir des membranes de polycarbonate nanoporées afin de produire des substrats de titane avec des tailles de pores contrôlées, mais de distribution aléatoire. Par cette technique, des surfaces avec des pores de 30, 150 et 300 nm de diamètre ont été produites (surface Ti 30, Ti 150 et Ti 300). Du verre recouvert de titane par la même méthode a servi de contrôle. L'évaporation en phase gazeuse réalisée dans une enceinte sous vide nous a permis de déposer une couche de 5 nm de titane de manière homogène sur les substrats. Brièvement, l'évaporation du titane (matériau source) est obtenue par effet Joule. Les dépôts sont réalisés sous vide poussé de façon à conférer une grande pureté à la couche déposée. Plus la pression est basse, plus les trajectoires des particules vaporisées seront rectilignes (voir Chapitre 2, section 1.4). Dans ce cas, seules les parties du substrat directement en regard de la source sont recouvertes. Dans cette étude, des CSM humaines ont été cultivées sur ces substrats de quelques heures à quelques jours. L'adhésion cellulaire a été caractérisée par marquage et analyse d'image ainsi qu'en utilisant des PCR array dédiés aux protéines de l'adhésion et de la matrice extracellulaire et confirmée par l'étude de l'expression d'intégrine par qPCR. Nous avons ensuite cherché à corréler les résultats obtenus sur l'adhésion cellulaire à ceux de la différenciation ostéogénique des CSM sur les substrats en titane nanostructurés en comparaison au titane lisse en présence ou absence de facteurs ostéogéniques.

Dans la seconde partie de cette étude, la technique d'anodisation a permis d'obtenir une surface en nid d'abeille avec des pores de 20, 30 et 50 nm de diamètre (surface Ti20, Ti30 et Ti50). Ces surfaces nanostructurées ont été obtenues sur des pastilles de titane utilisées pour les études *in vitro* et sur des fils de titane pour les études *in vivo*. Du verre recouvert de titane, du titane poli miroir et des fils non traités seront utilisés comme contrôle. L'objectif de cette étude est de corréler les interactions entre les CSM et les surfaces anodisées avec l'intégration tissulaire des implants en titane nanostructurés. Les CSM ont été cultivées sur des surfaces

nanostructurées pendant 1 et 3 semaines. Un PCR array ciblé sur l'ostéogénèse et des qPCR ont permis d'étudier la différenciation ostéoblastique de CSM sur les nanostructures. L'ostéointégration des implants lisses et anodisés a été comparée après 1 et 3 semaines d'implantation dans des tibias de rats par analyse histologique, histomorphométrique et des tests d'arrachement.

## **II. Article 3 : Effet des nanopores sur l'adhésion et la différenciation**

### **Adhesion and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on titanium nanopores**

Lavenus S., Berreur M., Trichet V., Louarn G., Layrolle P.

Under submission to Nanoletters

#### **Résumé:**

Les implants en titane sont largement utilisés en orthopédie et en chirurgie dentaire. Les propriétés de surface jouent un rôle majeur dans les interactions cellulaires et tissulaires. L'adhésion et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses ont été étudiées en fonction des nanostructures. Les surfaces de titane avec nanopores de 30, 150 et 300 nm de diamètre ont été préparées par dépôt physique en phase vapeur. Des PCR array ont indiqué que l'expression des intégrines est modulée par la taille des nanopores. Les hMSC présentaient une morphologie cellulaire 'étoilée' sur le Ti 30 comparé aux autres surfaces. Ti 30 et Ti 150 induisent la différenciation ostéoblastique alors que Ti 300 a un effet limité. En général, les nanopores de 30 nm peuvent promouvoir une différenciation ostéoblastique précoce et par conséquent, l'ostéointégration rapide du titane implanté.

# **Adhesion and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on titanium nanopores**

Sandrine Lavenus<sup>1,2</sup>, Martine Berreur<sup>1</sup>, Valérie trichet<sup>1</sup>, Guy Louarn<sup>2</sup>, Pierre Layrolle<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Inserm U957, Bone resorption physiopathology and primary bone tumor therapy, Faculty of Medicine, University of Nantes, France

<sup>2</sup> Institut des Matériaux Jean Rouxel (IMN), CNRS – University of Nantes, France

\*Corresponding author:

Pierre layrolle, PhD, Director of research, Inserm U957, LPRO, faculty of Medicine, 1 Rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France. Tel.: (33) 2 72 64 11 43; Fax: (33) 2 40 41 28 60. E-mail address: pierre.layrolle@univ-nantes.fr

To be submitted to: NanoLetters

Date of submission: September 2010

## Abstract

Titanium implants are widely used in orthopedic and dental surgery. Surface properties play a major role in the cell and tissue interactions. The adhesion and differentiation of mesenchymal stem cells were studied as function of nanostructures. Titanium surfaces with nanopores of 30, 150 and 300 nm in diameter were prepared by physical vapor deposition. PCR arrays indicated that the expression of integrins was modulated by the size of nanopores. Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) exhibited a more branched cell morphology on the Ti 30 than on other surfaces. Ti 30 and Ti 150 induced osteoblastic differentiation while the Ti 300 had a limited effect. Overall, nanopores of 30 nm may promote an early osteoblastic differentiation and consequently a rapid osseointegration of titanium implants.

**Keywords:** titanium nanopores, mesenchymal stem cells, cell adhesion, cell morphology, integrins, osteogenic differentiation

## 1. Introduction

Titanium implants are widely used in dental and orthopedic surgery because of favourable mechanical and biocompatible properties. Numerous studies have shown that the early events of bone healing around implants are related to their long term clinical success (Davies 2003b; Marco et al. 2005). In order to promote the osseointegration of implants, various surface treatments have been proposed. The objective of these surface treatments is to improve protein adsorption, cellular adhesion and differentiation and consequently, the tissue integration of titanium implants. It has been recently shown that nanometer sized features control the adhesion and osteogenic differentiation of cells (Matthew J Dalby, Nikolaj Gadegaard, Adam S G Curtis et al. 2007; Le Guéhennec et al. 2007) but these results have not been confirmed on titanium.

Most studies have examined the osteogenic potential of implant surfaces *in vitro* by using immature osteoblasts or osteoblasts cell lines (Dalby et al. 2006; Dalby et al. 2006; Le Guehennec 2008). However, the first type of cells which colonizes the surface after implantation is mesenchymal stem cells (MSC). Peripheral MSCs are attracted in the peri implant region via chemio attractant molecules and able to migrate through the blood clot to colonize the implant surface (A I Caplan 2009; Arnold I Caplan & Dennis 2006). MSC are multipotent cells present in blood, bone marrow and other tissues at low levels. Under the control of specific cues (e.g. cytokines, growth factors, or micro environment), MSCs have the capacity to differentiate into osteoblasts (Marinucci et al. 2010), chondroblasts (Zannettino et al. 2008), myoblasts (Engler et al. 2006) and adipocytes (Morganstein et al. 2010). The nature of tissue around implants may well depend on the differentiation of MSCs induced by their surface properties (Kassem 2006).

The first event after implantation is the adsorption of blood proteins on the surface of the implant. The nature and conformation of proteins on the implant are regulated by surface properties in particular chemical composition, wettability and micro- and nano-topography (Protivínský et al. 2007; Cai et al. 2006). It has been shown that nano topography does not only control the adsorption of proteins but also the morphology and adhesion of cells (Yunzhi Yang et al. 2002; Zhao et al. 2007). *In vitro* experiments have shown that cells can respond to their micro environment (A S Curtis & Varde 1964). For instance, the elasticity of substrate controlled the MSCs differentiation as recently demonstrated by Engler and coll. (Engler et al. 2006). Other studies have demonstrated that nanotopography influenced cell behavior (Matthew J Dalby, Nikolaj Gadegaard, Adam S G Curtis et al. 2007; Stevens & George 2005; A S Curtis et al. 2001). Surface topography induced mechanical stress in the cytoskeleton that control gene expression and thus differentiation (Kilian et al. 2010; Olivares-Navarrete et al. 2010; P. A. Watson 1991). While the nature of cellular adhesion and the degree of cytoskeletal tension are widely accepted as effectors of stem cells behavior, the precise role of nanotopography on the adhesion, morphology and differentiation of cells is not yet established. However, the use of nanoscale disorder to stimulate human MSCs (hMSCs) differentiation and promote bone mineral *in vitro* have been demonstrated in the absence of osteogenic factors (Matthew J Dalby, Nikolaj Gadegaard, Adam S G Curtis et al. 2007). However, these results have not been reproduced on titanium substrates that of high relevance for orthopedic and dental applications. In this prospect, Olivares-Navarrete and coll. (R Olivares-Navarrete et al. 2008) have studied the expression of integrin  $\alpha 2\beta 1$  and osteogenic differentiation of osteoblastic cells on Ti

microstructures. Nevertheless, the influence of surface properties on the expression of other integrins in correlation to mechanical stress and osteogenic differentiation of hMSCs was not yet investigated on nanostructured titanium. Here, we have used physical vapor deposition (PVD) to coat nanoporous polycarbonate membranes for producing titanium substrates with control size, but random nanostructures. Surfaces with pores of 30, 150 and 300 nm in diameter were produced and planar titanium was used as control. Human MSCs were cultured on these substrates from hours to days and cell adhesion was characterized by using fluorescence staining and image analysis, polymerase chain reaction (PCR) arrays and integrin expression. The results obtained on cell adhesion were correlated to the osteogenic differentiation of hMSCs on the nanostructured Ti in comparison Ti planar substrates with or without osteogenic supplements.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Polycarbonate membranes with nanometer sized pores of 30, 150 and 300 nm in diameter were purchased from Whatman (Nucleopore<sup>TM</sup>, Invitrogen, France). The membranes were punched into discs measuring 14 mm in diameter. Glass coverslip discs, 14 mm in diameter, were also used (VWR, Fontenay sous Bois, France). The materials were coated with a thin layer of titanium by plasma vapor deposition (PVD). About 30 samples were placed in a chamber at  $10^{-6}$  mbar using a vacuum turbomolecular pump (Alcatel 550 Turbo). The evaporation of titanium was conducted at 100 mA by using a current generator (Eurotherm 94). The thickness of the titanium film was monitored by using a quartz balance installed inside the evaporation chamber. A titanium film of 5 nm in thickness was uniformly deposited on glass and membrane discs in 30-90 s. After coating, the samples were cleaned in 70 % ethanol, then in deionised water and

finally dried in air. The materials were sterilized by ethylene oxide after double packaging in sealed bags. The glass coverslip discs coated with a thin titanium layer were abbreviated Ti and used as control. The membranes with nanopores coated with titanium were named Ti 30, Ti 150 and Ti 300.

## **2.2. Physico-chemical analysis of the surfaces**

Three samples of each group (n=3) were analysed by scanning electron microscopy (SEM, LEO VP1450, Zeiss, Germany), atomic force microscopy (AFM) and by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS, Leybold LHS12, Germany). XPS analysis of the surfaces was conducted by using aluminium  $K_{\alpha}$  X-ray radiation source at 1486.6 eV and Scan system control. The pressure in the chamber was less than  $2 \times 10^{-9}$  Torr before the data were taken, and the current of the anode was 12 kV.

## **2.3. Cell culture**

Human mesenchymal stem cells (hMSC) were obtained from bone marrow cell aspirations harvested in the iliac crest of patients undergoing orthopaedic surgery and after receiving informed consent (Etablissement Francais du Sang, Centre-Atlantique, Tours, France). The experiments were repeated with at least 3 different bone marrow cell aspirations from patients of different age, sex and origin. Bone marrow cells were plated in 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (Corning) with 15 ml of culture medium. Standard culture medium consisted of alpha modified Eagle medium ( $\alpha$ -MEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA) supplemented with 10 % foetal calf serum (FCS, biotech GmbH, Aidenbach, Germany), 2 mM of L-glutamine, 100  $\mu$ g/ml of streptomycin and 100 Units/ml of penicillin. The culture medium was refreshed every 2 days and adherent hMSC were cultured until 80 % confluence in a humidified atmosphere, 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C. Cells were detached by using trypsin/EDTA (0.05 % v/v, Gibco,

Invitrogen, Carlsbad, USA) for 5 min. In order to test the different substrates with a homogenous cell population, the hMSC were cryopreserved at the end of the first passage. Prior to seeding on the different substrates, the cells were thawed and cultured in 75 cm<sup>2</sup> flasks for 2-4 days. At confluence, cells were harvested using trypsin-EDTA and counted on Malassez's haemocytometer by using trypan blue exclusion dye.

## **2.4. Cell seeding on the surfaces**

Ti 30, Ti 150 and Ti 300 membrane discs were put into 12-well dishes and blocked by using a glass cylinder giving an internal diameter of 14 mm. All substrates including the Ti control had a surface of 2 cm<sup>2</sup>. Three samples per group were used and the experiments were reproduced at least three times. The same cell seeding density of 10.000 cells/cm<sup>2</sup>. Cell suspensions (500  $\mu$ l) were rapidly (less than 10 min) poured into each well. Cells were cultured onto the different substrates for 2, 4 hours and 1, 6, 12, 18 and 21 days.

## **2.5. Actin, vinculin and nuclei staining**

hMSC were seeded and incubated on the different substrates for 2, 4 hours, 1 and 6 days as previously described in section 2.4. After removing the culture medium, wells were rinsed three times with phosphate buffer saline (PBS, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA). Cells were fixed with 4 % paraformaldehyde (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) for 20 min and then washed three more times to remove excess paraformaldehyde. Samples were stored at 4 °C until staining for actin, vinculin and nuclei. Fixed cells were first permeabilised with 0.5 % triton (x100, Sigma, St. Quentin Fallavier, France) in PBS at 4 °C for 15 min. In order to reduce non-specific background, samples were blocked with PBS containing 1 % bovine serum albumin (BSA, Sigma) for 10 min at 37 °C. After blocking, PBS/BSA was discarded and the samples were first incubated for 1 hour with Alexafluor 488-phalloidin (Molecular

Probe, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) at a dilution of 1:40 in 10 mg/ml BSA in PBS at 37 °C in the dark. Between each incubation, the samples were rinsed twice with PBS-0.05 % Tween (Sigma). Antivinculin (Monoclonal Anti-vinculin clone hVIN-1, Sigma) at a dilution of 1:100 in 1 % BSA/PBS was added to each well for 1 hour at 37 °C in the dark and 30 min with secondary rabbit anti-mouse antibody (A11061, Molecular Probe, Invitrogen) at a dilution of 1:200 at room temperature. Ultimately, samples were incubated with Hoechst (Sigma) for 10 min at room temperature, and washed twice with deionised water. Samples were stored at 4 °C before fluorescence imaging (Nikon Eclipse, TE2000E, Champigny Sur Marne, France).

## **2.6. Image analysis of cell morphology**

After staining the actin, vinculin and nuclei, fluorescent images were analysed by a custom-made programme using an image analysis system (Quantimet Q550, Leica, UK). Four images were recorded at a magnification of x10 and x20 for each staining. A semi-automatic binary treatment was performed on each image. The number of cells attached to the substrates was automatically counted using nuclei staining. Actin staining was used for identification of cell shapes into round, branched and spindle cell morphology. Cell areas were also measured for each type of cell morphology, giving insights into the spreading of cells on surfaces. The number of focal points was counted per cell for each type of cell morphology and normalized by the cell areas for each cell morphology. For each condition, a range of 80 to 300 cells was analysed.

## **2.7. PCR array and Real-time RT-qPCR assay**

RT profiler PCR arrays for Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules (PAHS-013D, SA Biosciences, Tebu-bio) were first used to reveal genes whose expression may change depending of the nanostructured surface. For PCR

arrays, hMSCs were seeded on substrates at density of 10.000 cells/cm<sup>2</sup> as previously described. In order to obtain sufficient RNA concentration, 12 and 4 replicate wells were pooled for day 1 and 6, respectively. The cells were lysed and total RNA was extracted using Macherey-Nagel Nucleospin RNA XS kit. Total RNA was quantified by spectrophotometer at 260 nm wavelength (Nanodrop, labtech, Palaiseau) and the integrity of RNA was checked thanks to the 28S/18S ration after Agilent electrophoresis. After quantification and quality control, PCR array was performed according to manufacturers' instructions. Online software from Tebu-bio was used for detection of expressed genes (<http://www.sabiosciences.com>). Genes selected by PCR array analysis were validated by using real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR). The same culture conditions as previously described were used and experiments were reproduced at least 3 times. Total RNA (250 ng) was used in cDNA synthesis at 37 °C for 1 h with 0.5 µg random primers (Promega, Charbonnière, France) 5X RT buffer, 0.5mM dNTP mix (Eurobio, Les Ulis, France), 20U RNaseOUT and 400U M-MLV reverse transcriptase. The realtime PCR contained 5 ng cDNA, 300 nM forward and reverse primers and 5 µl 2x SYBR green buffer (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) in a final volume of 10 µl. Polymerase chain reactions were carried out in triplicate from several RNA extractions, in 96-well plates using the Chromo4 System (Bio-Rad). Oligonucleotides used were synthesized by Eurogentec (Angers, France) for ITGα3, ITGα3, ITGα3, ITGβ1, ITGβ5 and LAMA2 as described in Table 1.

## **2.8. Differentiation gene expression**

Total RNA was extracted using Macherey-Nagel Nucleospin RNA XS kit after 6, 12 and 21 days of culture in control and osteogenic medium on the different surface. The osteogenic medium consisted

of standard medium supplemented with 10 mM of  $\beta$ -Glycerophosphate (Sigma), 0.2 mM ascorbic acid (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) and  $10^{-8}$  M dexamethaxone (Sigma). After quantification and quality control, RT-qPCR was performed as previously described. Oligonucleotides used were synthesized for RUNX2, COL1a1, BSP, OCN and ALP described in Table 1.

### 2.9. Red alizarin staining

Alizarin red staining was performed after 28 days of culture in order to corroborate osteogenic gene expression. The mineralisation assay was determined on each substrate in both standard and osteogenic media. The culture medium was discarded, confluent cell layers were washed with PBS and staining with Alizarin Red S (2 %, pH 4.2, Merck) was performed for 2 minutes. After aspiration of the overflow, cells were washed 3 times with water. Staining layers were visualised with binoculars and phase microscopy using an inverted microscope (Nikon).

### 2.10. Statistical analysis

Samples were characterized in triplicate in order to ensure consistency of physico-chemical analysis ( $n=3/\text{group}$ ). Cell culture experiments were reproduced at least three times using 3 samples per group. Data were averaged with the standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using ANOVA (SPSS 16.0 software) and considered significant for  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Characterization of surfaces

Figure 1 shows the plain and nanoporous titanium coated surfaces. The control Ti group consisted of a thin layer of titanium uniformly deposited on the Glass cover slips (Figure 1a). SEM and AFM observations indicated that the average surface roughness ( $R_a$ ) of Ti was 0.2 nm over  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  (data not shown). The

titanium coating was also uniform on the nanoporous polycarbonate membranes (Figure 1b-d). The nanopores were not closed by the layer of titanium which had a thickness between 5.0 and 5.7 nm. The diameter and the density of pores are reported in Table 2. The pore diameters were 33.4, 148.9 and 293.1 nm for the membrane called Ti 30, Ti 150 and Ti 300, respectively. The chemical composition of the Ti coating was also determined by XPS (Figure 1e). All coated substrates exhibited peaks corresponding to titanium oxide ( $\text{TiO}_2$ ) as well as oxygen and carbon resulting from the polycarbonate membrane.

### 3.2. Cell morphology and focal point density

In order to discriminate the state of cell adhesion on the substrates, 3 different cell shapes were determined. As shown in Figure 2, round, branched and spindle cell shapes were discriminated after 2, 4 hours, 1 and 6 days for hMSCs on the different substrates. The initial state of adhesion was characterized by round morphology (Fig. 2a). Examples of branched and spindle cell morphology are shown in Fig. 2b and 2c, respectively. We have previously determined that hMSCs cultured for 24 hours on Tissue culture polystyrene (TCPS) had a prominent spindle fibroblastic shape while osteoblastic cells exhibited a branched shape (data under submission). The quantitative assessment of cell morphology on Ti (control) and Ti 30, Ti 150 and Ti 300 is shown in Figure 2d. Overall, the number of round cells decreased with culture time. After 1 and 6 days, the number of round cells remained around 5 %, probably resulting from cell division.

After 2 and 4 hours, hMSCs had a prominent branched shape whatever the substrates. After 1 day, hMSCs exhibited difference in cell morphology as function of surfaces. Cells had predominantly a typical spindle shape, with 58 and 61 % on

Ti and Ti 300, respectively. On the Ti 30 surface, hMSCs exhibited mainly a branched shape whereas the percentages of branched and spindle cells were comparable for Ti 150. After day 6, the number of spindle shape was more important on Ti 150 (45 %) while the proportions were similar (20 %) for all other surfaces.

Figure 3 shows the number of focal points as function of cell morphology, culture time and surfaces. The number of focal points was first determined without discriminating cell morphology (Figure 3a). The density of focal points increased with culture time indicating the spreading of cells on substrates. After 2 hours, Ti 300 had a significant greater density of focal point whereas after 4 hours, Ti 30 had the higher density than on other surfaces. After 1 day, Ti 150 exhibited a significant higher number of focal points than on the Ti control group, but reached a plateau. After 6 days, the densities were higher for Ti 30 and Ti 300 than for other substrates. Following the significant observed effect of nanotopography for all shapes, the density of focal points was discriminated as function branched and spindle morphology. The round morphology was not considered as relatively low in proportion. Figure 3b exhibits the density of focal points for the branched shape. A similar trend as previously described for gathered shapes was observed. The differences in focal points appeared prominent for the spindle morphology at day 6 (Figure 3c). The densities of focal points were greater for cells cultured on nanoporous titanium substrates as compare to the planar Ti control. However, differences were not found between surfaces for other culture times. In a general way, the density of the focal points was more important on Ti 30, these surfaces seemed more convenient to cell adhesion.

### **3.3. Integrin and extracellular matrix gene expression**

Following the observed significant affect of nanotopography on the hMSCs morphology, adhesion and extracellular matrix molecules RT<sup>2</sup> Profiler PCR arrays were used to decipher particular gene expression on Ti, Ti 30, Ti 150 and Ti 300 surfaces (Figure 4). The arrays profiled the expression of 84 genes important for cell-cell and cell-matrix interactions. Since the most prominent differences in cell morphology were observed after day 1, PCR arrays were conducted at this culture period. Planar Ti was used as control surface and was fixed to null. The expression of 61 genes were unaffected with an amplitude of variation lower than 2 fold for cells on Ti 30, Ti 150 and Ti 300 as compared to Ti, while 25 genes over expressed of cells on nanoporous titanium surface compared to plain surface (Figure 4). In particular, 18 genes were more under expressed on Ti 30 than on the other surfaces among which 3 collagens, 6 integrins and 4 metalloprotease (MMP2, MMP14, MMP16 and SPG7) MMP. In contrast, on Ti 150, only 3 genes (VCAN, CTNBN1, ITG $\alpha$ V) were slightly under expressed than on the other surfaces. On Ti 300, 6 genes (COL7a1, ITG $\alpha$ 4, ITG $\beta$ 5, SPG7, TIMP2 and CLEC3B) were over expressed as compared with Ti 30 and Ti 150 and MMP1 was expressed more than 2 fold compared to Ti surface. In summary, Ti 150 and Ti 300 seemed to have a comparable behavior whereas Ti 30 was different. The nanostructured surfaces influenced the cell adhesion by modulating the expression of integrins and other extracellular matrix molecules. The PCR array demonstrated that cells cultured on nanostructured surface exhibited different levels of adhesion and extracellular molecule depending on the pore size of titanium substrates.

In order to confirm the PCR array results, a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used with primers for integrin subunits  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ V,  $\beta$ 1 and  $\beta$ 5 and laminin  $\alpha$ 2 (LAMA2). The RT-qPCR was performed after 1 and 6 days of culture

(Figure 5) similarly as for the cell morphology and the density of focal points. In agreement with the PCR array analysis, hMSC cultured on nanostructured surfaces had different expression depending on the surface. As shown in Figure 5, slightly difference of variation was observed for the subunit  $\alpha 3$ . Nevertheless, this subunit was less expressed after 1 day but more expressed after 6 days for Ti 30 and Ti 150 as compared to control. The expression of this gene was similar for Ti 300 as control after day 1 and slightly lower at day 6. No significant difference was observed for the expression of the subunit  $\alpha 4$  after day 1 whereas it was lower at day 6 for Ti 30 and Ti 300. The subunit  $\alpha V$  was less expressed on nanostructured titanium surfaces at day 1, but appeared on Ti 30 more expressed at day 6. The subunit  $\beta 1$  exhibited the most striking variations with a less expression for Ti 30 at day 1. This gene was less expressed for Ti 30 and Ti 150 at day 1, and inversevely more expressed for Ti 150 at day 6 and Ti 300 at day 1. No difference in subunit  $\beta 5$  gene expression was observed on Ti 30 and Ti 150 at both times. For Ti 300, it is firstly more expressed and then less expressed. The expression of Laminin 2 was similar as control for Ti 30, lower for Ti 150 at the tow delays whereas the gene was respectively less and more expressed on Ti 300 after day 1 and 6.

In summary, the PCR array and the RT-qPCR result together indicate that nanopore size modulate the expression of protein involve in the adhesion.

### **3.4 Osteogenic differentiation on the nanostructured Ti surfaces**

As like for cell adhesion, the nanostructure of titanium may also control the differentiation of hMSC. The osteogenic differentiation of hMSC cultured on nanostructured Ti (Ti nano) was investigated by RT-qPCR after 6, 12 and 21 days of culture. The expression of genes on Ti nano was compared to plain Ti in

standard and osteogenic culture conditions. The RT-qPCR results are reported in Figure 6 after normalization to the negative Ti control.

Despite an induction of ALP in osteogenic condition (Ti osteo), we didn't observe difference on Ti nano. However for gene up-regulated during osteoblastic differentiation, we observe difference between the surfaces at different time except for the expression of COL1a1 gene. No significant difference was observed on all Ti surfaces as compared to the control at all time periods, except for the expression of COL1a1 which was even lower for Ti 300 at day 12 than for the positive and negative control (Ti osteo and Ti). At day 12, RUNX2 was more expressed on Ti 30 and Ti 300 as compared to Ti. In comparison to osteogenic conditions (Ti osteo), the expression of RUNX2 on Ti 30 and Ti 300 was similar at day 6 and 12. At day 21, the expression of RUNX2 on Ti 150 was however similar to the positive control (Ti osteo). For the BSP gene, an early up-regulation was observed for Ti 300 only as compared to Ti osteo and others surfaces. In contrast, BSP on Ti 30 was equivalent to its expression on the positive control (Ti osteo) at all time periods. The expression of OCN didn't change for day 6 and 12 in osteogenic condition as compared to negative control. However, an up-regulation of OCN was induced by Ti 30 and Ti 150 as soon as day 12 and for Ti 300 at day 21. In a general trend, pore size induced up-regulation of gene involved during osteoblastic differentiation such as RUNX2, BSP and OCN. These regulation was similar or early compared to osteogenic condition.

In the attempt to test the mineralization of the matrix, alizarin red S staining was performed in standard and osteogenic culture conditions after 28 days (Figure 7). Staining for mineralisation was negative for cell cultured in standard medium on Ti and Ti 300 while a positive staining was observed on Ti 30 and Ti 150 and it

seemed to be more important on Ti 30. In osteogenic conditions, alizarin staining was positive for cell cultured on all substrates.

#### 4. Discussion

It has been recently shown that nanometer sized features control the adhesion and osteogenic differentiation of cells (Le Guehennec, et al. 2008) but these results have not been confirmed on nanostructured titanium. Topographical features provide essential chemical and physical cues that cells can recognize and elicit cellular functions including preferential adhesion, migration, proliferation, and expression of specific cell phenotype to bring desired effects. The main hypothesis is that an ideal titanium implant would influence the stem cell to differentiate into mature osteoblasts for a direct bone apposition, rather than fibroblastic cells resulting in fibrous tissue encapsulation. It has been established that integrins are the links between cells and ECM and serve as signal transducers for regulating cell growth, differentiation and motility (Assoian & X Zhu 1997; Clark & Brugge 1995; Damsky & Werb 1992; Kumar 1998; Lafrenie & Yamada 1996). Here, we show the influence of nanostructured titanium surfaces on both the expression of adhesion proteins such as integrins and on the osteogenic differentiation of hMSCs.

In this study, nanostructured titanium having pores of 30, 150 and 300 nm as well as control plain Ti served as substrates for culturing hMSCs. After 1 day, hMSCs exhibited difference in cell morphology as function of surfaces. Cells had predominantly a typical spindle shape, with 58 and 61 % on Ti and Ti 300, respectively. On the Ti 30 surface, hMSCs exhibited mainly a branched shape whereas the percentages of branched and spindle cells were comparable for Ti 150. The density of the focal points was more important on Ti 30 and Ti 300. These surfaces seemed more convenient to cell adhesion. The qPCR indicated that the

nanostructure influenced slightly the expression of integrins which are prominent in cell adhesion. Staining for mineralisation was negative for cell cultured in standard medium on Ti and Ti 300 while a positive staining was observed on Ti 30 and Ti 150 and seemed to be more important on Ti 30. Overall, the Ti 30 surface was the most potent nanostructure for osteogenic differentiation of hMSCs.

In this study, we were able to notice differences in gene expression depending on titanium pore sizes by using PCR array for adhesion and extracellular molecules. These variations concerned the expression of integrins, collagen and metalloproteinases. hMSCs cultured on Ti 150 and Ti 300 seemed to have a comparable behavior whereas Ti 30 was different. The nanostructured surfaces influenced the cell adhesion by modulating the expression of integrins such as ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 5$ ) and other extracellular matrix molecules like laminin2. As integrins are receptor molecules for extracellular matrix molecules (e.g., the  $\beta 1$  family), serum components ( $\alpha_v$  family) and immunoglobulin family adhesion molecules ( $\beta 2$  family), these molecules are obviously critical in cell behavior. Previous studies have identified that integrin  $\beta 1$  is required for osteoblastic differentiation on Ti substrate with microscale (R Olivares-Navarrete et al. 2008; L. Wang et al. 2006). Furthermore,  $\beta 1$  integrin recognizes the counter receptor VCAM-1 presents on endothelial cells and the ECM proteins like fibronectin, collagen and vitronectin (Chuluyan et al. 1995; T. B. Issekutz 1995; Meerschaert & Furie 1995). Moreover, TGF- $\beta$  increases expression of the integrin  $\beta 5$  gene in osteoblastic cell lines by mechanisms involving Sp1/Sp3 and Smad transcription factors (Lai et al. 2000). In our study, we observed slight but significant variations in the expressions of  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  subunits and  $\alpha V$  as well as sub-units  $\beta 1$  and  $\beta 5$ . For instance,  $\alpha 3$  and  $\alpha V$  subunits were less expressed on Ti 30 and

Ti 150 at day 1 and then at day 6, no variation with the control was observed. The expression of integrins after 1 and 6 days of culture seemed to be similar for the pores size of 30 or 150 nm. The correlation between integrins expression and differentiation of hMSC in the context of their interactions to biomaterial surfaces has been poorly investigated. Most of available studies concerned differentiated cells. For instance, it has been found that osteoblasts at the bone surface express high levels of  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha v\beta3$  and  $\alpha V\beta5$  (Hughes et al. 1993; Hultenby et al. 1993) while the adhesion of osteoblasts to vitronectin is mediated specifically by  $\alpha V\beta5$ . The  $\alpha5\beta1$  integrin is a cell surface receptor for fibronectin that has been implicated in cell spreading, proliferation, differentiation, migration, and survival in different cell types (Jonathan D Humphries et al. 2006; Hamidouche et al. 2009; Moursi et al. 1997). However, blocking  $\alpha5\beta1$  using antibodies did not affect differentiation of osteoblasts cultured on rough Ti, suggesting that an alternate integrins partner may be involved.

Cell adhesion via integrins to a variety of extracellular matrix proteins, such as fibronectin, collagen, and laminin is a potent regulator of cell growth, differentiation, and gene expression. As illustrated in Figure 8, when integrins bind to ECM proteins, they physically link the ECM to the actin cytoskeleton (Clark & Brugge 1995). Ligand binding on integrins initiates a number of metabolic changes including activation of serine/threonine and tyrosine kinases, increased  $Ca^{2+}$  influx, increased cytoplasmic alkalinization, altered inositol lipid metabolism and changes in cell morphology (Lafrenie & Yamada 1996). In addition, adhesion-dependent signaling pathways that regulate the actin cytoskeleton are also required for many of the functional responses elicited by integrin-mediated cell adhesion. The talin and actin-binding protein vinculin and the focal adhesion tyrosine kinase (FAK) are incorporated next to the focal adhesion

complex, strengthening the ECM-cytoskeleton contact across the integrin. The vinculin binding site exposed in the talin rod (Gingras et al. 2006), incorporation with talin-bound actin (Hvidt 1991), activate vinculin. The vinculin tail domain also interacts with paxillin which is involved in ECM-bound integrin recruitment (Arold et al. 2002; Hayashi et al. 2002). Recruitment of the actin-bonding homodimer  $\alpha$ -actinin is a later event in formation of focal adhesion (Zaidel-Bar et al. 2003). Here, we observed the cell morphology on the different nanostructured surfaces at different time. No difference in cell morphology was observed after few hours but differences were clearly visible after 1 day of culture on the substrates. hMSCs had predominantly a typical spindle shape on Ti and Ti 300. On the Ti 30 surface, hMSCs exhibited mainly a branched shape whereas the percentages of branched and spindle cells were comparable for Ti 150. These differences in cell morphology corroborated that cells on Ti 30 exhibited a different compartment than on Ti, Ti 150 and Ti 300 as shown for gene expression. Moreover, after 1 day of culture, the density of the focal points was more prominent to the branched morphology. On the other hand, the density of focal points was more related to the spindle shape at day 6. Overall, the Ti 30 surface seemed to induce a branched morphology with numerous focal points than other nanostructures.

While differentiation may cause changes in cell shape, several studies have noted that cell morphology can also alter the differentiation of mesenchymal lineage. It has been shown that round cells promoted adipogenesis while cells with high spreading preferred an osteoblast fate. These studies demonstrated that mechanical cues embodied in cell shape, cytoskeletal tension and RhoA signalling, are integral to the commitment of stem cell fate (McBeath et al. 2004). In our work, hMSC exhibited a high spreading with a

branched morphology on Ti 30 after 1 day of cultured while on the other substrate the shape was predominately spindle. This branched shape may increase contractility of the cytoskeleton and led to a preferential osteoblastic differentiation. Similarly, it has been shown that round shape induced low contractibility resulting in an adipocyte differentiation of MSCs(Kilian et al. 2010). The spindle morphology observed on the other substrates may be due to a non-differentiating state or fibroblastic lineage of MSC. In our study, the Ti 30 nanostructure induced a branched morphology that may promote an osteogenic differentiation.

In order to validate the hypothesis that nanostructure influenced cell differentiation, we have studied the osteogenic gene expression by RT-qPCR and the mineralization by red alizarin staining on the different substrates. A previous study considering hMSCs differentiation and topography has been carried out using nanometer roughness and hMSCs at 14 days(Matthew J Dalby, Nikolaj Gadegaard, Adam S G Curtis et al. 2007). In this study, the authors have demonstrated that nanoscale disorder stimulated (2 fold) osteoblastic gene expression (OCN and ALP) in the absence of osteogenic factor. In agreement with this study, we showed that the nanopore caused slight but significant changes in osteoblastic gene expression in a size depending manner. We found that cells proliferated up to 6-12 days and started to produce early differentiation markers (OCN, OPN, BSP) in agreement with other studies(G. S. Stein & J. B. Lian 1993). By day 28, the mineralization was clearly visible on Ti 30 and Ti 150 nanostructures without osteogenic factor. Additionally, these nanostructures seemed to promote the differentiation of hMSCs into osteoblastic cells.

Considering titanium implant surfaces, these nanostructures may direct osteogenic differentiation of stem cells for a direct bone apposition. Cells arriving on the

implant surfaces express differently integrins that would impact on the cytoskeleton tension. Such changes in cytoskeleton tension will have a direct effect on cell morphology observed by actin staining. The changes in cells morphology leading by cytoskeletal tension have an effect indirect mechanotransduction pathway as demonstrated by changes in RhoA expression in MSCs response to hardness material(Kilian et al. 2010; McBeath et al. 2004; C S Chen et al. 1997). It has also been speculated changes in cytoskeletal tension in response to topography could change interphase nucleus organization and hence more directly influence the cellular gene expression profiles(Adam Curtis et al. 2007; Matthew J Dalby, Nikolaj Gadegaard, Herzyk et al. 2007). Although nanostructures have an effect on the osteogenic differentiation of stem cells, the results should be confirmed by in vivo experiments studying bone tissue integration of implants.

## 5. Conclusion

In this study, we demonstrated the influence on nanotopography on the behavior of human mesenchymal stem cells. In particular, the expression of integrins, cell morphology and osteoblastic differentiation was affected by the nanostructured titanium surface. The expression of integrins was slightly but significantly modulated by the size of nanopores on titanium. hMSCs exhibited a more branched cell morphology on the Ti 30 surface as early as day 1 than on other surfaces. Moreover, the most potent nanostructure for osteogenic differentiation consisted of Ti 30 and Ti 150 while the Ti 300 had a limited effect. Nanopores of 30 nm may promote an early osteoblastic differentiation and consequently a rapid osseointegration of titanium implants.

## Conflict of interest:

None to declare.

## Acknowledgments:

The authors would like to acknowledge R. Bareille and J. Amédée for their technical assistance with cell immunostaining. Paul Pilet is acknowledged for his help in image analysis. The European Council (Reborne),

Inserm, SFBTM and the French Ministry of Research are acknowledged for supporting the PhD thesis of S. Lavenus. The authors are grateful to Kirsty Snaith of Medicis Traduction for grammar and spelling corrections of the manuscript.

## Bibliography

- (1) Davies, J. E. *J Dent Educ* 2003, 67, 932-949.
- (2) Marco, F.; Milena, F.; Gianluca, G.; Vittoria, O. *Micron* 2005, 36, 630-644.
- (3) Dalby, M. J.; Gadegaard, N.; Curtis, A. S. G.; Oreffo, R. O. C. *Curr Stem Cell Res Ther* 2007, 2, 129-138.
- (4) Le Guéhennec, L.; Soueidan, A.; Layrolle, P.; Amouriq, Y. *Dent Mater* 2007, 23, 844-854.
- (5) Dalby, M. J.; McCloy, D.; Robertson, M.; Wilkinson, C. D. W.; Oreffo, R. O. C. *Biomaterials* 2006, 27, 1306-1315.
- (6) Dalby, M. J.; McCloy, D.; Robertson, M.; Agheli, H.; Sutherland, D.; Affrossman, S.; Oreffo, R. O. C. *Biomaterials* 2006, 27, 2980-2987.
- (7) Le Guehennec, L. *Nanomedicine (Lond)* 2008, 3, 61-71.
- (8) Caplan, A. I. *J. Pathol* 2009, 217, 318-324.
- (9) Caplan, A. I.; Dennis, J. E. *J. Cell. Biochem* 2006, 98, 1076-1084.
- (10) Marinucci, L.; Balloni, S.; Becchetti, E.; Bistoni, G.; Calvi, E. M.; Lumare, E.; Ederli, F.; Locci, P. *Ann Biomed Eng* 2010, 38, 640-648.
- (11) Zannettino, A. C. W.; Paton, S.; Arthur, A.; Khor, F.; Itescu, S.; Gimble, J. M.; Gronthos, S. *J. Cell. Physiol* 2008, 214, 413-421.
- (12) Engler, A. J.; Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E. *Cell* 2006, 126, 677-689.
- (13) Morganstein, D. L.; Wu, P.; Mane, M. R.; Fisk, N. M.; White, R.; Parker, M. G. *Cell Res* 2010, 20, 434-444.
- (14) Kassem, M. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 2006, 1067, 436-442.
- (15) Protivínský, J.; Appleford, M.; Strnad, J.; Helebrant, A.; Ong, J. L. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007, 22, 542-550.
- (16) Cai, Bossert, J.; Jandt, K. D. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2006, 49, 136-144.
- (17) Yang, Y.; Tian, J.; Deng, L.; Ong, J. L. *Biomaterials* 2002, 23, 1383-1389.
- (18) Zhao, G.; Raines, A. L.; Wieland, M.; Schwartz, Z.; Boyan, B. D. *Biomaterials* 2007, 28, 2821-2829.
- (19) CURTIS, A. S.; VARDE, M. J. *Natl. Cancer Inst* 1964, 33, 15-26.
- (20) Stevens, M. M.; George, J. H. *Science* 2005, 310, 1135-1138.
- (21) Curtis, A. S.; Casey, B.; Gallagher, J. O.; Pasqui, D.; Wood, M. A.; Wilkinson, C. D. *Biophys. Chem* 2001, 94, 275-283.
- (22) Kilian, K. A.; Bugarija, B.; Lahn, B. T.; Mrksich, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2010, 107, 4872-4877.
- (23) Olivares-Navarrete, R.; Hyzy, S. L.; Hutton, D. L.; Erdman, C. P.; Wieland, M.; Boyan, B. D.; Schwartz, Z. *Biomaterials* 2010, 31, 2728-2735.
- (24) Watson, P. A. *FASEB J* 1991, 5, 2013-2019.
- (25) Olivares-Navarrete, R.; Raz, P.; Zhao, G.; Chen, J.; Wieland, M.; Cochran, D. L.; Chaudhri, R. A.; Ornoy, A.; Boyan, B. D.; Schwartz, Z. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2008, 105, 15767-15772.
- (26) Le Guehennec, L.; Lopez-Heredia, M.; Enkel, B.; Weiss, P.; Amouriq, Y.; Layrolle, P. *Acta Biomater* 2008, 4, 535-543.
- (27) Assoian, R. K.; Zhu, X. *Curr. Opin. Cell Biol* 1997, 9, 93-98.
- (28) Clark, E. A.; Brugge, J. S. *Science* 1995, 268, 233-239.
- (29) Damsky, C. H.; Werb, Z. *Curr. Opin. Cell Biol* 1992, 4, 772-781.
- (30) Kumar, C. C. *Oncogene* 1998, 17, 1365-1373.
- (31) Lafrenie, R. M.; Yamada, K. M. *J. Cell. Biochem* 1996, 61, 543-553.
- (32) Wang, L.; Zhao, G.; Olivares-Navarrete, R.; Bell, B. F.; Wieland, M.; Cochran, D. L.; Schwartz, Z.; Boyan, B. D. *Biomaterials* 2006, 27, 3716-3725.
- (33) Chuluyan, H. E.; Schall, T. J.; Yoshimura, T.; Issekutz, A. C. *J. Leukoc. Biol* 1995, 58, 71-79.
- (34) Issekutz, T. B. *J. Immunol* 1995, 154, 6533-6540.
- (35) Meerschaert, J.; Furie, M. B. *J. Immunol* 1995, 154, 4099-4112.

- (36) Lai, C. F.; Feng, X.; Nishimura, R.; Teitelbaum, S. L.; Avioli, L. V.; Ross, F. P.; Cheng, S. L. *J. Biol. Chem* 2000, 275, 36400-36406.
- (37) Hughes, D. E.; Salter, D. M.; Dedhar, S.; Simpson, R. J. *Bone Miner. Res* 1993, 8, 527-533.
- (38) Hultenby, K.; Reinholt, F. P.; Heinegård, D. *Eur. J. Cell Biol* 1993, 62, 86-93.
- (39) Humphries, J. D.; Byron, A.; Humphries, M. J. *J. Cell. Sci* 2006, 119, 3901-390
- (40) Hamidouche, Z.; Fromigué, O.; Ringe, J.; Häupl, T.; Vaudin, P.; Pagès, J.; Srouji, S.; Livne, E.; Marie, P. *J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2009, 106, 18587-18591.
- (41) Moursi, A. M.; Globus, R. K.; Damsky, C. H. *J. Cell. Sci* 1997, 110 ( Pt 18), 2187-2196.
- (42) Gingras, A. R.; Vogel, K.; Steinhoff, H.; Ziegler, W. H.; Patel, B.; Emsley, J.; Critchley, D. R.; Roberts, G. C. K.; Barsukov, I. L. *Biochemistry* 2006, 45, 1805-1817.
- (43) Hvidt, S. *Biophys. Chem* 1991, 39, 205-213.
- (44) Arold, S. T.; Hoellerer, M. K.; Noble, M. E. M. *Structure* 2002, 10, 319-327.
- (45) Hayashi, I.; Vuori, K.; Liddington, R. C. *Nat. Struct. Biol* 2002, 9, 101-106.
- (46) Zaidel-Bar, R.; Ballestrem, C.; Kam, Z.; Geiger, B. J. *Cell. Sci* 2003, 116, 4605-4613.
- (47) McBeath, R.; Pirone, D. M.; Nelson, C. M.; Bhadriraju, K.; Chen, C. S. *Dev. Cell* 2004, 6, 483-495.
- (48) Stein, G. S.; Lian, J. B. *Endocr. Rev* 1993, 14, 424-442.
- (49) Chen, C. S.; Mrksich, M.; Huang, S.; Whitesides, G. M.; Ingber, D. E. *Science* 1997, 276, 1425-1428.
- (50) Curtis, A.; Sokolikova-Csaderova, L.; Aitchison, G. *Biophys. J* 2007, 92, 2255-2261.
- (51) Dalby, M. J.; Gadegaard, N.; Herzyk, P.; Sutherland, D.; Agheli, H.; Wilkinson, C. D. W.; Curtis, A. S. G. *J. Cell. Biochem* 2007, 102, 1234-1244.

## Table and Figure captions

**Table 1:** Gene names and sequence primers for qPCR.

**Table 2:** Diameter and pore density of pore on Ti 30, Ti 150 and Ti 300

**Figure 1:** Characterization of plain and nanoporous titanium substrates by scanning electron microscopy and X-ray photoelectron spectroscopy. SEM micrographs of a) Ti, b) Ti30, c) Ti150, d) Ti300 and e) representative XPS spectra of titanium-coated surfaces.

**Figure 2:** Analysis of cell morphology on the nanoporous titanium substrates. Representative fluorescence images of hMSCs cultured on nanoporous Ti after staining of actin (green), vinculin (red) and nuclei (blue). a) round, b) branched and c) spindle cell morphology. d) Quantitative image analysis of cell morphology as a function of substrates for hMSC cultured for 2, 4 hours, 1 and 6 days of cultured on Ti, Ti 30, Ti 150 and Ti 300. n = 30-100 cells counted per condition. (Mean +/- SEM; \*p<0.05 as compared to Ti).

**Figure 3:** Number of focal adhesion points per surface area as a function of culture time on the different substrates. Focal point density for a) all cell shapes b) branched and c) spindle morphology. The number of focal adhesion points was determined per  $\mu\text{m}^2$  after 2h, 4h, 1 and 6 days after cell seeding on Ti, Ti 30, Ti 150 and Ti 300 surfaces. n=30-100 cells per condition. (Mean +/- SEM) \*: p<0.05, significant difference compared to Ti from the corresponding value.

**Figure 4:** Human extracellular matrix and adhesion molecule PCR array results for hMSCs cultured on plain control (Ti) and nanostructured surface (Ti 30, Ti 150 and Ti 300) for 1 day. The result was expressed in fold change with Value 0 for Ti.

**Figure 5:** Effects of nanostructured titanium surface on mRNA expression of selected adhesion genes in hMSCs cultured for 1 and 6 days on Ti substrate (Ti, Ti 30, Ti 150 and Ti 300). RT-PCR of mRNA of a) Integrin subunit A3; b) Integrin subunit A4; c) Integrin subunit AV; d) Integrin subunit B1; e) Integrin subunit B5 and f) LAMA2 normalized by RPL19. \* P<0.05, Ti nano vs Ti.

**Figure 6:** Effects of nanostructured titanium surface on mRNA expression of osteogenic genes in hMSCs cultured for 1 and 6 days on Ti substrate without osteogenic factor (Ti, Ti 30, Ti 150 and Ti 300) and with osteogenic factor (Ti osteo). RT-PCR of mRNA of a) ALP; b) COL1A1; c) RUNX2; d) BSP and e). OCN. \* P<0.05, Ti nano vs Ti.

**Figure 7:** Red alizarin staining in control and osteogenic media for hMSCs on control Ti and nanostructured Ti 30, Ti 150 and Ti 300 substrates after 28 days of culture (bar scale: 1000  $\mu\text{m}$ ).

**Table 1:**

Human gene				PCR product length
Name	NM number	Forward primer	Reverse primer	
RPL19	000981	gctctttccttcgctgct	cattggctctcattggggctct	122 nt
ITGA3	002204	tccgagtcaatgtccacaga	gctgggctaccctattcctc	88 nt
ITGA4	000885	ccttgtttagttcaattactcttgga	ccggccatccattttaga	104 nt
ITGAV	002210	ccttgctgctcttggaactc	attctgtggctgtcggagat	74 nt
ITGB1	002211	acaccagcagccgtgtaac	ttcgatgccatcatgcaa	73 nt
ITGB5	002213	gaggatgctaccgaccacag	gtccaacctgaccgtcctc	88 nt
Lama2	000426	aattgaagaagccggatttg	tgtttggccctgtatctg	76 nt
RUNX2	004348	ggcccacaaatctcagatcgtt	cactggcgctgcaacaagac	184 nt
COL1a1	000088	acatggaccagcagactggca	tactgtcttgccccaggct	153 nt
BSP	004967	cgaatacacggcgtcaatg	gtagctgtactcatctcataggc	109 nt
OCN	199173	ggcgctacctgtatcaatgg	tcagccaactcgtcacagtc	106 nt
ALP	000478	aacaccaccaggggaac	ggtcacaatgccacagatt	78nt

**Table 2:**

	Ti 30	Ti 150	Ti 300
Pore size (nm)	33,4 ± 0,7	148,9 ± 1,8	293,1 ± 1,6
Density per $\mu\text{m}^2$	8,9 ± 0,9	2,8 ± 0,3	1,2 ± 0,1

Figure 1

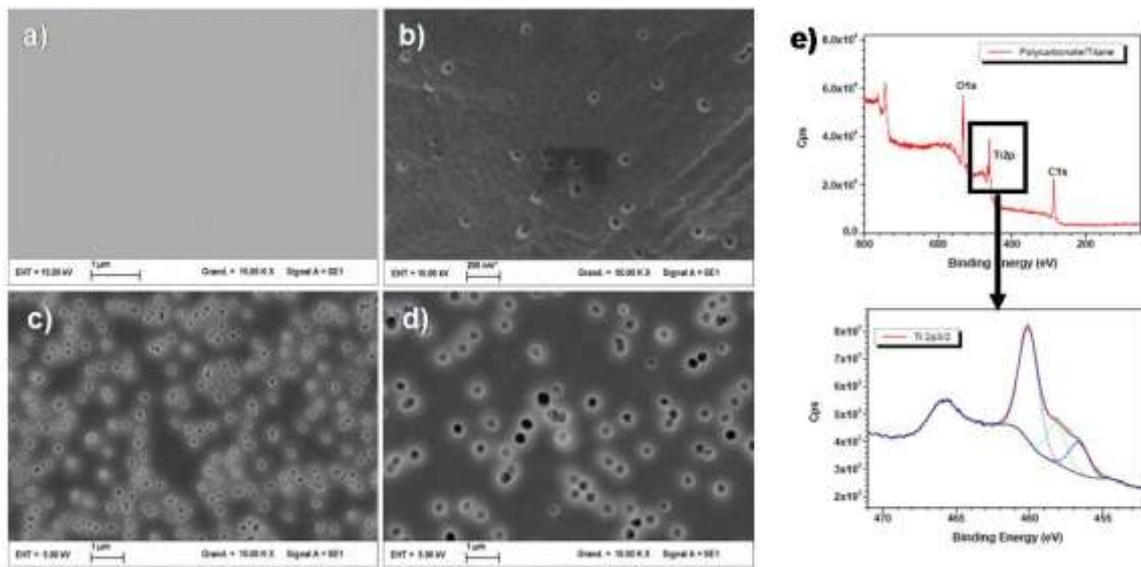


Figure 2

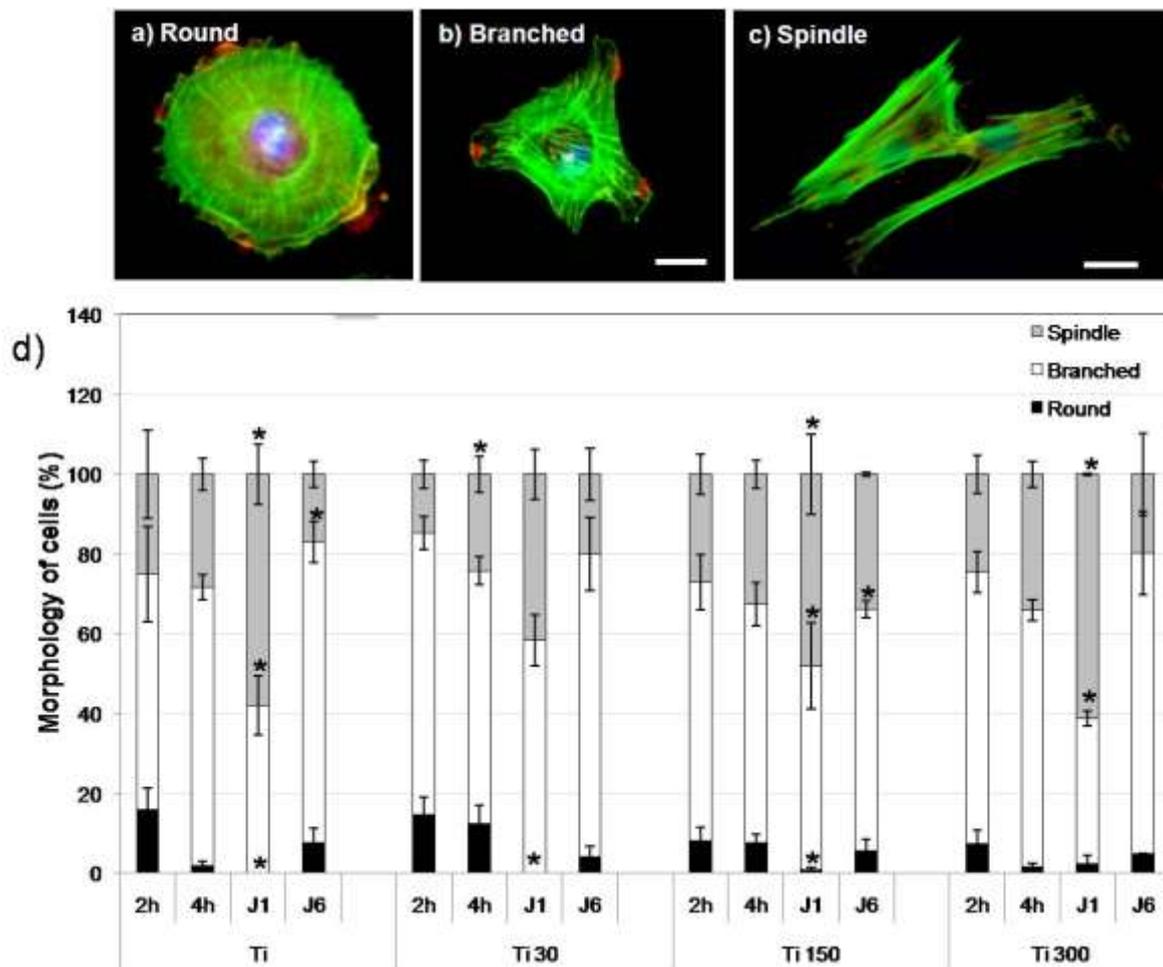


Figure 3

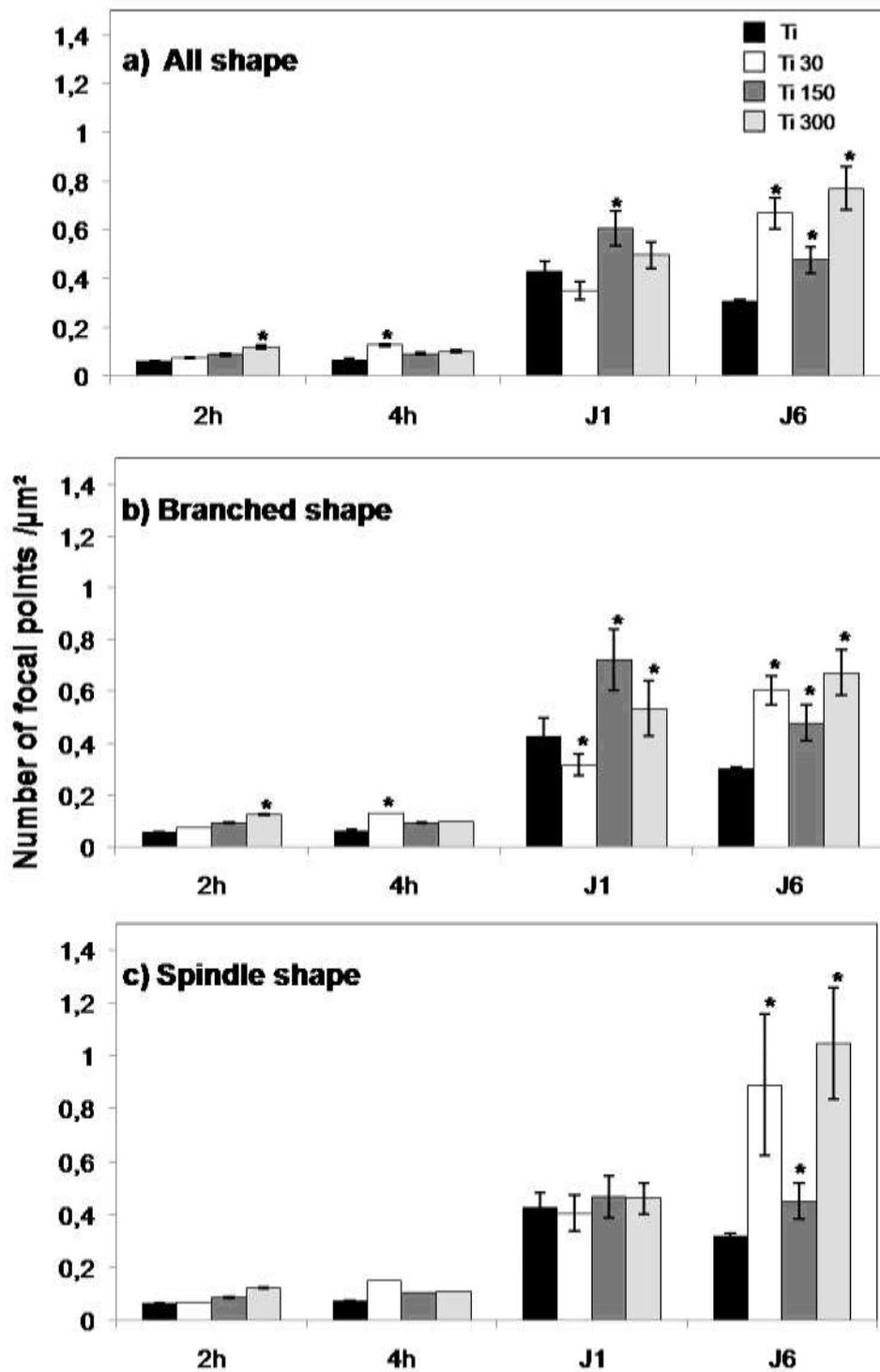


Figure 4

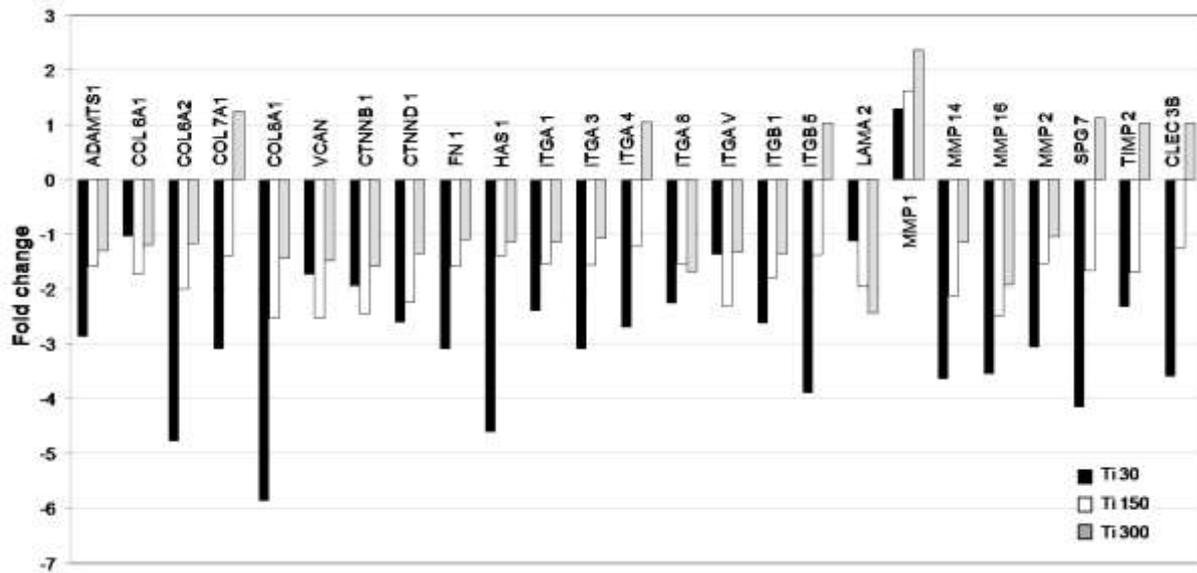


Figure 5

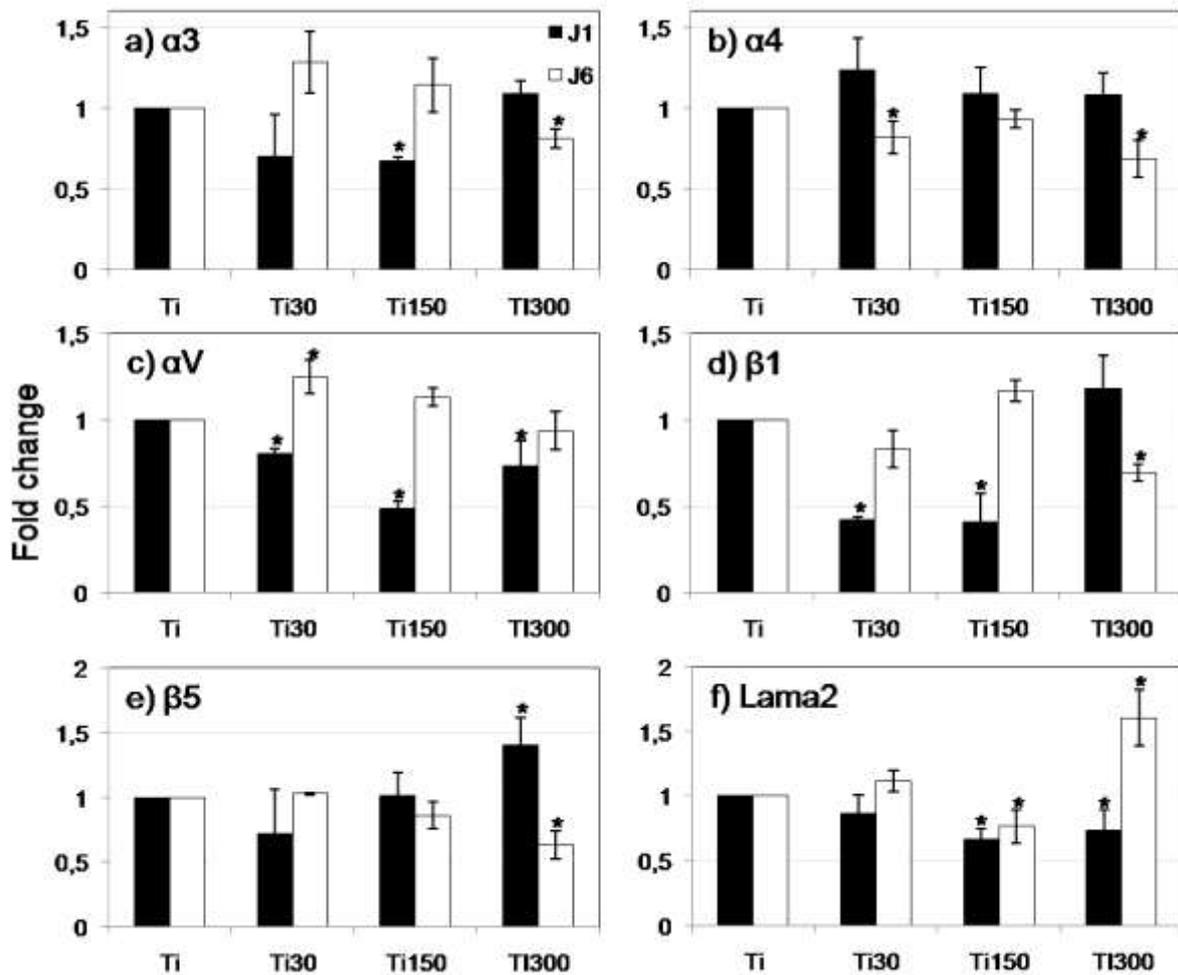


Figure 6

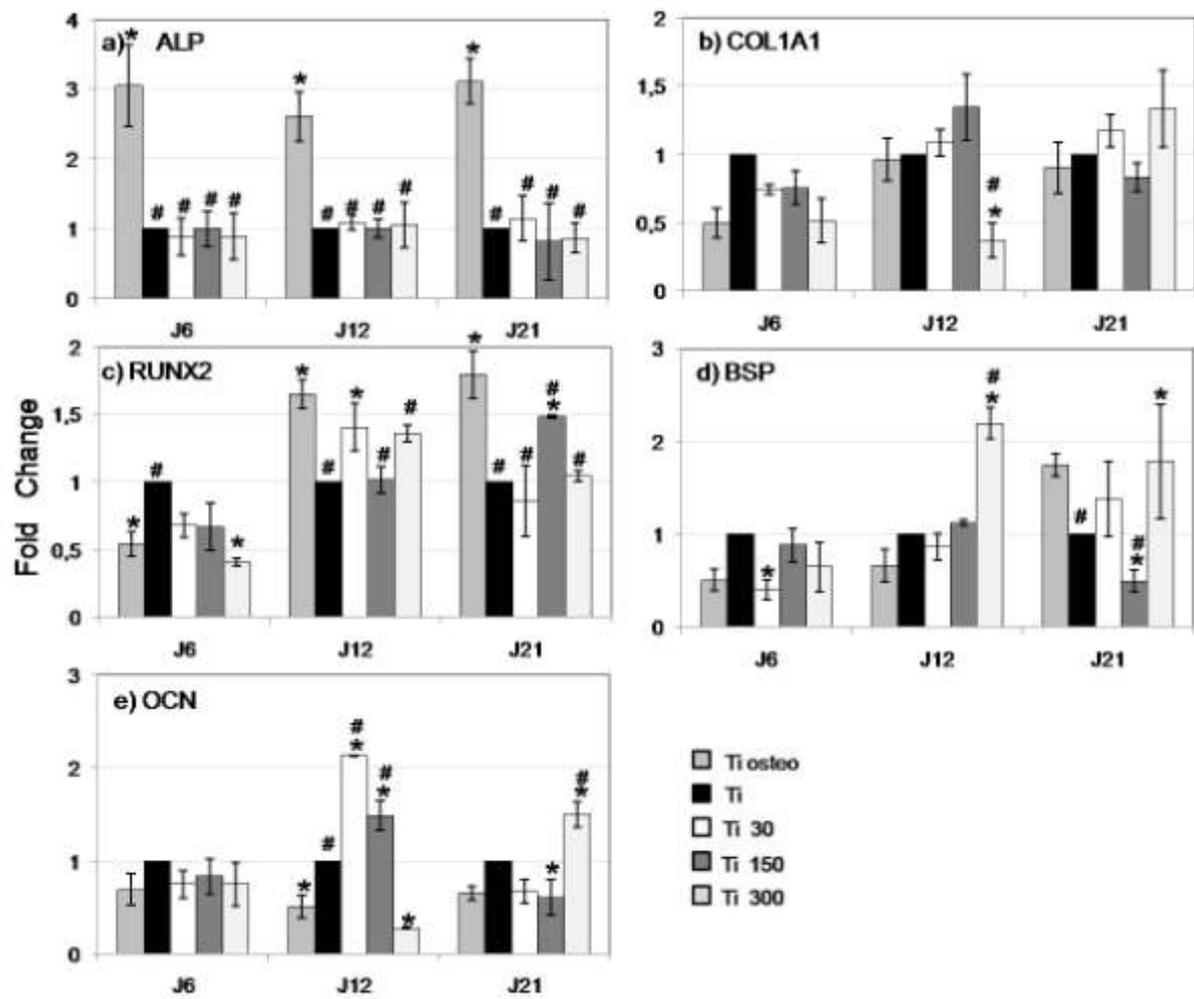
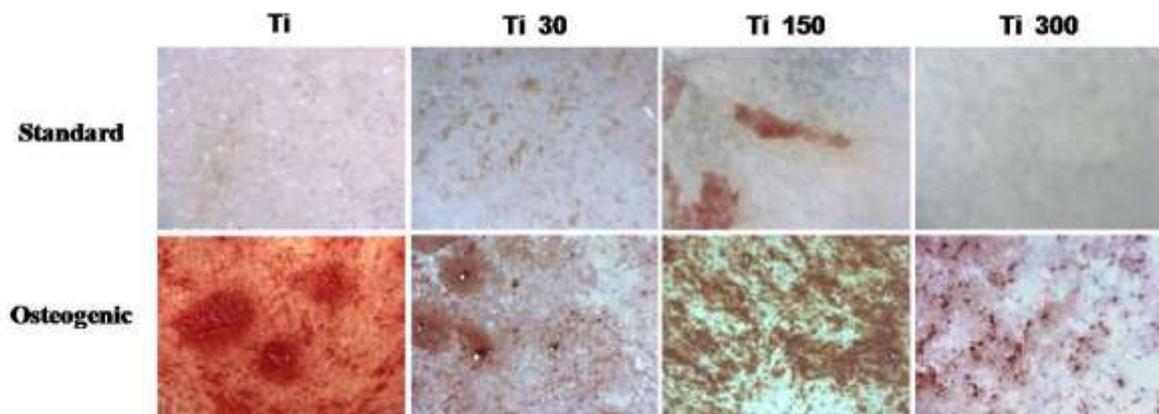


Figure 7



### III. Article 4 : Différenciation cellulaire et ostéointégration de surface anodisée en titane

#### Cell differentiation and osteointegration influenced by nanoscale anodized titanium surfaces

Lavenus S., Trichet V., Lechevalier S., Amiaud J., Hoorneart A., Louarn G., Layrolle P.

Under soumission to Biomaterials

##### Résumé:

Le but de cette étude est d'étudier les interactions de cellules souches mésenchymateuses (hMSC) avec des surfaces de titane nanostructurées et l'intégration osseuse d'implants. Des nanopores de 20, 30 et 50 nm ont été préparés par anodisation de titane à 5, 10 et 20 V dans un mélange d'acide fluorhydrique et l'acide acétique. Ti 30 et Ti 50 ont permis une différenciation osteoblastique précoce des hCSM sans facteurs d'osteogeniques. L'ostéointégration des implants nanostructurés et du contrôle ont été comparée par l'implantation dans des tibias de rats pendant 1 et 3 semaines. Les nanostructures accélèrent l'apposition osseuse et la force de liaison os/implant *in vivo*, corrélant les résultats *in vitro*. Ces résultats démontrent que les nanostructures contrôlent la différenciation des cellules et ainsi, leur intégration dans les tissus.

# **Cell differentiation and osteointegration influenced by nanoscale anodized titanium surfaces**

Sandrine Lavenus<sup>1,2</sup>, Valérie Trichet<sup>1</sup>, Sébastien Le Chevalier<sup>2</sup>, Alain Hoornaert<sup>3</sup>,  
Guy Louarn<sup>2</sup>, Pierre Layrolle<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Inserm U957, Laboratory Physiopathology of Bone Resorption, Faculty of Medicine, University of Nantes, France

<sup>2</sup> CNRS, Institut des Matériaux Jean Rouxel (IMN), University of Nantes, France

<sup>3</sup> ERT 2004, Faculty of dental Surgery, University of Nantes, France

\*Corresponding author:

Pierre layrolle, PhD, Director of research, Inserm U957, LPRO, Faculty of Medicine, 1 rue gaston Veil, 44035 Nantes, France. Tel.: (33) 2 72 64 11 43; Fax : (33) 2 40 41 28 60

E-mail address: pierre.layrolle@univ-nantes.fr

To be submitted to: Biomaterials

Date of submission: September 2010

## Abstract

The aim was to study the interactions of human mesenchymal stem cells (hMSCs) and the bone integration of nanostructured titanium implants. Nanopores of 20, 30 and 50 nm were prepared by anodization of titanium at 5, 10 and 20 V in a mixture of fluorhydric and acetic acid. Ti 30 and Ti 50 nanostructures promoted an early osteoblastic differentiation of hMSCs without osteogenic supplements. The osseointegration of nanostructured and control titanium implants were compared by implantation in tibia of rats for 1 and 3 weeks. The nanostructures significantly accelerated bone apposition and bone bonding strength *in vivo* in correlation with *in vitro* results. These findings demonstrated that specific nanostructures controlled the differentiation of cells and thus, the integration of implants in tissues. These nanoporous titanium surfaces may be of high interest for dental and orthopedic implants.

**Keywords:** nanostructured surfaces, anodized titanium, mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation, bone to implant contact, bone bonding strength.

## 1. Introduction

Titanium implants are commonly used in dental surgery for restoring teeth and in orthopaedic for total hip and knee joint replacements. One of the challenges in implantology is to achieve a rapid osseointegration for immediate loading (Le Guéhennec et al. 2007). Many studies have shown that there is a strong correlation between the early events of bone healing in the peri implant region and the clinical success rates over long periods (Davies 2003b; Marco et al. 2005). In order to promote the biological anchoring of titanium implants to bone, different surface treatments have been developed. The aim is to promote the adsorption of proteins, the adhesion and differentiation of cells and tissue integration of implants. These biological properties are related to chemical composition, wettability and roughness of metal implants surfaces. However, the control of these surface properties at both the protein and cell levels, thus in the nanometer range, remains a challenge for researchers and manufacturers of implants.

The first event after implantation is the adsorption of proteins from blood on the implant surface. These interactions between proteins and material are regulated by the chemical composition, the surface energy and the micro and nano-topography of titanium surface (Cai et al. 2006; Protivínský et al. 2007). It has been shown that nano topography does not only control the adsorption of proteins but also the morphology and adhesion of cells (Zhao et al. 2007; Yunzhi Yang et al. 2002). The influence of surface properties on cell behavior has been studied using many surfaces and cell types such as MSCs, osteoblasts and fibroblasts (Le Guehennec 2008; Dalby et al. 2006; Matthew J Dalby, Nikolaj Gadegaard, Adam S G Curtis et al. 2007; Dalby et al. 2006). Mesenchymal stem cells (MSCs) are present in bone marrow, blood and other tissues at low levels. These cells are attracted in the peri implant region via

chemio-attractant molecules and able to migrate through the blood clot to colonize the implant surface (A I Caplan 2009; Arnold I Caplan & Dennis 2006). MSCs are multipotential cells that may differentiate into mesenchymal lineages such as for instance, osteoblasts (bone), chondrocytes (cartilage), adipocytes (fat) and fibroblasts (skin) (Kassem 2006; Marinucci et al. 2010; Lepski et al. 2010; Morganstein et al. 2010; Zannettino et al. 2008; Engler et al. 2006). The nature of tissue around implants may well depend on the differentiation of MSCs induced by the surface properties of implants. However, this hypothesis was mainly validated *in vitro*.

Anodization is a cost effective process that produces nanostructures based on the electrolytic growth of columnar titanium oxide layer on titanium. By mastering the electrolyte composition and voltage, a regular array of pores having controlled diameters ranging from 15 to 200 nm was easily produced on titanium implants. Recent studies have demonstrated that titanium nanotubes obtained by anodisation controlled the adhesion and osteogenic differentiation of MSCs (S. Oh et al. 2009; Park et al. 2007). These studies have shown that nanotubes of 30 nm diameter promote adhesion without noticeable differentiation, whereas larger nanotubes (70 or 100 nm) induced cell elongation, cytoskeletal stress and selective differentiation into osteoblastic cells. On the other hand, some studies reported the osseointegration of anodized titanium implants in animal models (Sul 2010; Sul et al. 2001; Bjursten et al. 2010). To the best of our knowledge, there is no correlation between the optimal nanostructure for inducing osteoblastic cell differentiation and bone tissue integration. The aim of this work is to study both the interactions of MSCs and the bone tissue integration of nanostructured titanium implants. Nanostructures with pores of 20, 30 and 50 nm were prepared on titanium by anodization and characterized. Human

hMSCs were cultured on these nanostructures for 1 and 3 weeks. Osteogenesis polymerase chain reaction PCR arrays and quantitative PCR were performed to assess the osteogenic differentiation of MSCs on the nanostructures. The osseointegration of nanostructured and plain titanium implants were compared after implantation in tibia of rats for 1 and 3 weeks by using histology, bone to implant contact and mechanical tests.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Preparation of nanostructured implants

Commercial pure titanium (Ti) grade 2 (Alta industries SARL, Arnage, France) was used for the *in vitro* and *in vivo* experiments. All the *in vitro* samples were machined into discs measuring 14 mm in diameter and 1 mm in thickness in order to fit in to 24-well plates. The Ti discs were polished by using silicon carbide grinding papers (Buehler, France) of increasing mesh size # 220, 500, 800, 1200, 2400 and 4000. A grinder-polishing machine (Metaserv 2000, Buehler, Germany) was used at 150 rpm under running tap water. The titanium discs were polished on each grinding paper for 30 s, then turned 90 ° and ground for 30 s. Mirror-polished Ti surfaces were finally obtained by grinding using a 3 µm diamond paste (Buehler) and cloth. For *in vivo* experiment, thread Ti wire of 1 mm in diameter was purchased from Goodfellow Corp.

Columnar TiO<sub>2</sub> nanostructures were fabricated by electrochemical anodization as described by Oh et al (S. Oh et al. 2009). Briefly, the Ti discs or thread samples were cleaned for 15 min in acetone, rinsed in distilled water, and then dried. TiO<sub>2</sub> nanotubes were generated by anodization in 1 M acetic acid (Prolabo) containing 0,5 % wt hydrofluoric acid (HF, Sigma, St. Quentin Fallavier, France) at 5, 10 and 20 V for 20 min at room temperature to obtain different nanotube diameters. A platinum electron (Kitco, Canada) served as the cathode. Samples

were immersed in the electrolyte under stirring at room temperature by applying the appropriate voltage for 20 min. The samples were rinsed by deionised water, dried at 80 °C and annealed at 500 °C for 2 hours to transform the amorphous TiO<sub>2</sub> to anatase phase. Following surface modification, all samples were cleaned by ultrasonic washing with acetone, 70 % ethanol and deionised water. Anodization produced a regular array of nanopores of 20, 30 and 50 nm denoted Ti 20, Ti 30 and Ti 50, respectively. As received wires or mirror polished titanium discs, namely Ti, were used as controls. Samples were then packaged in sealed bags and autoclaved at 121 °C for 20 min prior to *in vitro* or *in vivo* experiments.

## **2.2. Characterisation of the nanostructured titanium surfaces**

Surface topography was observed by using a scanning electron microscope (SEM, LEO VP1450). X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis of the surfaces was conducted using a Leybold LHS12 Spectrometer equipped with an aluminium K<sub>α</sub> X-ray radiation source at 1486.6 eV and Scan system control. The pressure in the chamber was less than  $2 \times 10^{-9}$  Torr before the data were taken, and the current of the anode was 12 keV. Raman spectroscopy was performed in order to confirm the formation of anatase or rutile on the titanium surface after annealing at 500°C. For all surface characterizations, 3 samples of each group (n=3) were analysed at room temperature.

## **2.3. Cell culture**

Human mesenchymal stem cells (hMSCs) were obtained from bone marrow cell aspirations harvested in the iliac crest of patients undergoing orthopaedic surgery. Patients were informed about the procedure by the orthopaedic surgeon and signed an informed consent. The bone marrow aspirates were collected by the "Etablissement Francais du Sang, Centre-Atlantique, Tours, France". Bone marrow

cells were plated in 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (Corning) with 15 ml of culture medium. Standard culture medium consisted of alpha modified Eagle medium (α-MEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA) supplemented with 10 % foetal calf serum (FCS, biotech GmbH, Aidenbach, Germany), 2 mM of L-glutamine, 100 µg/ml of streptomycin and 100 Units/ml of penicillin. The culture medium was refreshed every 2 days and adherent hMSCs were cultured until 80 % confluence in a humidified atmosphere, 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C. Cells were detached by trypsin/EDTA (0.05 % v/v, Gibco) for 5 min and counted on a haemocytometer. In order to test the different substrates with a homogenous cell population, the hMSCs were cryopreserved at the end of the first passage. Prior to seeding on the different substrates, the cells were thawed and cultured in 75 cm<sup>2</sup> flasks for 2-4 days. At confluence, cells were harvested using trypsin-EDTA and counted on Malassez's haemocytometer by using trypan blue exclusion dye.

## **2.8. Osteogenesis PCR array and Real-time RT-PCR**

hMSCs were cultured for 1 and 3 weeks on the different substrates using four material replicates as previously described. Cells were lysed and total RNA was extracted using Macherey-Nagel Nucleospin RNA XS kit. Total RNA was quantified by spectrophotometer at 260 nm wavelength (Nanodrop, labtech, Palaiseau) and the integrity of RNA was checked thanks to the 28S/18S ratio after Agilent electrophoresis. After quantification and quality control, RT<sup>2</sup> profiler PCR array for Human Osteogenesis (PAHS-026D, Tebubio, Le Perray en Yvelines, France) was performed according to manufacturers' instructions. Online software from Tebubio was used to analyse results (<http://www.tebubio.com>).

## **2.7. Real-Time PCR**

We validated selected genes that were identified by PCR array analysis using RT-qPCR as previously described. 250 ng of total RNA was used in cDNA synthesis at 37 °C for 1 h with 0.5 µg random primers (Promega, Charbonnière, France), 5X RT buffer, 0.5 mM dNTP mix (Eurobio, Les Ulis, France), 20U RNaseOUT and 400 U M-MLV reverse transcriptase. The real-time PCR contained 5 ng cDNA, 300 mM forward and reverse primers and 5 µl 2x SYBR green buffer (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) in a final volume of 10 µl. Polymerase chain reactions were carried out in triplicate from several RNA extractions, in 96-well plates using the Chromo4 System (Bio-Rad). Oligonucleotides were synthesized for RUNX2, SOX9, COL1A1, COL3A1, VCAM1, BSP, OCN and ALP as described in Table 2.

## **2.8. Animal model and surgical procedure**

All animals handling and surgical procedure were conducted according to the European Community guidelines for the care and use of laboratory animals (DE 86/609/CEE). The study protocol was submitted for approval to the regional animal care and safety committee. The experiments were conducted according to Good Laboratory practices (GPL) at the Faculty of Medicine of Nantes within approved experimental facilities. Experiments were performed using 48 Wistar Han rats, females, 7 weeks old, weighting 176-200 g (Charles River, France). Rats were housed (three per cage), with water and food at will. The animals were placed in quarantine for at least 8 days prior to surgery. Rats were operated under general anaesthesia by inhalation of a mixture of isoflurane/air (Forane, Abbott laboratories, UK). Surgical pain was controlled by a local intramuscular injection of bupremorphine (50 µg/kg, 100 µg/ml, Buprecare). Possible post surgical infections were prevented by a subcutaneous injection of prophylactic

antibiotic (Marbocyl, 2 µg/kg, 1 µg/ml). Posterior limbs were shaved and disinfected with iodine solution and draped with a hollow sterile sheet. A lateral incision of the skin and muscle of 0.5 cm was made to expose the proximal epiphyses of the tibia. A hole of 1 mm in diameter was realized in the tibia epiphysis through the cortical bone using a dental burr and micromotor (model) under saline irrigation. The titanium wire was press fit inserted in the hole and cut at about 1 mm above the cortical bone. The same procedure was repeated in the other tibia thus, giving 2 implants per animal. Animals were sacrificed 1 and 3 weeks after surgery using an intra cardiac over dose of sodium pentobarbital (Dolethal, Vetoquinol, France). Samples were retrieved and immediately fixed in neutral formol (10 %). Twelve sample per group (n=12) were implanted following a Latin square implantation scheme. Six samples were used for mechanical testing and 6 were processed for non decalcified histology in resin.

## **2.9. Pull out mechanical test**

The osseointegration of implants was measured by tensile force testing (Zwisch Roell 72.5). The tibia was fixed to an apparatus while the titanium wire outside bone was hold by the cross head device. A load cell (Zwisch Roell 8125) with a maximum force of 50 Newton and an accuracy of 0.1 N was used. The uniaxial tensile test was carrying out using a cross head speed of 1 mm/min. The force displacement curve was obtain using the software test Xpert II and recorded the maximum pull out force for each sample.

## **2.10. Histology and histomorphometry**

During fixative period, the explants were analysed by µCT (SkyScan). The X-ray source was operated at a voltage of 90 kV. The sample was rotated trough 180 ° with a rotation step of 0.8 °. Three-dimensional reconstruction were made with the ANT software (data not shown). The explants

were processed for non-decalcified histology using methylmethacrylate (MMA, Sigma) resin. After fixation for about 4 days, the explants were dehydrated in ascending graded ethanol series (24 for each grade) and then placed in pure acetone for 48 hours. Finally, the samples were impregnated with methylmethacrylate supplemented with polyethylene glycol (10 %, Merck, France) and benzoyl peroxide (0.01 %, Merck) for 7 days with one refreshment. The explants were embedded in MMA at 4 °C for 4 days. Each resulting block was cut in half with histology. Thin 20 µm sections were prepared using a saw (LEICA SP 1600). and stained with methylene blue and basic fuchsin. The other part of the block was observed by back scattered electron microscopy (BSEM, Leo VP 1450, Germany) for histomorphometrical measurements. Briefly, samples were polished, gold sputtered and observed by using BSEM at the magnification x40. BSEM images allowed discriminating the titanium implant, mineralized bone and fibrous tissue by their respective electron density. Image analysis (Qwin, Leica, Germany) was conducted to determine the bone to implant contact (BIC). The BIC was defined as the length of mineralized bone directly apposite to the surface divided by the perimeter of implant.

### 2.11. Statistical analysis

Cell culture experiments were performed in triplicate and repeated at least twice in order to ensure consistency of analysis (n=3). qPCR results were representative of two experiments using different patient. For animal experiments, 12 samples per group were used as well as a Latin square implantation scheme in order to minimize individual variations. Six samples per nanostructure and control at each time period were used for mechanical testing and six samples were used for calculating percentages of BIC. Data were averaged and expressed as mean ± standard error to the mean. Statistical analysis was

performed using ANOVA (SPSS 16.0 software) and considered significant for  $p < 0.05$ .

### 3. Results

Figure 1 shows the mirror polished and the highly ordered nanopores obtained on the titanium surface. Depending on the applied voltage, different pore diameters were obtained after 20 minutes of anodization. As indicated in table 2, the internal diameters of nanopores were  $18 \pm 5$  or  $35 \pm 11$  or  $45 \pm 9$  nm for 5, 10 and 20 V, respectively. The nanopores had a circularity of 0.8 in average. The pore size distribution was narrow indicating that a regular array of nanopores was obtained. For each diameter, the crown size was comprised between 8 and 17 nm. The density of pore was 560, 160 and 98 nanotubes per µm<sup>2</sup> respectively for Ti 20, Ti 30 and Ti 50. As determined by XPS, the chemical composition was basically TiO<sub>2</sub> in all groups with small traces of carbon. The crystallinity of surface was an amorphous phase in control surface (Ti), and a mixture of anatase and rutile phase in the anodized surface. The thickness of the nanoporous titanium oxide layer was approximately 500 nm.

hMSCs were cultured on plain and nanoporous titanium surfaces for 1 and 3 weeks. The differentiation of cells was studied by using Human osteogenesis PCR arrays. The arrays gathered 86 tags corresponding to major genes involved in osteogenesis as shown in Figure 2. Gene expression profiles of cells cultured on nanostructured surfaces were compared to those of cells cultured in both standard (Ti) and osteogenic conditions (Ti osteo). On an overview, the PCR array showed that the gene expression was modulated differently for cells cultured on the 3 nanostructured surfaces. Moreover, more contrasted variations between surfaces and gene expression were observed at week 3 in comparison to week 1. For instance, at week 3, COMP gene was induced 12 folds

on Ti 50 while it was induced more than 30 folds on Ti 30. For Ti osteo, COMP was up-regulated 17 folds at week 1 while it was induced more than 77 folds at week 3. The arrays showed that for cells cultured in osteogenic condition, the genes COL11A1, COL1A1 and COL1A2 were strongly induced (more than 10 folds). In contrast, other genes including transcriptional factor SOX9 and cell adhesion genes such as ITGA2, ITGA3, ITGB1 and VCAM1, were down regulated in osteogenic condition. The same down-regulation genes were less expressed on Ti 30 than on the other surfaces. Additionally, COL12A1, COL1A1, COMP, TGFBR1 expression levels were more similar between Ti osteo and Ti 30 than between Ti osteo versus Ti 20 or Ti 50. Overall, the Ti 30 without osteogenic supplements seemed to be the nanostructured surface that allowed the more similar gene expression as compared to Ti osteo.

In order to confirm the PCR array results, a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used with primers for RUNX2, SOX9, COL1A1, COL3A1 and VCAM1 (Figure 3). In agreement with the PCR array analysis, hMSCs cultured on plain or nanoporous titanium exhibited different gene expression profiles depending on the surfaces. For instance, COL3A1 was 15 and 10 folds increased for cells cultured either on Ti 30 or Ti 50, respectively. As shown in Figure 3a, the osteoblastic marker RUNX2 expression was more similar to controls on Ti 30 than on other nanostructured surfaces after 1 week. After 3 weeks of culture, the nanostructured surfaces allowed a higher RUNX2 expression than Ti but lower than on Ti osteo. The chondrogenic marker SOX9 was down regulated on all surfaces and conditions except for cells on Ti 50 at week 3. The expression of COL1A1 and COL3A1 that are two genes corresponding to major types of collagen in bone is shown in Figure 3b. After 1 week of culture, the COL1A1 gene was 2 folds less expressed on nanostructured Ti as

compared to Ti osteo, but was 3 or 4 folds higher than it was at day 0. After 3 weeks all nanostructured surfaces allowed an intermediate expression variation of COL1A1 compared to controls. As it was observed for RUNX2 expression, Ti 20 surface induced the lowest increase of expression for COL3A1, but after three weeks the COL3A1 expression was similar on Ti 20 compared to controls, possibly due to a later osteogenic differentiation of cells on the Ti 20. Figure 3c showed the expression of gene VCAM1 coding for a cell membrane glycoprotein that is implicated in cell-cell adhesion. At 1 week, the VCAM1 expression was up-regulated in a range of 2 or 6 folds depending of the surfaces. This up-regulation was even higher at week 3, *i.e.* around 15 folds for Ti osteo, Ti 30 and Ti 50 and around 20 folds for Ti and Ti 20. In summary, concerning some osteogenic genes, a faster increase of expression was observed on Ti 30 and Ti 50 as compared to Ti 20.

The osteoblastic differentiation of hMSCs on the Ti nano was therefore investigated by the expression of ALP, BSP, and OCN. The results are reported in Figure 4. In a general way, the expression of ALP was not changed by the nanostructures. However, ALP was over expressed on Ti osteo at week 1 and returned to comparable levels as other surfaces after 3 weeks. Moreover, the expression of ALP gene was slightly more expressed on Ti 30 than on other nanostructured surfaces at week 3. As shown in Figure 4b, the expression of BSP was lower on nanostructured Ti than on Ti osteo at week 1. The BSP gene was 7 folds increased on all surfaces at week 3 in comparison to week 1 and day 0. Figure 4c shows the expression of OCN. All nanostructured Ti exhibited a lower expression of OCN at week 1 but a higher expression than Ti osteo at week 3. In summary, the nanostructured Ti seemed to modulate the expression of ALP, BSP and OCN.

Next, we have studied the osteo integration of nanostructured implants in rats. All

animals recovered well from surgery and no infection or acute inflammation was noticed during the healing of surgical wounds. Figure 5 shows the bone tissue integration of titanium implants by using non decalcified histology. After 1 week, bone healing was observed in the peri implant region of nanostructured implants. Bone tissue was in direct contact with the nanostructured Ti while a gap of about 100  $\mu\text{m}$  was observed between bone and Ti control. The bone apposition appeared comparable on the nanostructured implants with thin trabeculae and remodeling lacunae. After 3 weeks, the bone apposition on the Ti control was better than at week 1. Bone contact was evident with thick bone trabeculae following the contour of the nanostructured Ti implants after 3 weeks. BSEM images of nanostructured Ti and Ti control implanted for 1 and 3 weeks in tibia of rats are reported in Figure 6. After 1 week, mineralized bone with thin trabeculae was observed around the 3 nanostructured implants while only a limited amount of bone was found around the Ti control. The quantity of bone appeared higher around Ti 50 than in other. After 3 weeks, bone trabeculae were less numerous and thicker than at 1 week around nanostructured Ti suggesting bone remodeling in contact with implant. As shown in Figure 7, the percentages of bone to implant contact (BIC) corroborated the qualitative histological results. After 1 week, the three nanostructured surfaces exhibited significant higher BIC values than on control. After 3 weeks, the BIC was higher on Ti 30 and Ti 50 than on Ti while the value for Ti 20 was similar to that of the control. Furthermore, we noticed that the value of BIC for nanostructured Ti at week 1 was similar to that of week 3 for the control Ti implying a faster bone healing around the nanostructured implants. Finally, the most important value of BIC was observed on Ti 30 and Ti 50 after 3 weeks. Pull out tensile tests were conducted and results are reported in

Figure 8. After 1 week, the force was significantly higher for Ti 30 and Ti 50 than for the control Ti. The pull out strength of Ti 20 was comparable to the control. After 3 weeks, the highest value was observed for Ti 20 and Ti 50 compared with Ti. The pull out strength obtained for Ti 30 at week 3 was comparable to that of the value at week 1 and to the Ti control at week 3. Overall, the nanostructured surfaces accelerated bone healing around implants particularly for Ti 30 and Ti 50 in comparison to Ti control.

#### 4. Discussion

Nanometer sized features have been shown to influence the adhesion and osteogenic differentiation of cells (Le Guehennec, h et al. 2008). The osteoblastic differentiation of hMSCs may favour an early bone apposition onto the nanostructured titanium implants. Nevertheless, the possible correlation between *in vitro* and *in vivo* behaviour was not validated. Here, we conducted an original study comparing the osteogenic differentiation of hMSCs studied by gene expression profiles and the bone healing around nanostructured Ti implants.

Human osteogenesis PCR array for hMSCs cultured on nanostructured Ti were first performed and gene expression profiles compared to those on plain Ti under osteogenic conditions. These gene expression profiles were confirmed by qPCR. After 1 and 3 weeks of culture, COL1A1, COL3A1 and COL12A1 were over expressed on nanostructured Ti compared to day 0 (Figures 2 and 3). COL1A1 and COL3A1 are both localized in bone tissue (Keene et al. 1991) and these genes are up-regulated in early stage of osteoblast differentiation (Hong et al. 2010). It has been found that fibrillogenesis involved the assembly of different types of collagens (X Liu et al. 1997). For instance, type I collagen determines spatial organization and structural stability while the ratio with

other types of collagen defines the mechanical resistance of bone tissue. It is well known that COL1A1 is involved in the development of the skeleton, in phosphate transport and bone structure. Type III collagen modulates the size of type I collagen during the bone ECM construction (X Liu et al. 1997; Kadler et al. 1990). Our PCR results indicated that COL1A1 and COL3A1 were up-regulated compared to osteogenic condition suggesting that hMSCs produced bone ECM proteins on the nanostructured Ti surfaces. Furthermore, we found an over expression of COL12 gene which is modulated by mechanical stress during osteogenic differentiation (Chiquet et al. 1998; Singh et al. 2007) similarly as Type I collagen (Lindahl et al. 2002). For instance, mechanical strains have been shown to increase expression of COL12 in murine osteoblastic cells MC3T3-E1 (Arai et al. 2008). PCR array and qPCR indicated that the vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1) was up regulated by the nanostructured surfaces in comparison to Ti osteo (Figures 2 and 3) suggesting abundant cell-cell interaction. VCAM1 is a cell membrane glycoprotein that has been implicated in cell-cell adhesion and plays a role in the development of bone cells. For instance, Tanaka et al. have shown that osteoblasts express particular adhesion molecules, ICAM-I and VCAM-1 (Y. Tanaka et al. 1995).

A strong variation in the expression of COMP was observed in the PCR arrays (Figure 2) but COMP is less expressed than COL1A1. The threshold Ct value was between 19 and 25 for COMP compared to a range of 14-17 for COL1A1 transcript, for instance. Originally described in cartilage, COMP has also been identified in ligaments, meniscus, tendons, synovium, osteoblasts and vascular smooth muscle (Di Cesare et al. 2000; DiCesare et al. 1994). The carboxyterminal globular domain of COMP binds to collagen I, II and IX. The function of COMP remains unclear, but it may have a structural role in

endochondral ossification and in the assembly and stabilization of the ECM by its interaction with collagen fibrils and matrix component. COMP has been shown to influence the fibril formation of collagens I and II by promoting early association of collagen molecules thereby accelerating fibrillogenesis with a distinct organization of the fibrils (Halász et al. 2007). COMP functions in the ECM were illustrated by the fact that a mutation in the potentially  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domain has led to impaired secretion of  $\text{Ca}^{2+}$  and severe multiple epiphyseal dysplasia (Briggs et al. 1995; K. Rosenberg et al. 1998). These studies proved an essential role for  $\text{Ca}^{2+}$  binding in COMP structure and function. Since COMP is also a chondroblastic protein, the expression of SOX9 which is a transcriptional factor involved in hMSCs chondroblastic differentiation was also investigated here (Figure 3). We found that the expression of SOX9 was lower on all nanoporous surfaces than on the plain control in osteogenic medium.

In order to confirm the effect of nanostructures on the osteoblastic differentiation of hMSCs, we also monitored the expression of ALP, BSP and OCN osteoblastic genes (Figure 4). A previous study considering hMSCs differentiation and topography has demonstrated that nanoscale disorder stimulated osteoblastic gene expression of OCN and ALP for hMSCs cultured for 14 days in the absence of osteogenic factors (Matthew J Dalby, Nikolaj Gadegaard, Adam S G Curtis et al. 2007). In agreement with this study, we showed that the nanopores modified the osteoblastic gene expression in a size depending manner. Ti 30 was the most potent nanostructure for osteogenic differentiation of hMSCs with an over expression of ALP and OCN observed after 3 weeks of culture. The nanostructure seems to play a key role in controlling the differentiation of cells. In turn, nanostructured surfaces may promote bone tissue integration of implants. Anodized nanoporous titanium

surfaces have been recently tested in animal models (Sul 2010; Sul et al. 2001) and have been proposed as promising coatings for medical implants (von Wilmsky et al. 2009). However, there is still a lack of correspondence between *in vitro* and *in vivo* experiments in relation to nanostructured surfaces. Surface roughness is one of the key factors for osseointegration of titanium implants but little is known about the osseointegration effects of titanium nanotubes *in vivo* (von Wilmsky et al. 2009; Sul 2010).

Some studies proved that nanostructures may provide greater *in vivo* osseointegration than rough implant surface (Bigerelle et al. 2002). Here, we observed a faster bone apposition on nanostructured implants than on the plain surface (Figures 5 and 6). These qualitative results were corroborated by percentages of BIC (Figure 7) together with a significant increase in mechanical anchoring of nanostructured implants to bone (Figure 8). Bone implant contact (BIC) and bone bonding strengths are considered clinically relevant indices of osseointegration but the comparison between studies is difficult as dependent of many experimental parameters (Bjursten et al. 2010). Quantifying the bone bonding strength of implants indicated the quality of the bone tissue in contact to the surface. In our study, tensile force testing was performed to qualify the osseointegration of the different nanostructures in comparison to the control. Tensile bonding strength for Ti 30 and Ti 50 were corroborated to the BIC results after 1 week. Our tensile test results indicated that the fracture force needed to remove the Ti 30 and Ti 50 implants from tibia of rats was significantly higher (between 6-8 N) than for the Ti 20 and control (around 3 N) after 1 week. It has been shown that the fracture force depends on the removal method, the modulus of the implant material, the surface area of the implant, the animal model used and the localization

of the implant (Buser et al. 1999). Therefore, it is not easy to compare our result with others studies. Nevertheless, enhanced bone bonding was already found on nanostructured surfaces compared with controls (Sul 2010; Bjursten et al. 2010; Sul et al. 2001).

## 5. Conclusion

Overall, the results of this study indicated that nanotubes with diameters of 20, 30 and 50 nm on titanium may influence the differentiation of mesenchymal stem cells. The Ti 30 and Ti 50 nanostructures seemed to promote an early osteoblastic gene expression comparable to cells cultured on Ti 20. Furthermore, these nanostructures accelerated bone apposition and strength *in vivo* as compared to Ti 20 and plain Ti. These findings demonstrated that nanoporous titanium surfaces may be of high interest for dental and orthopedic implants. Future studies should be conducted to optimize the nanostructure in relation to the desired biological response and tissue integration.

### Conflict of interest:

None to declare.

### Acknowledgments

The authors are grateful to Martine Berreur for help in PCR experiments. This study was financially supported by the European Commission through the project Reborne. The French Ministry of Research is acknowledged for supporting the PhD thesis of S. Lavenus. The authors are also grateful to Kirsty Snaith of Medicis Traduction for grammar and spelling corrections of the manuscript.

## Bibliography

1. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater.* 2007 Jul;23(7):844-854.
2. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ.* 2003 Aoû;67(8):932-949.
3. Marco F, Milena F, Gianluca G, Vittoria O. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron.* 2005;36(7-8):630-644.
4. Cai, Bossert J, Jandt KD. Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2006 Mai 1;49(2):136-144.
5. Protivínský J, Appleford M, Strnad J, Helebrant A, Ong JL. Effect of chemically modified titanium surfaces on protein adsorption and osteoblast precursor cell behavior. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007 Aoû;22(4):542-550.
6. Zhao G, Raines AL, Wieland M, Schwartz Z, Boyan BD. Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. *Biomaterials.* 2007 Jun;28(18):2821-2829.
7. Yang Y, Tian J, Deng L, Ong JL. Morphological behavior of osteoblast-like cells on surface-modified titanium in vitro. *Biomaterials.* 2002 Mar;23(5):1383-1389.
8. Le Guehennec L. Osteoblastic cell behavior on nanostructured metal implants. *Nanomedicine (Lond).* 2008 Fév;3(1):61-71.
9. Dalby MJ, McCloy D, Robertson M, Agheli H, Sutherland D, Affrossman S, et al. Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies. *Biomaterials.* 2006 Mai;27(15):2980-2987.
10. Dalby MJ, Gadegaard N, Curtis ASG, Oreffo ROC. Nanotopographical control of human osteoprogenitor differentiation. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2007 Mai;2(2):129-138.
11. Dalby MJ, McCloy D, Robertson M, Wilkinson CDW, Oreffo ROC. Osteoprogenitor response to defined topographies with nanoscale depths. *Biomaterials.* 2006 Mar;27(8):1306-1315.
12. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J. Pathol.* 2009 Jan;217(2):318-324.
13. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.* 2006 Aoû 1;98(5):1076-1084.
14. Kassem M. Stem cells: potential therapy for age-related diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006 Mai;1067:436-442.
15. Marinucci L, Balloni S, Becchetti E, Bistoni G, Calvi EM, Lumare E, et al. Effects of Hydroxyapatite and Biostite((R)) on Osteogenic Induction of hMSCs. *Ann Biomed Eng.* 2010;38(3):640-648.
16. Lepski G, Janes CE, Maciaczyk J, Papazoglou A, Mehlhorn AT, Kaiser S, et al. Limited Ca<sup>2+</sup> and PKA-pathway dependent neurogenic differentiation of human adult mesenchymal stem cells as compared to fetal neuronal stem cells. *Exp. Cell Res.* 2010 Jan 15;316(2):216-231.
17. Morganstein DL, Wu P, Mane MR, Fisk NM, White R, Parker MG. Human fetal mesenchymal stem cells differentiate into brown and white adipocytes: a role for ERRalpha in human UCP1 expression. *Cell Res.* 2010;20(4):434-444.
18. Zannettino ACW, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, et al. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J. Cell. Physiol.* 2008;214(2):413-421.
19. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 2006;126(4):677-689.
20. Oh S, Brammer KS, Li YSJ, Teng D, Engler AJ, Chien S, et al. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009 Fév 17;106(7):2130-2135.
21. Park J, Bauer S, von der Mark K, Schmuki P. Nanosize and vitality: TiO<sub>2</sub> nanotube diameter directs cell fate. *Nano Lett.* 2007 Jun;7(6):1686-1691.
22. Sul Y. Electrochemical growth behavior, surface properties, and enhanced in vivo bone response of TiO<sub>2</sub> nanotubes on microstructured surfaces of blasted, screw-shaped titanium implants. *Int J Nanomedicine.* 2010;5:87-100.
23. Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Röser K, Wennerberg A, Albrektsson T. Oxidized implants and their influence on the bone response. *J Mater Sci Mater Med.* 2001 Déc;12(10-12):1025-1031.
24. Bjursten LM, Rasmusson L, Oh S, Smith GC, Brammer KS, Jin S. Titanium dioxide nanotubes enhance bone bonding in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 2010 Mar 1;92(3):1218-1224.
25. Le Guehennec L, Lopez-Heredia M, Enkel B, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomater.* 2008;4(3):535-543.
26. Keene DR, Sakai LY, Burgeson RE. Human bone contains type III collagen, type VI collagen, and fibrillin: type III collagen is present on specific fibers that may mediate attachment of tendons, ligaments, and periosteum to calcified bone cortex. *J. Histochem. Cytochem.* 1991 Jan;39(1):59-69.

27. Hong D, Chen H, Yu H, Liang Y, Wang C, Lian Q, et al. Morphological and proteomic analysis of early stage of osteoblast differentiation in osteoblastic progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 2010 Aoû 15;316(14):2291-2300.
28. Liu X, Wu H, Byrne M, Krane S, Jaenisch R. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997 Mar 4;94(5):1852-1856.
29. Kadler KE, Hojima Y, Prockop DJ. Collagen fibrils in vitro grow from pointed tips in the C- to N-terminal direction. *Biochem. J.* 1990 Jun 1;268(2):339-343.
30. Chiquet M, Mumenthaler U, Wittwer M, Jin W, Koch M. The chick and human collagen alpha1(XII) gene promoter--activity of highly conserved regions around the first exon and in the first intron. *Eur. J. Biochem.* 1998 Oct 15;257(2):362-371.
31. Singh SP, Chang EI, Gossain AK, Mehara BJ, Galiano RD, Jensen J, et al. Cyclic mechanical strain increases production of regulators of bone healing in cultured murine osteoblasts. *J. Am. Coll. Surg.* 2007 Mar;204(3):426-434.
32. Lindahl GE, Chambers RC, Papakrivopoulou J, Dawson SJ, Jacobsen MC, Bishop JE, et al. Activation of fibroblast procollagen alpha 1(I) transcription by mechanical strain is transforming growth factor-beta-dependent and involves increased binding of CCAAT-binding factor (CBF/NF-Y) at the proximal promoter. *J. Biol. Chem.* 2002 Fév 22;277(8):6153-6161.
33. Arai K, Nagashima Y, Takemoto T, Nishiyama T. Mechanical strain increases expression of type XII collagen in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Cell Struct. Funct.* 2008;33(2):203-210.
34. Tanaka Y, Morimoto I, Nakano Y, Okada Y, Hirota S, Nomura S, et al. Osteoblasts are regulated by the cellular adhesion through ICAM-1 and VCAM-1. *J. Bone Miner. Res.* 1995 Oct;10(10):1462-1469.
35. Di Cesare PE, Fang C, Leslie MP, Tulli H, Perris R, Carlson CS. Expression of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) by embryonic and adult osteoblasts. *J. Orthop. Res.* 2000 Sep;18(5):713-720.
36. DiCesare P, Hauser N, Lehman D, Pasumarti S, Paulsson M. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. *FEBS Lett.* 1994 Nov 7;354(2):237-240.
37. Halász K, Kassner A, Mörgelin M, Heinegård D. COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 2007 Oct 26;282(43):31166-31173.
38. Briggs MD, Hoffman SM, King LM, Olsen AS, Mohrenweiser H, Leroy JG, et al. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene. *Nat. Genet.* 1995 Jul;10(3):330-336.
39. Rosenberg K, Olsson H, Mörgelin M, Heinegård D. Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J. Biol. Chem.* 1998 Aoû 7;273(32):20397-20403.
40. von Wilmsowsky C, Bauer S, Lutz R, Meisel M, Neukam FW, Toyoshima T, et al. In vivo evaluation of anodic TiO<sub>2</sub> nanotubes: an experimental study in the pig. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2009 Avr;89(1):165-171.
41. Bigerelle M, Anselme K, Noël B, Ruderman I, Hardouin P, Iost A. Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: a new process to increase in vitro human osteoblast response. *Biomaterials.* 2002 Avr;23(7):1563-1577.
42. Buser D, Nydegger T, Oxland T, Cochran DL, Schenk RK, Hirt HP, et al. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999 Mai;45(2):75-83.

## Tables

Table 1: Summary of surface characteristics of control and nanostructured titanium

	Ti	Ti 20	Ti 30	Ti 50
<b>Surface</b>	Mirror polished		Nanopores	
<b>Mean internal diameter (nm)</b>	-	18 ± 5	35 ± 11	45 ± 9
<b>Crown size (nm)</b>	-	8	15	17
<b>Circularity</b>	-		0.8	
<b>Pore size distribution (nm)</b>	-	7-37	14-67	24-66
<b>Density ( nanotube per μm<sup>2</sup>)</b>	-	560	160	98
<b>Crystallinity</b>	Amorphous phase		Anatase, anatase + rutile	
<b>Chemical composition</b>	Primarily TiO <sub>2</sub> with traces of C			

Table 2: Sequence and target for primers used in qPCR.

Human gene		Forward primer	Reverse primer
Name	NM number		
RPL19	000981	gctctttcctttcgtgct	cattggctcattgggtct
RUNX2	004348	ggcccacaaatctcagatcggt	cactggcgcgtgcaacaagac
SOX9	000346	gtaccgcacttgcaaac	tcgctctcgttcagaagtctc
COL1A1	000088	acatggaccagcagactggca	tcactgtcttgccccaggct
COL3A1	000090	gcaccaccttcacccttacc	agggaaagatggcccaag
VCAM1	001078	aactgaacacttgactgtgatcg	tggaaaaaggaatccagggtg
BSP	004967	cgaatacacggcgctcaatg	gtagctgtactcatcttcatagcc
OCN	199173	ggcgtacctgtatcaatgg	tcagccaactcgtcacagtc
ALP	000478	aacaccaccagggggaac	ggtcacaatgccacagatt

## Figures captions

**Figure 1:** Characterization of planar and nanoporous titanium substrates by scanning electron microscopy. SEM micrographs of a) Ti, b) Ti 20, c) Ti 30, d) Ti 50

**Figure 2:** Osteogenesis PCR array results for hMSCs cultured on planar control (Ti) and nanostructured surface Ti 20, Ti 30 and Ti 50 for a) 1 week and b) 3 weeks. hMSC cultured on planar Ti in osteogenic medium were used as positive control (Ti osteo).

**Figure 3:** Effects of nanostructured titanium surfaces Ti 20, Ti 30 and Ti 50 on mRNA expression of selected genes in hMSC cultured for 1 and 3 weeks. RT-PCR of mRNA of a) Runx2 and Sox9; b) Col 1a1 and Col 3a1 and c) VCAM1 normalized by RPL19 in comparison to non cultured cells (D0), planar substrate in standard (Ti) or osteogenic media (Ti Osteo).

**Figure 4:** Effects of nanostructured titanium surface Ti 20, Ti 30 and Ti 50 on mRNA expression of osteogenic genes in hMSC cultured for 1 and 3 weeks. RT-PCR of mRNA of a) ALP; b) BSP and c) OCN normalized by RPL19 in comparison to non cultured cells (D0), planar substrate in standard (Ti) or osteogenic media (Ti Osteo).

**Figure 5:** Non-decalcified histology micrographs showing the osseointegration of smooth Ti and nanostructured Ti 20, Ti 30 and Ti 50 implanted in tibia of rats for 1 and 3 weeks. Basic fuschine and methylen blue staining. Bar scale: 300  $\mu$ m

**Figure 6:** BSEM images of smooth Ti and nanostructured implants Ti 20, Ti 30 and Ti 50 implanted in tibia of rats for 1 and 3 weeks. Bar scale: 300  $\mu$ m.

**Figure 7:** Percentages of bone-to-implant contact (BIC) measured for smooth Ti and nanostructured implants Ti 20, Ti 30 and Ti 50 implanted in tibia of rats for 1 and 3 weeks (\*  $p < 0.05$  compared to Ti).

**Figure 8:** Tensile pull-out testing measured for smooth Ti and nanostructured implants Ti 20, Ti 30 and Ti 50 implanted in tibia of rats for 1 and 3 weeks (\*  $p < 0.05$  compared to Ti).

Figure 1

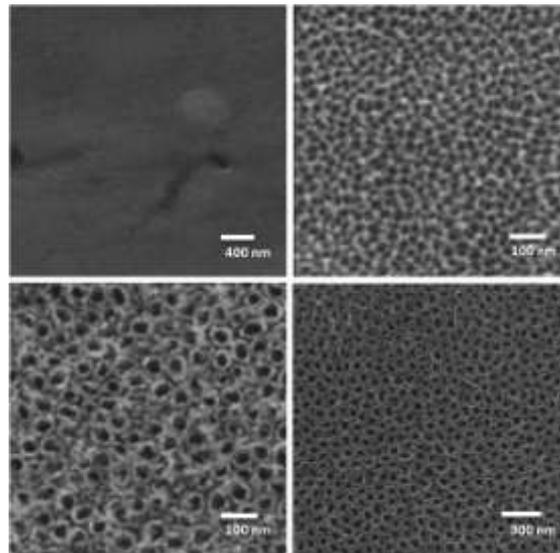
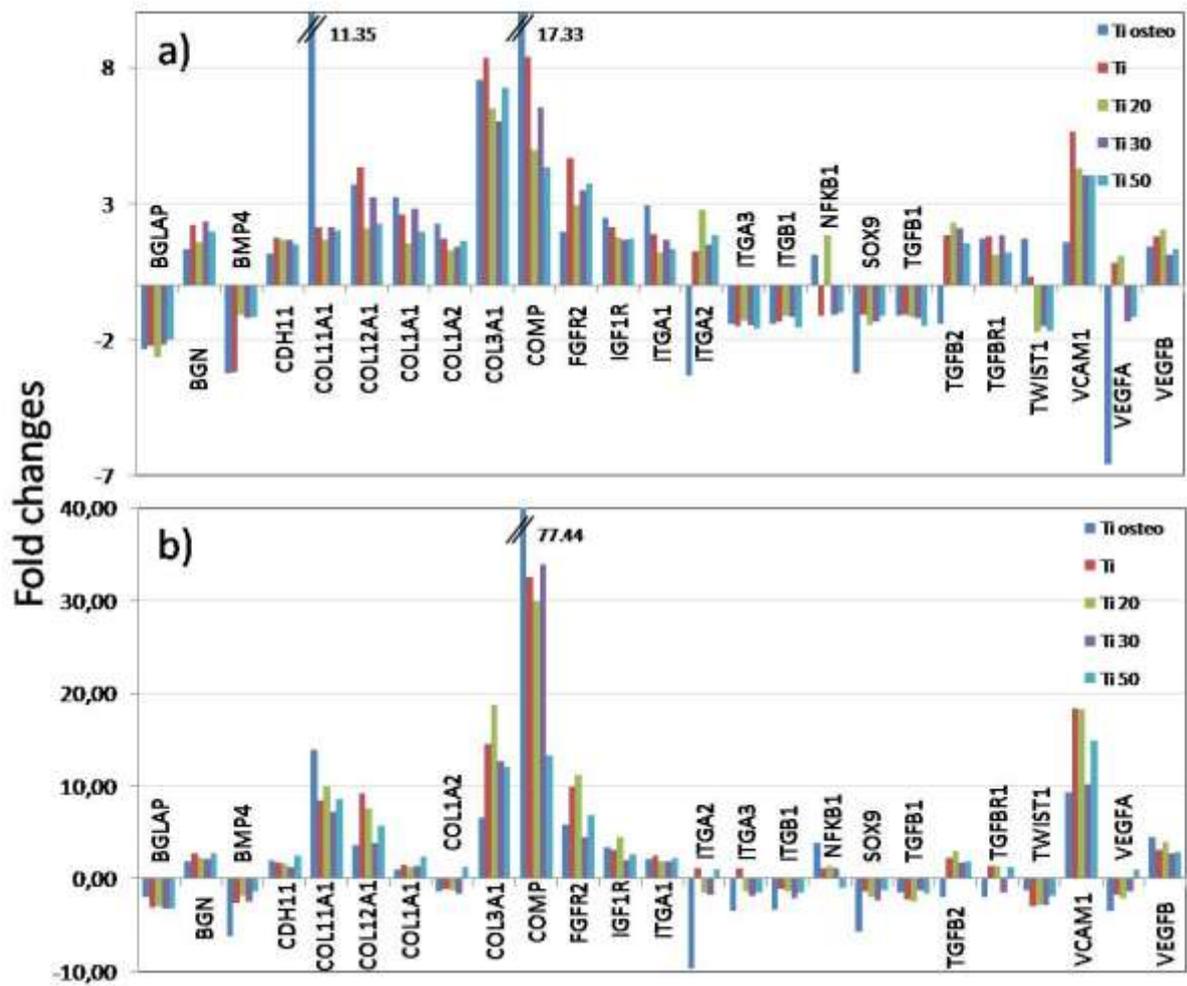


Figure 2



**Figure 3**

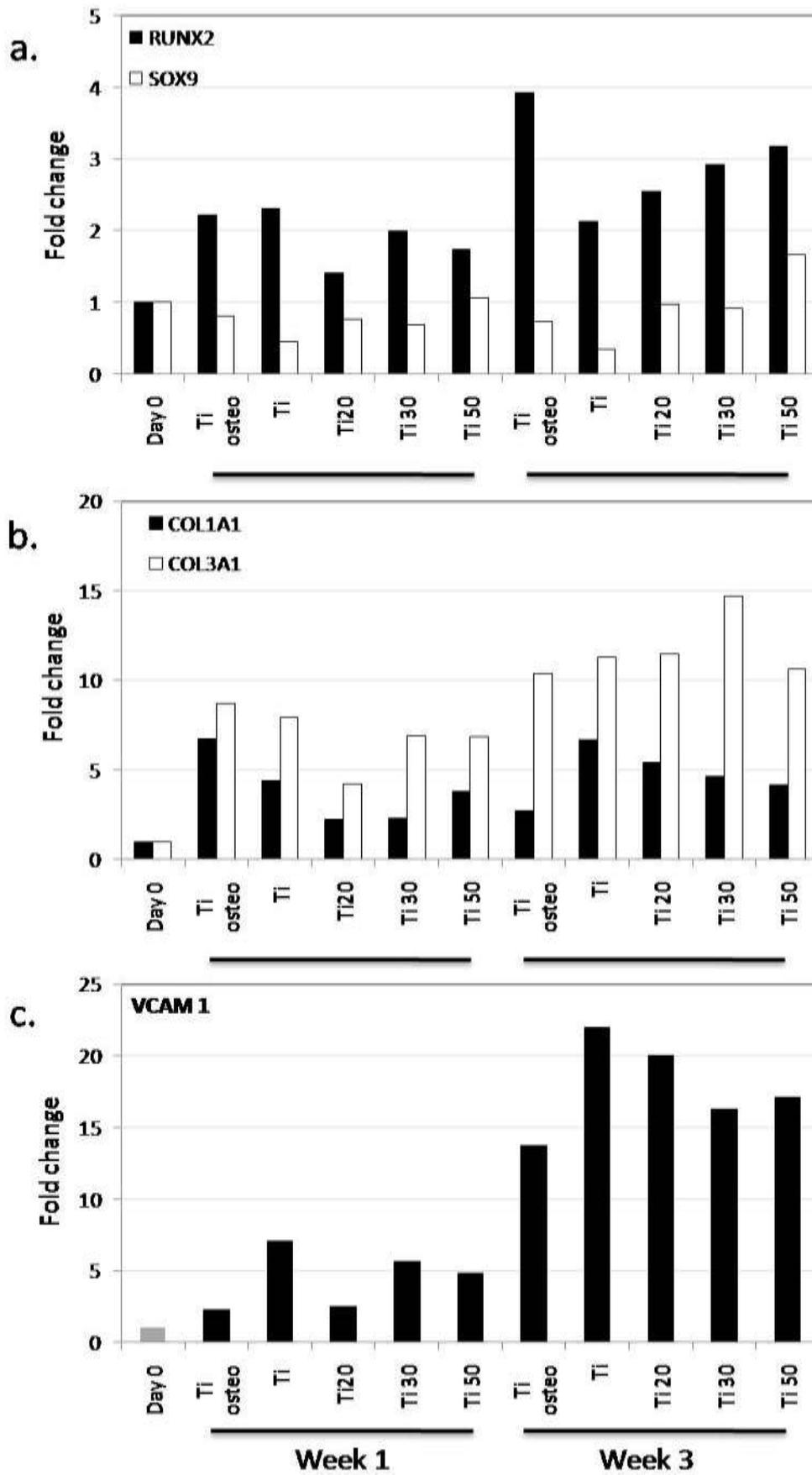


Figure 4

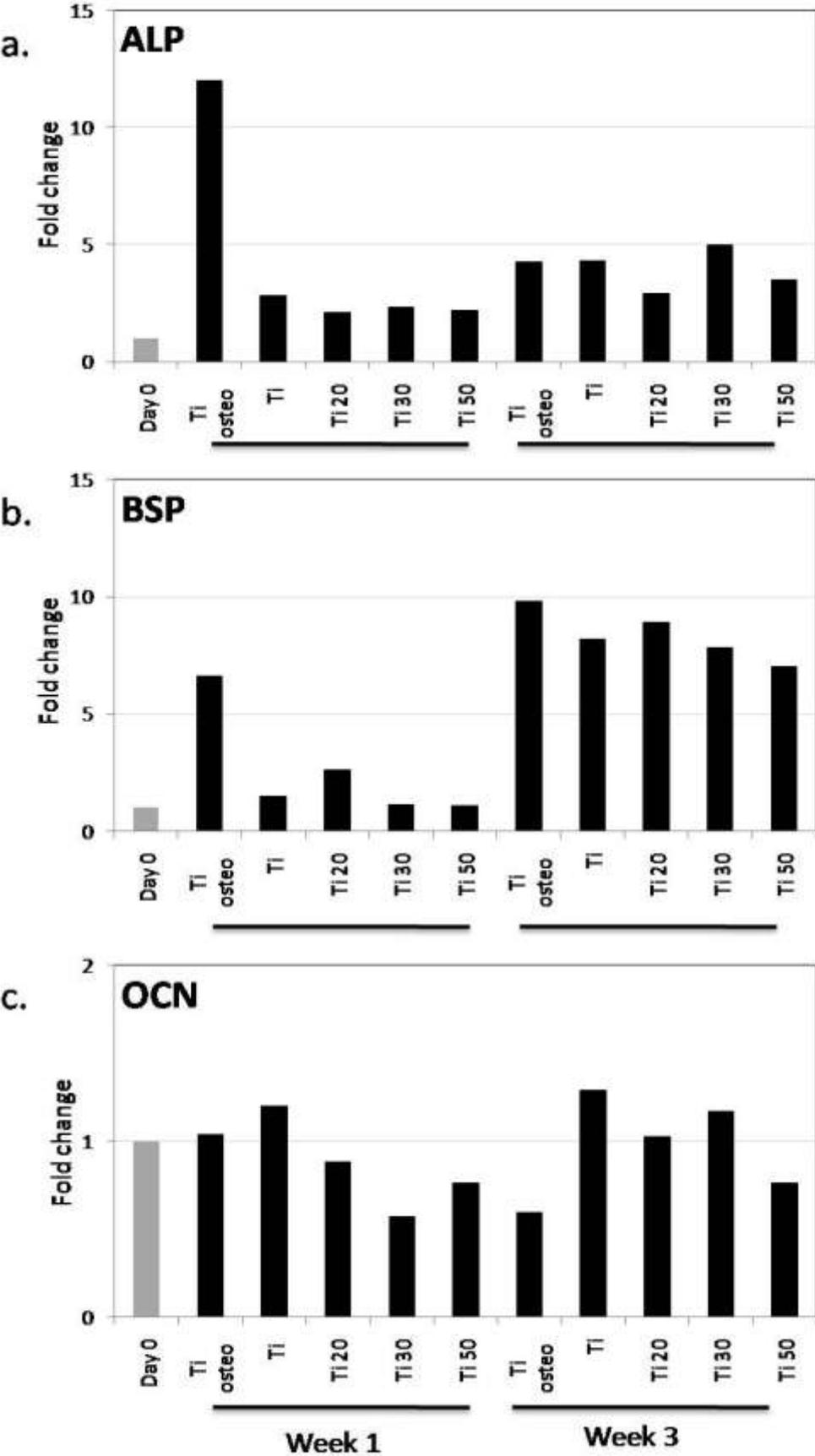


Figure 5

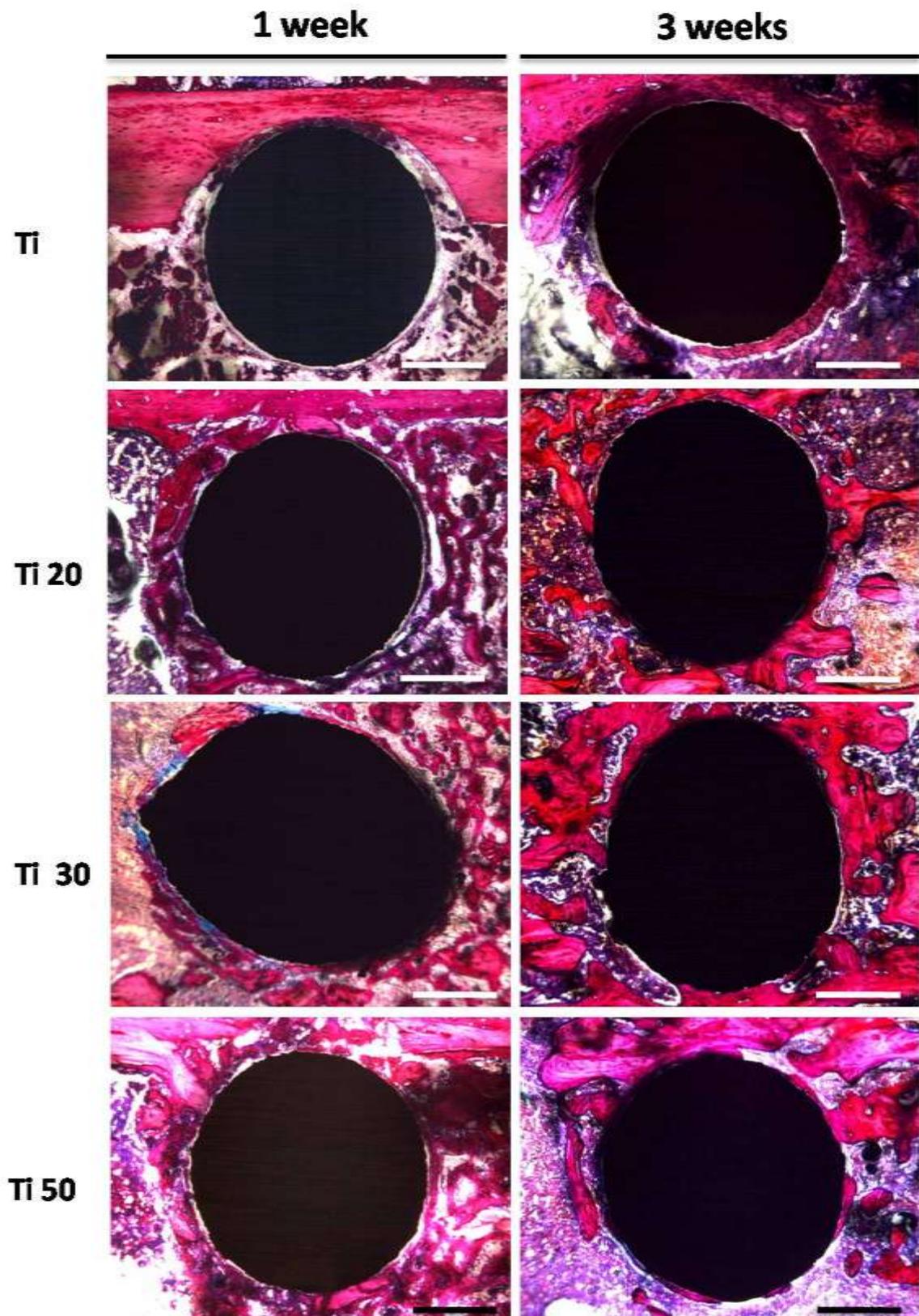


Figure 6

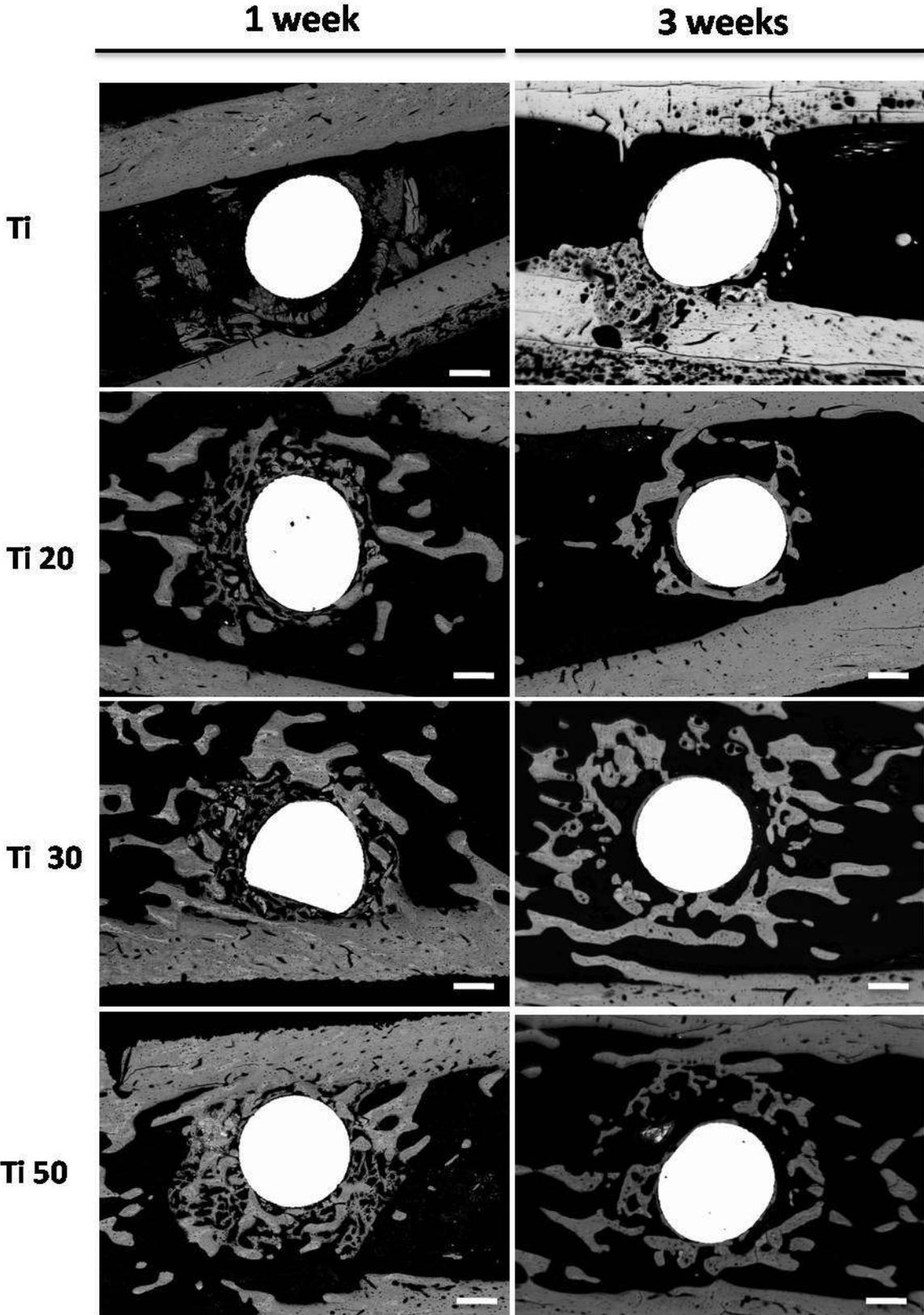


Figure 7

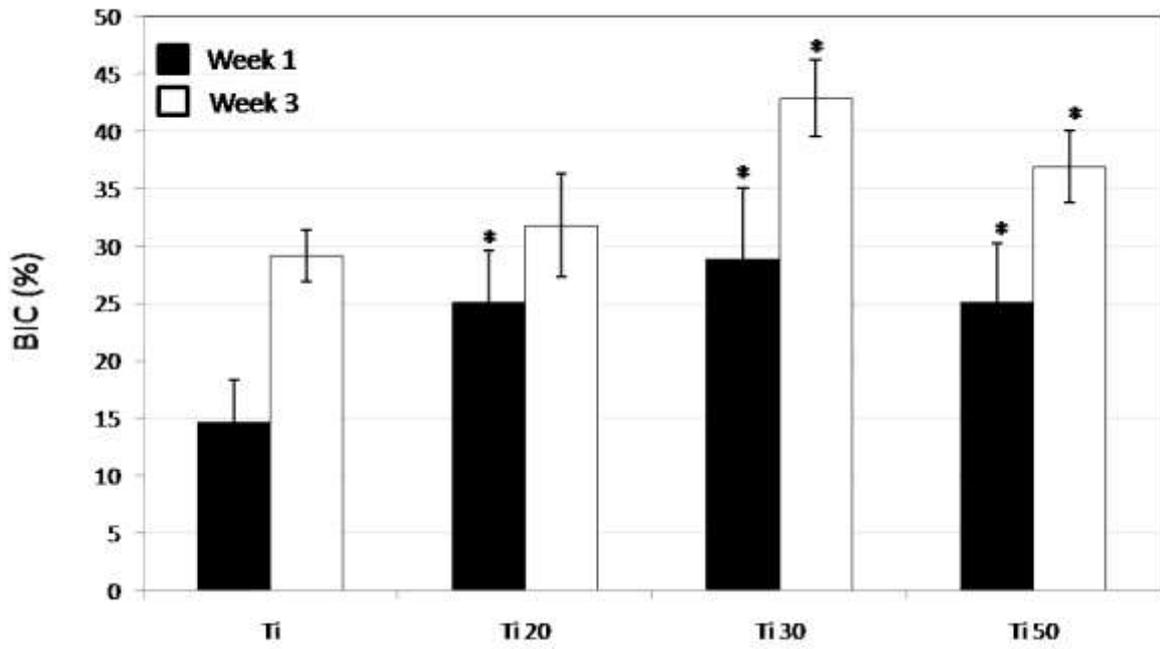
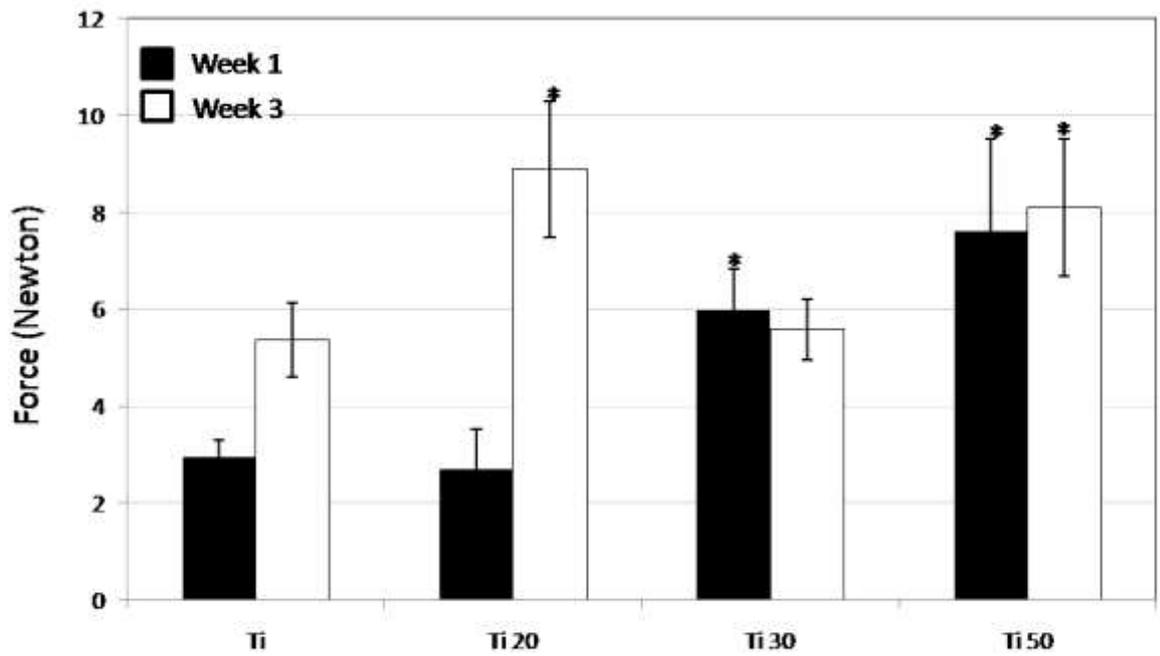


Figure 8



## IV. Discussion

De récentes études ont montré qu'une topographie au niveau nanométrique contrôle l'adhésion et la différenciation ostéogénique des cellules (Le Guehennec, h et al. 2008). Il semble que la nanostructure peut induire l'adhésion et la différenciation des cellules souches en ostéoblastes matures permettant une apposition osseuse directe plutôt qu'en fibroblastes entraînant une encapsulation fibreuse de l'implant. Cette hypothèse doit être validée avec des surfaces nanostructurées en titane par des études *in vitro* et *in vivo*.

Dans ce chapitre, les interactions à court et à long terme des cellules souches mésenchymateuses avec des surfaces nanostructurées en titane ont été étudiées. Au cours de la première étude (Article 3), nous avons montré l'influence des surfaces nanostructurées en titane sur l'expression des protéines d'adhésion telle que les intégrines et sur la différenciation ostéogéniques des CSM. Du titane nanostructuré ayant des pores de 30, 150 et 300 nm de diamètre ainsi que du titane lisse (control) ont servi de substrats à la culture des CSM. Cette étude a mis en évidence l'effet favorable de nanopores de 30 nm sur la différenciation ostéoblastique précoce des CSM. Lors de la seconde étude (Article 4), nous avons réalisé des nanopores de 20, 30 et 50 nm de diamètre par la technique d'anodisation sur des surfaces de titane. L'expression de gènes ostéoblastiques des CSM et l'ostéointégration de ces surfaces anodisées ont été réalisées.

L'étude de l'adhésion des CSM a montré l'influence des nanostructures sur l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion (e.g. les intégrines) et la MEC (e.g. les collagènes et les MMP). Nous avons pu ainsi montrer des modifications de l'expression génique en fonction de la taille des pores. L'expression génique semble être similaire pour les pores de 150 et 300 nm alors que les cellules cultivées sur Ti 30 présentent un profil différent. De manière plus précise, les surfaces nanostructurées influencent l'adhésion cellulaire en modulant l'expression des intégrines notamment les intégrines  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 5$  et des protéines de la matrice telle que la laminine 2. Par exemple, les sous unités  $\alpha 3$  et  $\alpha V$  sont sous exprimées sur Ti 30 et Ti 150 après 1 jour de culture alors qu'après 6 jours, aucune variation comparée au contrôle n'est observé. De récentes études ont identifié l'intégrine  $\beta 1$  comme étant nécessaire à la différenciation ostéoblastique sur des substrats en titane microrugueux (R Olivares-Navarrete et al. 2008; Wang et al. 2006). Malgré cela, la corrélation entre l'expression des intégrines et la différenciation des CSM, dans le contexte des interactions avec les surfaces implantaires, a été peu étudiée. La plupart des études disponibles concernent

des cellules différenciées. Par exemple, il a été montré que les ostéoblastes au contact de l'os, expriment des niveaux élevés d'intégrines  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha V\beta 5$  (Hughes et al. 1993; Hultenby et al. 1993) alors que l'adhésion des ostéoblastes à la vitronectine est médié spécifiquement par l'intégrine  $\alpha V\beta 5$ . Par ailleurs, l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est un récepteur membranaire de la fibronectine qui est impliqué dans l'étalement cellulaire, la prolifération, la différenciation, la migration et la survie de différents types cellulaires (Hamidouche et al. 2009; Moursi et al. 1997; Humphries et al. 2006). Cependant, le blocage de  $\alpha 5\beta 1$  par des anticorps, n'affecte pas la différenciation ostéoblastique sur du titane rugueux, suggérant qu'une autre sous-unité  $\alpha$  serait partenaire de  $\beta 1$  dans l'adhésion cellulaire.

Il a été établi que les intégrines font le lien entre les cellules et les composants de la MEC et servent de protéines signales dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation et la mobilité (Assoian & Zhu 1997; Clark & Brugge 1995; Damsky & Werb 1992; Kumar 1998; Lafrenie & Yamada 1996). Par ailleurs, la liaison de l'intégrine à son ligand va initier un certain nombre des modifications métaboliques notamment l'activation des sérine/thréonines kinases, de tyrosines kinases, une augmentation de l'afflux de  $Ca^{++}$  et de l'alkalinisation cytoplasmique, une altération du métabolisme des lipides à inositols et des changements de morphologie cellulaire (Lafrenie & Yamada 1996). Les changements de la morphologie cellulaire médiés par la tension du cytosquelette, ont un effet indirect sur la mécanotransduction comme démontré par des changements de l'expression RhoA dans la réponse des MSC à la dureté de la surface (Kilian et al. 2010; McBeath et al. 2004; Chen et al. 1997).

Suite à la fixation des intégrines à leur ligand de la MEC, des protéines vont s'aggréger près des intégrines notamment la taline, la vinculine liant l'actine et la tyrosine kinase des points focaux (FAK). Ce complexe va créer un lien entre la MEC et le cytosquelette cellulaire (Gingras et al. 2006; Hvidt 1991). La formation des points focaux se termine par le recrutement de l'actine se liant à l' $\alpha$ -actinine (Zaidel-Bar et al. 2003) et entraîne des modifications de la tension du cytosquelette et par conséquent, de la morphologie cellulaire. Plusieurs études ont montré que la morphologie cellulaire peut induire une différenciation des CSM (Kilian et al. 2010; McBeath et al. 2004) et inversement, la morphologie cellulaire va changer lors de la différenciation. Ainsi, des cellules rondes vont induire une différenciation adipogénique alors que des cellules très étalées vont se différencier en lignée ostéoblastique. Ces études montrent que le stress mécanique induit par la forme cellulaire, la tension du cytosquelette et la voie de signalisation de RhoA, sont impliqués dans la différenciation

cellulaire (Figure n°12) (McBeath et al. 2004). Dans notre étude, nous avons observé la morphologie cellulaire sur les différents substrats nanostructurés et à différents temps. Trois formes cellulaires ont été déterminées en fonction des observations microscopiques des CSM. Lors de l'ensemencement, de la division ou de la mort cellulaire, les cellules présentent une morphologie dite 'ronde' alors qu'en fin d'adhésion, les CSM présentent une morphologie de type fibroblastique nommée 'allongée'. Après différenciation ostéogénique, les CSM ont une forme 'étoilée', caractéristiques des ostéoblastes. De manière générale, nous avons montré que les nanopores de 30 nm semblaient induire une morphologie cellulaire dite 'étoilée' avec un nombre important de points focaux.

Cette morphologie étoilée va augmenter la contractibilité du cytosquelette, suggérant une différenciation ostéogénique préférentielle. Ces résultats suggèrent que Ti 30 induit une différenciation ostéogénique précoce des CSM.

Afin de valider cette dernière hypothèse, une étude de la différenciation ostéogénique sur les différents substrats a été réalisée par qPCR et coloration au rouge alizarine. Une étude précédente considérant la différenciation des CSM et des nanotopographies a été effectuée après 14 jours de culture (Dalby et al. 2007). Dans cette étude, les auteurs ont démontré qu'une nanotopographie non ordonnée stimule l'expression de gène ostéoblastique (OCN et ALP) en absence de facteur ostéogénique. En accord avec cette étude, nous avons montré que des nanopores entraînent des changements significatifs de l'expression des gènes ostéoblastiques en fonction de la taille des pores. Après 28 jours de culture, la minéralisation était clairement visible sur le Ti 30 et le Ti 150. Cependant, la surface la plus favorable à l'expression des facteurs ostéogéniques et à la minéralisation de la MEC semble être le Ti 30. Considérant les surfaces implantaire en titane, ces nanostructures peuvent diriger la différenciation ostéogénique des CSM permettant l'obtention d'une apposition osseuse. Nous avons décidé de travailler avec des diamètres de pores autour de 30 nm, diamètre favorable à la différenciation ostéogénique selon la première étude (Article 3). Au cours de la seconde étude (Article 4), nous avons corrélié l'effet des nanostructures *in vitro* et *in vivo*. Pour cela, nous avons réalisé des pores de 20, 30 et 50 nm par la technique d'anodisation et utilisé des surfaces lisses comme contrôle. L'expression de gènes ostéoblastiques des CSM et l'ostéointégration de ces surfaces anodisées ont été réalisées. Ces études ont mis en évidence l'effet favorable des nanopores de 30 et 50 nm sur la différenciation ostéoblastique précoce des CSM et sur la rapidité de l'ostéointégration.

L'étude par PCR array sur l'ostéogénèse a permis de comparer les profils d'expressions obtenus sur les surfaces nanostructures comparés à ceux obtenus sur le Ti en milieu ostéogénique. Ces PCR array indiquent que le Ti 30 a un profil d'expression comparable à celui obtenu sur le Ti osteo, ce qui a été confirmé par qPCR. Dans notre étude, Col 1a1, Col 3a1 et Col 12a1 sont sur-exprimés après 1 et 3 semaines de culture comparés au niveau basale à J0. Les Collagènes de type I et III sont localisés au niveau du tissu osseux (Hong et al. 2010) et ces gènes sont sur-exprimés dans les étapes précoces de la différenciation ostéoblastiques (Keene et al. 1991). Le collagène de type I détermine l'organisation spatiale et la stabilité structurale alors que le ratio avec les autres collagènes définit la résistance mécanique du tissu osseux. Le collagène de type III est impliqué dans le fibrillogénèse du collagène de type I (X Liu et al. 1997), modulant la taille de ces fibres durant la construction de la matrice osseuse (Kadler et al. 1990; Liu et al. 1997). Dans notre étude, une surexpression de Col 1a1 et de Col 3a1 est observée suggérant que les CSM produisent des protéines de la MEC osseuse sur les surfaces nanostructurées. De plus, nous avons observé une sur-expression de Col 12 qui est modulée par les contraintes mécaniques durant la différenciation ostéogénique (Chiquet et al. 1998; Collins et al. 1991).

Une variation importante de l'expression de COMP a été observée dans les PCR array mais le niveau de transcription était inférieur à celui d'autres gènes ostéogéniques. La valeur de seuil (Ct) était comprise entre 19 et 25 pour COMP comparée à 14-17 pour Col 1a1, par exemple. À l'origine décrit dans le cartilage, COMP a aussi été identifié dans les ligaments, le ménisque, les tendons, le liquide synovial, et les ostéoblastes (Di Cesare et al. 2000; DiCesare et al. 1994). Le domaine globulaire carboxyterminal de COMP se lie au collagène de type I, II et IX. La fonction de COMP reste peu claire. Des études ont montré que COMP influence la formation fibrille des collagènes de type I et II en facilitant la première association de molécules de collagène et par conséquent, en accélérant la fibrillogénèse (Halász et al. 2007). De plus, des études ont montré le rôle de la liaison du  $Ca^{++}$  dans la structure et la fonction de COMP (Briggs et al. 1995; K. Rosenberg et al. 1998). Cependant COMP est une protéine impliquée dans la différenciation chondroblastique, l'expression de Sox9 a par conséquent, été étudiée. Dans notre étude, l'expression de Sox9 est faible sur toutes les surfaces ce qui écarte une différenciation chondroblastique induite par les surfaces nanostructurées. Afin de confirmer, l'effet des nanostructures sur la différenciation des CSM, nous avons réalisé des qPCR pour l'ALP, la BSP et l'OCN. Nos résultats confirment ceux obtenus par Dalby et al (Dalby et al. 2007) ainsi que ceux de la première étude, à savoir que les nanostructures influencent de manière significative l'expression des gènes ostéoblastiques. En bref, Ti 30

semble être la surface permettant une différenciation ostéogénique des CSM avec une surexpression de l'ALP et de l'OCN après 3 semaines de culture.

Les nanostructures semblent jouer un rôle clé dans le contrôle de la différenciation des cellules. En retour, les surfaces nanostructurées peuvent permettre l'intégration tissulaire osseuse des implants. Des surfaces anodisées nanoporeuses en titane ont été récemment évaluées dans des modèles animaux (Oh et al. 2005; Park et al. 2007; von Wilmsky et al. 2009) et sont proposées comme des surfaces prometteuses pour l'implantologie (Briggs et al. 1995). Cependant, il y a toujours un manque de correspondance entre les expériences *in vitro* et *in vivo* concernant ces surfaces. La rugosité de surface est un des facteurs clés dans l'ostéointégration des implants en titane, mais peu de chose sont connues sur l'ostéointégration des nanotubes de titane *in vivo* (Sul 2010; von Wilmsky et al. 2009).

Des études ont prouvé que les nanostructures permettent une ostéointégration *in vivo* plus importante que les surfaces rugueuses (Bigerelle et al. 2002). Au cours de cette étude, nous avons observé une apposition osseuse plus rapide sur les implants nanostructurés comparé au contrôle. Ces résultats qualitatifs ont été confirmés par les pourcentages de contact os-implant (BIC), et par des tests d'arrachement. Ces deux études montrent une augmentation significative de l'ancrage mécanique des surfaces nanostructurées à l'os. Le contact os-implant et les forces d'arrachements sont des indices cliniquement appropriés pour l'ostéointégration. Néanmoins, la comparaison entre les différentes études est difficile en raison de l'influence des paramètres expérimentaux (Björsten et al. 2010). La détermination de la force de liaison entre l'os et l'implant indique la qualité du tissu osseux au contact de la surface. Dans notre étude, les tests d'arrachements ont été réalisés pour qualifier l'ostéointégration des différentes nanostructures comparé au contrôle. forces d'arrachements sur Ti 30 et Ti 50 ont confirmé les résultats de BIC après 1 semaine. Nos résultats de force de traction indiquent que la force nécessaire pour enlever les implants Ti 30 et Ti 50 des tibias de rats était significativement plus élevée (entre 6-8 N) que pour le Ti 20 et le contrôle (autour de 3 N) après 1 semaine. Des études ont montré que la force mesurée dépend de la méthode d'arrachement, du modèle animal utilisé, du module élastique, de la taille et de la localisation de l'implant (Buser et al. 1999). Il n'est donc pas facile de comparer quantitativement nos résultats avec ceux d'autres études. Néanmoins, une augmentation de la force de liaison os-implant a déjà été démontré sur des surfaces nanostructurées (Björsten et al. 2010; Sul 2010; Sul 2002a).

Dans ce chapitre, nous avons montré l'influence des nanopores sur le comportement des CSM. La première étude a mis en évidence la modulation de l'expression des intégrines, de la morphologie et de la différenciation ostéoblastique par les surfaces nanostructurées en titane. Les CSM présentaient une morphologie étoilée sur Ti 30 après 1 jour de culture comparé aux autres surfaces. De plus, les nanostructures les plus favorables à la différenciation ostéogénique étaient Ti 30 et Ti 150 tandis que Ti 300 avait un effet limité. Les nanopores de 30 nm semblent promouvoir une différenciation ostéoblastique précoce et par conséquent, une ostéointégration rapide des implants en titane. Au cours de la seconde étude, ce résultat a été confirmé. La présence de nanotubes ordonnés joue un rôle important dans l'ostéointégration. De plus, ces résultats démontrent que l'utilisation de surfaces de titane nanoporées est prometteuse dans le domaine de l'implantologie. Les prochaines études porteront sur l'optimisation des nanopores de titane afin d'obtenir les propriétés biologiques voulues.

# **Conclusions générales et perspectives**

Dans ce manuscrit, nous avons étudié l'adhésion et la différenciation de cellules souches mésenchymateuses sur différentes surfaces lisses et nanostructurées. De plus, nous avons tenté de corrélérer la différenciation ostéogénique à l'ostéointégration de surfaces nanostructurées.

Dans le premier chapitre bibliographique, nous avons rappelé l'organisation du tissu osseux et les propriétés des implants. Puis, nous avons souligné l'importance des nanostructures dans les interactions cellules/surfaces notamment l'adhésion et la différenciation cellulaire. Au cours du second chapitre, nous avons exposé les différentes techniques de préparation et de caractérisation des surfaces, de culture cellulaire, d'expression génique d'intégrine.

Dans le troisième chapitre, nous avons comparé l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire de hCSM, d'ostéoblastes (MC3T3-E1) et de fibroblastes (HGF-1) sur du plastique de culture (TCPS), du verre et du titane. Les 3 substrats avaient une rugosité de surface similaire au niveau nanométrique mais des compositions chimiques différentes. Afin d'étudier l'adhésion, nous avons développé une méthode quantitative basée sur l'immunomarquage de la vinculine, le marquage de l'actine et l'analyse d'image. Ce programme a permis de quantifier le nombre et la morphologie des cellules adhérentes ainsi que la densité des points focaux. Ainsi, les hCSM et les ostéoblastes présentent une morphologie principalement étoilée sur les différents substrats alors que les fibroblastes développent un nombre de points focaux plus important sur le titane que sur les TCPS ou le verre. De plus, une quantification de l'activité de l'alkaline phosphatase et de la coloration au rouge alizarine a indiqué une différenciation ostéoblastique des hCSM et des ostéoblastes plus importante sur le TCPS que sur le titane et le verre. Cette étude a montré que les propriétés de surface telles que la rugosité, la mouillabilité et la composition chimique modulent le comportement cellulaire. En particulier, les événements précoces telle que l'adhésion cellulaire, modifient la différenciation cellulaire. Enfin, ce travail a permis de mettre en place les protocoles expérimentaux permettant l'étude ultérieure des interactions entre cellules souches et surfaces nanostructurées.

Le dernier chapitre de cette thèse concernait l'étude des interactions à court et à long terme des cellules souches mésenchymateuses avec des surfaces nanostructurées en corrélation avec leur ostéointégration.

Dans une première étude (Article 3), nous avons utilisé une technique d'évaporation en phase gazeuse (PVD) pour produire des substrats de titane avec des tailles de pores contrôlées (30 ; 150 et 300 nm), mais de distribution aléatoire. L'adhésion cellulaire a été caractérisée par PCR array dédié aux protéines de l'adhésion et de la matrice extracellulaire et confirmé par l'étude de l'expression des intégrines par qPCR. Des profils différents ont été obtenus en fonction de la taille des nanopores démontrant l'influence des nanostructures sur l'adhésion cellulaire médié par les intégrines. Une étude de l'expression protéique ainsi que des blocages spécifiques des intégrines par des anticorps, est envisagée afin de déterminer l'implication de ces protéines dans les interactions cellules/surfaces. L'influence des nanostructures sur l'adhésion cellulaire a été confirmée par analyse de la morphologie cellulaire et de la densité des points focaux. Les résultats montrent que ces 2 paramètres sont fortement influencés par la taille des nanopores. Ainsi, la surface présentant des pores de 30 nm semble être celle qui est la plus favorable à l'adhésion cellulaire.

Le programme d'analyse d'image permet d'étudier le comportement des cellules adhérentes en considérant la morphologie et la densité des points focaux modulé par la réorganisation du cytosquelette au cours de l'adhésion cellulaire. Les données obtenues sur les différents substrats et à différents temps, sont utilisés afin de tester une modélisation de l'adhésion cellulaire mise au point par S. Wendling, P. Chabrand et J.L. Milan de l'Institut des Sciences du Mouvement à Marseille. Ce modèle est basé sur les réarrangements du cytosquelette, résultant de la mise en place d'un équilibre entre les forces mécaniques exercées par la MEC et les forces internes, au cours de l'adhésion. Ce modèle va être confronté aux données quantitatives obtenues par analyse d'images afin d'obtenir une corrélation entre la modélisation de l'adhésion cellulaire et les résultats expérimentaux. Cette modélisation pourra ainsi permettre de visualiser la réorganisation spatiale du cytosquelette au cours de l'adhésion sur différentes topographies de surface.

Au cours de cette étude (Article 3), nous avons quantifié l'adhésion cellulaire par l'expression de protéines spécifiques et la morphologie cellulaire sur les différents substrats. En parallèle, nous avons mis au point une technique permettant de mesurer la force d'adhésion des cellules à leur substrat. La spectroscopie de force à cellule unique est une technique qui utilise le principe de l'AFM. En bref, un microlevier, fonctionnalisé avec des protéines d'adhésion de la MEC, va venir au contact d'une cellule afin de permettre l'adhésion de celle-ci au levier. Une fois la cellule adhérente au levier, des courbes de force sont acquises sur les différents substrats (voir chapitre II, section 4.2). Ces travaux sont réalisés en collaboration avec P.

Bertoncini et S. Le Chevalier de l'Institut des Matériaux de Nantes (IMN). Les résultats préliminaires montrent une force d'adhésion des hCSM après 30 secondes de contact, plus importante sur le TCPS comparée aux substrats en titane lisse et anodisée. Ces résultats montrent que la cellule interagit avec son substrat, et que ces interactions précoces vont influencer l'adhésion cellulaire. En effet, lors de l'étude sur surfaces lisses (Article 2), les hCSM présentaient une densité de points focaux plus importante sur le TCPS que sur les autres substrats.

La morphologie cellulaire via les stress du cytosquelette, peut induire une différenciation cellulaire. Nous avons donc cherché à corréler les résultats obtenus sur l'adhésion cellulaire à ceux de la différenciation ostéogénique des CSM sur les substrats en titane nanostructurés. En accord avec la littérature, nous avons montré que des nanopores entraînaient des changements significatifs de l'expression des gènes ostéoblastiques en fonction de la taille des pores. Après 28 jours de culture, la minéralisation était clairement visible sur le Ti 30 et le Ti 150. Cependant, la surface la plus favorable à l'expression des facteurs ostéogéniques et à la minéralisation de la MEC semblent être le Ti 30. Cette première étude a montré que des pores de 30 nm semblaient promouvoir une différenciation ostéoblastique en absence des facteurs inducteurs.

Au cours de la seconde étude (Article 4), nous avons corrélé l'effet des nanostructures *in vitro* et *in vivo*. Nous avons décidé de travailler avec des diamètres de pores autour de 30 nm, diamètre favorable à la différenciation ostéogénique selon la première étude (article 3). Pour cela, nous avons réalisé des pores de 20, 30 et 50 nm par la technique d'anodisation et utilisé des surfaces lisses comme contrôle. L'expression de gènes ostéoblastiques des CSM et l'ostéointégration de ces surfaces anodisées ont été réalisées.

L'étude de l'expression génique a mis en évidence l'effet favorable des nanopores de 30 et 50 nm sur la différenciation ostéoblastique précoce des CSM. Les PCR array indiquent que le Ti 30 a un profil d'expression comparable à celui sur le Ti osteo, ce qui a été confirmé par qPCR. De plus, une variation d'expression de Col 1a1, Col 3a1, Runx2 a été observé sur les différents substrats nanostructurés, montrant l'importance de la taille des pores dans les effets cellulaires. Une étude cinétique de l'expression génique va permettre de déterminer de manière plus précise l'influence des nanostructures sur la différenciation ostéoblastique. De plus, le blocage de voies de signalisation par des inhibiteurs spécifiques ainsi que l'étude de l'expression des protéines par western blot, sont envisagés afin de déterminer les mécanismes cellulaires impliqués dans les interactions cellules-matériaux. Ces différentes études ont

montré que les nanostructures semblent jouer un rôle clé dans le contrôle de la différenciation des CSM. De plus, la rugosité de surface est un des facteurs clés dans l'ostéointégration des implants en titane, mais peu de chose sont connues sur l'ostéointégration des nanotubes de titane *in vivo*.

Au cours de cette étude, nous avons observé une apposition osseuse plus rapide sur les implants nanostructurés par rapport au contrôle. Ces résultats qualitatifs ont été confirmés par les pourcentages de contact os-implant (BIC), et par des tests d'arrachement. Nos résultats de force de traction indiquent que la force nécessaire pour enlever les implants Ti 30 et Ti 50 des tibias de rats était significativement plus élevée (entre 6-8 N) que pour le Ti 20 et le contrôle (autour de 3 N) après 1 semaine. Ces résultats confirment que la présence de nanotubes ordonnés joue un rôle important dans l'ostéointégration. Les surfaces Ti 30 accélèrent la cicatrisation osseuse péri-implantaire en accord avec les résultats *in vitro*.

Cette étude a donc mis en évidence un effet des nanopores sur la différenciation ostéoblastique et sur la rapidité de l'ostéointégration confirmant les résultats obtenus lors de l'étude précédente. Afin de mieux comprendre l'effet des nanopores de titane sur l'ostéointégration et déterminer la (ou les) surface optimale, des pores de diamètres différents compris entre 15 et 100 nm vont être réalisés sur des implants de titane en forme de vis avec des chambres de croissance osseuse (Buser et al. 2004 ; Leguehennec et al. 2008).

# Listes des figures et tableaux

Figure 1: Implant dentaire montrant une surface différente en fonction du tissu environnant	14
Figure 2: Schéma général de l'hématopoïèse.....	17
Figure 3: Structure d'un os long, modifiée .....	18
Figure 4 : Lignées cellulaires osseuses et les effets des principales hormones l.....	21
Figure 5: Les ostéoblastes proviennent de la différenciation de CSM.....	22
Figure 6 : Différenciation ostéoclastique à partir d'un précurseur hématopoïétique .....	25
Figure 7 : Les différentes étapes du remodelage osseux .....	26
Figure 8 : Analyse physicochimique et topographique de surface des implants, l'adsorption de protéines et interaction avec la cellule. ....	37
Figure 9 : Influence de la surface sur la morphologie cellulaire et la différenciation.....	41
Figure 10 : Représentation schématique de la membrane plasmique d'une cellule.....	43
Figure 11: Formation des différents hétérodimères d'intégrines et leurs ligands. ....	45
Figure 12 : Liaison des intégrines aux cytosquelette et voies de signalisation .....	47
Figure 13: Les étapes successives de l'adhésion cellulaire sur une surface nanostructurée... ..	49
Figure 14 : facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses et protéines sécrétées au cours de la différenciation ostéoblastiques. ....	53
Figure 15: Ostéointégration d'implants en titane (Ti) ou recouvert de Cap. ....	60
Figure 16 : Schéma de principe de la métallisation par PVD .....	82
Figure 17 : Représentation schématique de l'immobilisation des membranes de polycarbonate au fond des puits avec un cylindre de verre .....	83
Figure 18: Schéma du montage de la technique d'anodisation .....	84
Figure 19: Analyse par cytométrie en flux des marqueurs cellulaires .....	91
Figure 20: Coloration au rouge alizarine de CSM .....	91
Figure 21: Spectre d'approche du micro levier sur une surface dur et à l'air .....	93
Figure 22: Spectre de force mesuré lors du détachement d'une CSM .....	94
Figure 23: Analyse de la morphologie cellulaire des CSM. ....	96
Figure 24 : Liaison des intégrines à la matrice extracellulaire et voie de signalisation	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

# Références bibliographiques

- Aarden, E.M., Burger, E.H. & Nijweide, P.J., 1994. Function of osteocytes in bone. *Journal of Cellular Biochemistry*, 55(3), 287-299.
- Agis, H. et al., 2009. Activated platelets increase fibrinolysis of mesenchymal progenitor cells. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 27(7), 972-980.
- Akiyama, S. et al., 1997. Constitutively active BMP type I receptors transduce BMP-2 signals without the ligand in C2C12 myoblasts. *Experimental Cell Research*, 235(2), 362-369.
- Albrektsson et al., 1981. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 52(2), 155-170.
- Albrektsson & Wennerberg, 2005. The impact of oral implants - past and future, 1966-2042. *Journal (Canadian Dental Association)*, 71(5), 327.
- Alford, A.I. & Hankenson, K.D., 2006. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone*, 38(6), 749-757.
- Anderson, , D. et al., 2005. Sustained osteomalacia of long bones despite major improvement in other hypophosphatasia-related mineral deficits in tissue nonspecific alkaline phosphatase/nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 double-deficient mice. *The American Journal of Pathology*, 166(6), 1711-1720.
- Anderson, , R. & Tague, S.E., 2005. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 10, 822-837.
- Andersson et al., 2003. Influence of systematically varied nanoscale topography on the morphology of epithelial cells. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 2(2), 49-57.
- André, P. et al., 1990. Use of conjugates made between a cytolytic T cell clone and target cells to study the redistribution of membrane molecules in cell contact areas. *Journal of Cell Science*, 97 ( Pt 2), 335-347.
- Angel, P. & Karin, M., 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1072(2-3), 129-157.
- Anselme & Bigerelle, 2006. Modelling approach in cell/material interactions studies. *Biomaterials*, 27(8), 1187-1199.
- Anselme, K., 2000. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 21(7), 667-681.
- Anselme, K. et al., 1999. Association of porous hydroxyapatite and bone marrow cells for bone regeneration. *Bone*, 25(2 Suppl), 51S-54S.
- Anselme, K. & Bigerelle, M., 2006. Statistical demonstration of the relative effect of surface chemistry and roughness on human osteoblast short-term adhesion. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 17(5), 471-479.
- Anselme, K. et al., 2000. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *Journal of Biomedical Materials Research*, 49(2), 155-166.
- Anselme, K. et al., 2002. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *Journal of Biomedical Materials Research*, 60(4), 529-540.
- Anselme, K., Noël, B. & Hardouin, P., 1999. Human osteoblast adhesion on titanium alloy, stainless steel, glass and plastic substrates with same surface topography. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 10(12), 815-819.
- Aoki, H. et al., 2001. Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 8), 1483-1489.

- Aplin, A.E., Howe, A.K. & Juliano, R.L., 1999. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(6), 737-744.
- Arai, K. et al., 2008. Mechanical strain increases expression of type XII collagen in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Cell Structure and Function*, 33(2), 203-210.
- Ardman, B., Sikorski, M.A. & Staunton, D.E., 1992. CD43 interferes with T-lymphocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(11), 5001-5005.
- Arold, S.T., Hoellerer, M.K. & Noble, M.E.M., 2002. The structural basis of localization and signaling by the focal adhesion targeting domain. *Structure (London, England: 1993)*, 10(3), 319-327.
- Assoian, R.K. & Zhu, X., 1997. Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(1), 93-98.
- Bagno, A. & Di Bello, C., 2004. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 15(9), 935-949.
- Balasundaram, G., Sato, M. & Webster, T.J., 2006. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials*, 27(14), 2798-2805.
- Barrère, F. et al., 2003. Osteointegration of biomimetic apatite coating applied onto dense and porous metal implants in femurs of goats. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 67(1), 655-665.
- Beck, Zerler, B. & Moran, E., 2000. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), 8352-8357.
- Becker et al., 2000. A prospective multicenter clinical trial comparing one- and two-stage titanium screw-shaped fixtures with one-stage plasma-sprayed solid-screw fixtures. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 2(3), 159-165.
- Bhadriraju, K. et al., 2007. Activation of ROCK by RhoA is regulated by cell adhesion, shape, and cytoskeletal tension. *Experimental Cell Research*, 313(16), 3616-3623.
- Bhatia, S.N., Yarmush, M.L. & Toner, M., 1997. Controlling cell interactions by micropatterning in co-cultures: hepatocytes and 3T3 fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, 34(2), 189-199.
- Bianco, P. & Cossu, G., 1999. Uno, nessuno e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors. *Experimental Cell Research*, 251(2), 257-263.
- Bianco, P. et al., 1988. Immunohistochemical localization of osteonectin in developing human and calf bone using monoclonal antibodies. *Calcified Tissue International*, 43(3), 155-161.
- Bigerelle, M. & Anselme, K., 2005. Statistical correlation between cell adhesion and proliferation on biocompatible metallic materials. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 72(1), 36-46.
- Bigerelle, M. et al., 2002. Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: a new process to increase in vitro human osteoblast response. *Biomaterials*, 23(7), 1563-1577.
- Biggs, M.J.P. et al., 2007. The effects of nanoscale pits on primary human osteoblast adhesion formation and cellular spreading. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 18(2), 399-404.
- Bjurstén, L.M. et al., 2010. Titanium dioxide nanotubes enhance bone bonding in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 92(3), 1218-1224.
- Blair, H.C. et al., 1986. Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. *The Journal of Cell Biology*, 102(4), 1164-1172.

- Bonewald, L.F. et al., 2003. von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcified Tissue International*, 72(5), 537-547.
- Bornstein, P. & Sage, E.H., 2002. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(5), 608-616.
- Boskey, A.L., Wians, F.H. & Hauschka, P.V., 1985. The effect of osteocalcin on in vitro lipid-induced hydroxyapatite formation and seeded hydroxyapatite growth. *Calcified Tissue International*, 37(1), 57-62.
- Bowers, K.T. et al., 1992. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 7(3), 302-310.
- Boyan et al., 1996. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*, 17(2), 137-146.
- Boyan, B.D., Schwartz, Z. & Hambleton, J.C., 1993. Response of bone and cartilage cells to biomaterials in vivo and in vitro. *The Journal of Oral Implantology*, 19(2), 116-122; discussion 136-137.
- Brammer, K.S. et al., 2009. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO<sub>2</sub> nanotube surface. *Acta Biomaterialia*, 5(8), 3215-3223.
- Brånemark, P.I. et al., 1983. Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. *Biomaterials*, 4(1), 25-28.
- Brett, P.M. et al., 2004. Roughness response genes in osteoblasts. *Bone*, 35(1), 124-133.
- Briggs, M.D. et al., 1995. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene. *Nature Genetics*, 10(3), 330-336.
- Broberg, M., Eriksson, C. & Nygren, H., 2002. GpIIb/IIIa is the main receptor for initial platelet adhesion to glass and titanium surfaces in contact with whole blood. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 139(3), 163-172.
- Buser, D. et al., 2004. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *Journal of Dental Research*, 83(7), 529-533.
- Buser, D. et al., 1999. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *Journal of Biomedical Materials Research*, 45(2), 75-83.
- Buser, D. et al., 1991. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *Journal of Biomedical Materials Research*, 25(7), 889-902.
- Cai, Bossert, J. & Jandt, K.D., 2006. Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 49(2), 136-144.
- Cai, K. et al., 2006. Surface functionalized titanium thin films: zeta-potential, protein adsorption and cell proliferation. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 50(1), 1-8.
- Calderwood, D.A., 2004. Integrin activation. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 5), 657-666.
- Caplan, A.I., 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 9(5), 641-650.
- Caplan, A.I., 2009. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of Pathology*, 217(2), 318-324.
- Caplan, A.I. & Dennis, J.E., 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98(5), 1076-1084.

- Catelas, I., Dwyer, J.F. & Helgerson, S., 2008. Controlled release of bioactive transforming growth factor beta-1 from fibrin gels in vitro. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 14(2), 119-128.
- Catelas, I. et al., 2006. Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. *Tissue Engineering*, 12(8), 2385-2396.
- Chambers & Fuller, K., 1985. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *Journal of Cell Science*, 76, 155-165.
- Chan, P.Y. & Springer, T.A., 1992. Effect of lengthening lymphocyte function-associated antigen 3 on adhesion to CD2. *Molecular Biology of the Cell*, 3(2), 157-166.
- Chang, Y.L. et al., 1999. Biomechanical and morphometric analysis of hydroxyapatite-coated implants with varying crystallinity. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 57(9), 1096-1108; discussion 1108-1109.
- Chehroudi & Brunette, 2002. Subcutaneous microfabricated surfaces inhibit epithelial recession and promote long-term survival of percutaneous implants. *Biomaterials*, 23(1), 229-237.
- Chen, Shapiro, H.S. & Sodek, J., 1992. Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 7(8), 987-997.
- Chen, C.S. et al., 1997. Geometric control of cell life and death. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5317), 1425-1428.
- Chiquet, M. et al., 1998. The chick and human collagen alpha1(XII) gene promoter--activity of highly conserved regions around the first exon and in the first intron. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 257(2), 362-371.
- Chivu, M. et al., 2009. In vitro hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells under differential exposure to liver-specific factors. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 154(3), 122-132.
- Chuluyan, H.E. et al., 1995. IL-1 activation of endothelium supports VLA-4 (CD49d/CD29)-mediated monocyte transendothelial migration to C5a, MIP-1 alpha, RANTES, and PAF but inhibits migration to MCP-1: a regulatory role for endothelium-derived MCP-1. *Journal of Leukocyte Biology*, 58(1), 71-79.
- Citeau, A. et al., 2005. In vitro biological effects of titanium rough surface obtained by calcium phosphate grid blasting. *Biomaterials*, 26(2), 157-165.
- Clark, E.A. & Brugge, J.S., 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5208), 233-239.
- Clarke, B., 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 3 Suppl 3, S131-139.
- Cochran et al., 1998. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. *Journal of Biomedical Materials Research*, 40(1), 1-11.
- Cohen, A. et al., 2007. Decreased fibroblast and increased osteoblast functions on ionic plasma deposited nanostructured Ti coatings. , 385-390.
- Collins, J.F. et al., 1991. Elastase activity in bronchoalveolar lavage fluid from oxygen-exposed, Pseudomonas-infected baboons. *Lung*, 169(3), 165-179.
- Costa e Silva Filho, F. & Menezes, G., 2004. Osteoblasts attachment and adhesion: how bone cells fit fibronectin-coated surfaces. *Materials Sciences and Engineering: C*, 637-641.

- Covani, U. et al., 2007. Biomaterials for orthopedics: a roughness analysis by atomic force microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 82(3), 723-730.
- Covas, D.T. et al., 2008. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental Hematology*, 36(5), 642-654.
- Critchley, D.R., 2000. Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(1), 133-139.
- Curtis, A.S. et al., 2001. Substratum nanotopography and the adhesion of biological cells. Are symmetry or regularity of nanotopography important? *Biophysical Chemistry*, 94(3), 275-283.
- Curtis, A.S. & Varde, M., 1964. CONTROL OF CELL BEHAVIOR: TOPOLOGICAL FACTORS. *Journal of the National Cancer Institute*, 33, 15-26.
- Curtis, A., Sokolikova-Csaderova, L. & Aitchison, G., 2007. Measuring cell forces by a photoelastic method. *Biophysical Journal*, 92(6), 2255-2261.
- Daculsi, G. et al., 2003. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 14(3), 195-200.
- Dalby et al., 2006. Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies. *Biomaterials*, 27(15), 2980-2987.
- Dalby et al., 2007. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nature Materials*, 6(12), 997-1003.
- Dalby et al., 2006. Osteoprogenitor response to defined topographies with nanoscale depths. *Biomaterials*, 27(8), 1306-1315.
- Dalby, M.J., Gadegaard, N., Curtis, A.S.G. et al., 2007. Nanotopographical control of human osteoprogenitor differentiation. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 2(2), 129-138.
- Dalby, M.J., Gadegaard, N., Herzyk, P. et al., 2007. Nanomechanotransduction and interphase nuclear organization influence on genomic control. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102(5), 1234-1244.
- Damsky, C.H. & Werb, Z., 1992. Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Current Opinion in Cell Biology*, 4(5), 772-781.
- Danen, E.H. & Yamada, K.M., 2001. Fibronectin, integrins, and growth control. *Journal of Cellular Physiology*, 189(1), 1-13.
- Darimont, G.L. et al., 2002. In vivo behaviour of hydroxyapatite coatings on titanium implants: a quantitative study in the rabbit. *Biomaterials*, 23(12), 2569-2575.
- Davies, 1998. Mechanisms of endosseous integration. *The International Journal of Prosthodontics*, 11(5), 391-401.
- Davies, 2003. Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of Dental Education*, 67(8), 932-949.
- Davies, J.E., 2003a. Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of Dental Education*, 67(8), 932-949.
- Davies, J.E., 2003b. Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of Dental Education*, 67(8), 932-949.
- Dedhar, S. & Hannigan, G.E., 1996. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Current Opinion in Cell Biology*, 8(5), 657-669.

- Deligianni, D.D. et al., 2001. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*, 22(1), 87-96.
- Di Cesare, P.E. et al., 2000. Expression of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) by embryonic and adult osteoblasts. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 18(5), 713-720.
- DiCesare, P. et al., 1994. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. *FEBS Letters*, 354(2), 237-240.
- Ducy, P. et al., 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, 382(6590), 448-452.
- Eisenbarth, E. et al., 1996. Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts. *Biomaterials*, 17(14), 1399-1403.
- Elwing, H., 1998. Protein absorption and ellipsometry in biomaterial research. *Biomaterials*, 19(4-5), 397-406.
- Engler, A.J. et al., 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4), 677-689.
- Eriksson, C., Nygren, H. & Ohlson, K., 2004. Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone. *Biomaterials*, 25(19), 4759-4766.
- Esposito, M. et al., 1998a. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *European Journal of Oral Sciences*, 106(1), 527-551.
- Esposito, M. et al., 1998b. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *European Journal of Oral Sciences*, 106(3), 721-764.
- Faghihi, S. et al., 2007. Cellular and molecular interactions between MC3T3-E1 pre-osteoblasts and nanostructured titanium produced by high-pressure torsion. *Biomaterials*, 28(27), 3887-3895.
- Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I. et al., 2006. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal*, 11(1), E47-51.
- Fiedler, J. et al., 2005. VEGF-A and PlGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(2), 561-568.
- Fisher, L.W. & Fedarko, N.S., 2003. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connective Tissue Research*, 44 Suppl 1, 33-40.
- van der Flier, A. & Sonnenberg, A., 2001. Function and interactions of integrins. *Cell and Tissue Research*, 305(3), 285-298.
- Friedenstein, A.J. et al., 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6(2), 230-247.
- Frosch, K. et al., 2004. Growth behavior, matrix production, and gene expression of human osteoblasts in defined cylindrical titanium channels. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 68(2), 325-334.
- Fujisawa, R., Nodasaka, Y. & Kuboki, Y., 1995. Further characterization of interaction between bone sialoprotein (BSP) and collagen. *Calcified Tissue International*, 56(2), 140-144.
- Geesink, R.G., de Groot, K. & Klein, C.P., 1987. Chemical implant fixation using hydroxyl-apatite coatings. The development of a human total hip prosthesis for chemical fixation to bone using hydroxyl-apatite coatings on titanium substrates. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (225), 147-170.
- Geesink, R.G.T., 2002. Osteoconductive coatings for total joint arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related*

- Research*, (395), 53-65.
- Gericke, A. et al., 2005. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcified Tissue International*, 77(1), 45-54.
- Geurs, N.C. et al., 2002. Influence of implant geometry and surface characteristics on progressive osseointegration. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 17(6), 811-815.
- Gingras, A.R. et al., 2006. Structural and dynamic characterization of a vinculin binding site in the talin rod. *Biochemistry*, 45(6), 1805-1817.
- Glowacki, J. et al., 1991. A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 45(3), 292-302.
- González-García, C. et al., 2010. Effect of nanoscale topography on fibronectin adsorption, focal adhesion size and matrix organisation. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 77(2), 181-190.
- Göransson, A. et al., 2003. Bone formation after 4 weeks around blood-plasma-modified titanium implants with varying surface topographies: an in vivo study. *Biomaterials*, 24(2), 197-205.
- Gotfredsen, K. et al., 1995. Anchorage of TiO<sub>2</sub>-blasted, HA-coated, and machined implants: an experimental study with rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research*, 29(10), 1223-1231.
- Gregory, C.A. et al., 2004. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry*, 329(1), 77-84.
- Halász, K. et al., 2007. COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(43), 31166-31173.
- Hall, 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5350), 509-514.
- Hamidouche, Z. et al., 2009. Priming integrin alpha5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), 18587-18591.
- Hämmerle, C.H. et al., 1996. The effect of subcrestal placement of the polished surface of ITI implants on marginal soft and hard tissues. *Clinical Oral Implants Research*, 7(2), 111-119.
- Hansson & Norton, M., 1999. The relation between surface roughness and interfacial shear strength for bone-anchored implants. A mathematical model. *Journal of Biomechanics*, 32(8), 829-836.
- Hartmann, C., 2006. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends in Cell Biology*, 16(3), 151-158.
- Hayashi, I., Vuori, K. & Liddington, R.C., 2002. The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. *Nature Structural Biology*, 9(2), 101-106.
- He, Q., Wan, C. & Li, G., 2007. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(1), 69-77.
- Hill, P.A., 1998. Bone remodelling. *British Journal of Orthodontics*, 25(2), 101-107.
- Hobkirk, J.A., 1983. Progress in implant research. *International Dental Journal*, 33(4), 341-349.
- Hong, D. et al., 2010. Morphological and proteomic analysis of early stage of osteoblast differentiation in osteoblastic progenitor cells. *Experimental Cell Research*, 316(14), 2291-2300.
- Hoogduijn, M.J. et al., 2007. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells and Development*, 16(4), 597-604.
- Horwood, N.J. et al., 1998. Interleukin 18 inhibits osteoclast formation via T cell production of granulocyte

- macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(3), 595-603.
- Huang, Y. et al., 2005. Bone formation at titanium porous oxide (TiUnite) oral implants in type IV bone. *Clinical Oral Implants Research*, 16(1), 105-111.
- Hughes, D.E. et al., 1993. Integrin expression in human bone. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 8(5), 527-533.
- Hultenby, K., Reinholt, F.P. & Heinegård, D., 1993. Distribution of integrin subunits on rat metaphyseal osteoclasts and osteoblasts. *European Journal of Cell Biology*, 62(1), 86-93.
- Humphries, J.D., Byron, A. & Humphries, M.J., 2006. Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 19), 3901-3903.
- Humphries, M.J., 2000. Integrin structure. *Biochemical Society Transactions*, 28(4), 311-339.
- Hunt, B.J. et al., 1997. Activation of coagulation and platelets is affected by the hydrophobicity of artificial surfaces. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*, 8(4), 223-231.
- Hunter, Kyle, C.L. & Goldberg, H.A., 1994. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *The Biochemical Journal*, 300 ( Pt 3), 723-728.
- Hunter, G.K. et al., 1996. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *The Biochemical Journal*, 317 ( Pt 1), 59-64.
- Hvidt, S., 1991. Insulin association in neutral solutions studied by light scattering. *Biophysical Chemistry*, 39(2), 205-213.
- Ichim, T.E. et al., 2010. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cellular Immunology*, 260(2), 75-82.
- Issekutz, T.B., 1995. In vivo blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, IL-1 alpha, TNF-alpha, IFN-gamma, and C5a utilizes LFA-1, Mac-1, and VLA-4. The relative importance of each integrin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 154(12), 6533-6540.
- Jansen et al., 1991. Histologic evaluation of the osseous adaptation to titanium and hydroxyapatite-coated titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, 25(8), 973-989.
- Javed, A. et al., 2001. runt homology domain transcription factors (Runx, Cbfa, and AML) mediate repression of the bone sialoprotein promoter: evidence for promoter context-dependent activity of Cbfa proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 21(8), 2891-2905.
- Jeffcoat, M.K. et al., 2003. A comparison of hydroxyapatite (HA) -coated threaded, HA-coated cylindrical, and titanium threaded endosseous dental implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 18(3), 406-410.
- Jian, H. et al., 2006. Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF-beta1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes & Development*, 20(6), 666-674.
- Jo, Y. et al., 2007. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Engineering*, 13(4), 767-773.
- Jokstad, A. et al., 2003. Quality of dental implants. *International Dental Journal*, 53(6 Suppl 2), 409-443.
- Jonas, O. & Duschl, C., 2010a. Force propagation and force generation in cells. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20607861> [Accédé Août 4, 2010].

- Jonas, O. & Duschl, C., 2010b. Force propagation and force generation in cells. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20607861> [Accédé Août 19, 2010].
- Jones et al., 1999. A 5-year comparison of hydroxyapatite-coated titanium plasma-sprayed and titanium plasma-sprayed cylinder dental implants. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 87(6), 649-652.
- Jones & Walker, 1999. Integrins: a role as cell signalling molecules. *Molecular Pathology: MP*, 52(4), 208-213.
- Jono, S., Peinado, C. & Giachelli, C.M., 2000. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 20197-20203.
- Jungner, M., Lundqvist, P. & Lundgren, S., 2005. Oxidized titanium implants (Nobel Biocare TiUnite) compared with turned titanium implants (Nobel Biocare mark III) with respect to implant failure in a group of consecutive patients treated with early functional loading and two-stage protocol. *Clinical Oral Implants Research*, 16(3), 308-312.
- Kadler, K.E., Hojima, Y. & Prockop, D.J., 1990. Collagen fibrils in vitro grow from pointed tips in the C- to N-terminal direction. *The Biochemical Journal*, 268(2), 339-343.
- Kang, S.H. et al., 2009. An investigation on electron behavior employing vertically-aligned TiO<sub>2</sub> nanotube electrodes for dye-sensitized solar cells. *Nanotechnology*, 20(35), 355307.
- Karsenty & Wagner, 2002. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental Cell*, 2(4), 389-406.
- Kassem, M., 2006. Stem cells: potential therapy for age-related diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067, 436-442.
- Katsikogianni, M.G. & Missirlis, Y.F., 2010. Interactions of bacteria with specific biomaterial surface chemistries under flow conditions. *Acta Biomaterialia*, 6(3), 1107-1118.
- Keene, D.R., Sakai, L.Y. & Burgeson, R.E., 1991. Human bone contains type III collagen, type VI collagen, and fibrillin: type III collagen is present on specific fibers that may mediate attachment of tendons, ligaments, and periosteum to calcified bone cortex. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 39(1), 59-69.
- Keller, J.C. et al., 1994. Characterizations of titanium implant surfaces. III. *Journal of Biomedical Materials Research*, 28(8), 939-946.
- Kieswetter, K. et al., 1996. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 7(4), 329-345.
- Kilian, K.A. et al., 2010. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), 4872-4877.
- Kim, Kino-oka, M. & Taya, M., 2010. Designing culture surfaces based on cell anchoring mechanisms to regulate cell morphologies and functions. *Biotechnology Advances*, 28(1), 7-16.
- Kirsch, T. et al., 1997. Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *The Journal of Cell Biology*, 137(5), 1149-1160.
- Kohavi, D. et al., 1992. Effect of titanium implants on primary mineralization following 6 and 14 days of rat tibial healing. *Biomaterials*, 13(4), 255-260.
- Komori, 2002. Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *Journal of Cellular Biochemistry*, 87(1), 1-8.
- Komori et al., 1997. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to

- maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89(5), 755-764.
- Könönen, M. et al., 1992. Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *Journal of Biomedical Materials Research*, 26(10), 1325-1341.
- Kubo, K. et al., 2009. Cellular behavior on TiO<sub>2</sub> nanonodular structures in a micro-to-nanoscale hierarchy model. *Biomaterials*, 30(29), 5319-5329.
- Kumar, C.C., 1998. Signaling by integrin receptors. *Oncogene*, 17(11 Reviews), 1365-1373.
- Kurze, P., Drysmann, W. & Knöfler, W., 1986. [Anodic oxidation using spark discharge--a new surface treatment method for medical technology]. *Stomatologie Der DDR*, 36(10), 549-554.
- Kuznetsov, S.A., Friedenstein, A.J. & Robey, P.G., 1997. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *British Journal of Haematology*, 97(3), 561-570.
- Lafrenie, R.M. & Yamada, K.M., 1996. Integrin-dependent signal transduction. *Journal of Cellular Biochemistry*, 61(4), 543-553.
- Lai, C.F. et al., 2000. Transforming growth factor-beta up-regulates the beta 5 integrin subunit expression via Sp1 and Smad signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(46), 36400-36406.
- Lalykina, K.S. et al., 1976. [Self-maintenance of induced bone tissue]. *Biulleten' Eksperimental'noĭ Biologii I Meditsiny*, 81(2), 239-242.
- Lange et al., 2002. Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. *Biomolecular Engineering*, 19(2-6), 255-261.
- Langer, R. & Vacanti, J.P., 1993. Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5110), 920-926.
- Lavenus et al., 2010. Cell interaction with nanopatterned surface of implants. *Nanomedicine (London, England)*, 5(6), 937-947.
- Lavenus, S., Louarn, G. & Layrolle, P., 2011. Nanotechnology and dental implants. Dans *Nanotechnology for dental applications*.
- Le Guéhenec, L. et al., 2007. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 23(7), 844-854.
- Le Guehenec, L., 2008. Osteoblastic cell behavior on nanostructured metal implants. *Nanomedicine (London, England)*, 3(1), 61-71.
- Le Guehenec, L., Goyenvall, E. et al., 2008. Histomorphometric analysis of the osseointegration of four different implant surfaces in the femoral epiphyses of rabbits. *Clinical Oral Implants Research*, 19(11), 1103-1110.
- Le Guehenec, L., h & h, 2008. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomaterialia*, 4(3), 535-543.
- Lee, Chang, E. & Yang, C.Y., 2004. Attachment and proliferation of neonatal rat calvarial osteoblasts on Ti6Al4V: effect of surface chemistries of the alloy. *Biomaterials*, 25(1), 23-32.
- lee, S. et al., 2009. Preparation of nano-structured titanium oxide film for biosensor substrate by wet corrosion process. *Current Applied Physics*, e266-e269.
- Leeuwenburgh, S. et al., 2001. Osteoclastic resorption of biomimetic calcium phosphate coatings in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research*, 56(2), 208-215.
- LeGeros, R.Z. & Craig, R.G., 1993. Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 8

Suppl 2, S583-596.

- LeGeros, R.Z., 2002. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (395), 81-98.
- Lepski, G. et al., 2010. Limited Ca<sup>2+</sup> and PKA-pathway dependent neurogenic differentiation of human adult mesenchymal stem cells as compared to fetal neuronal stem cells. *Experimental Cell Research*, 316(2), 216-231.
- Lindahl, G.E. et al., 2002. Activation of fibroblast procollagen alpha 1(I) transcription by mechanical strain is transforming growth factor-beta-dependent and involves increased binding of CCAAT-binding factor (CBF/NF-Y) at the proximal promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(8), 6153-6161.
- Lipski, A.M. et al., 2008. The effect of silica nanoparticle-modified surfaces on cell morphology, cytoskeletal organization and function. *Biomaterials*, 29(28), 3836-3846.
- Liu, X. et al., 1997. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), 1852-1856.
- Liu, Y., de Groot, K. & Hunziker, E.B., 2005. BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. *Bone*, 36(5), 745-757.
- Liu, Y. et al., 2007. Flk-1+ adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in mdx mice. *Stem Cells and Development*, 16(5), 695-706.
- Lopez-Heredia, M.A., Weiss, P. & Layrolle, P., 2007. An electrodeposition method of calcium phosphate coatings on titanium alloy. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 18(2), 381-390.
- Lord, M., Foss, M. & Besenbacher, F., 2010. Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response. *Nanotoday*, 66-78.
- Malaval, L. et al., 2008. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(5), 1145-1153.
- Marco, F. et al., 2005. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron (Oxford, England: 1993)*, 36(7-8), 630-644.
- Marinucci, L. et al., 2010. Effects of Hydroxyapatite and Biostite((R)) on Osteogenic Induction of hMSC. *Annals of Biomedical Engineering*, 38(3), 640-648.
- Martin et al., 1995. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *Journal of Biomedical Materials Research*, 29(3), 389-401.
- Martinek, N. et al., 2007. Is SPARC an evolutionarily conserved collagen chaperone? *Journal of Dental Research*, 86(4), 296-305.
- Massaro, C. et al., 2002. Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: chemical composition. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 13(6), 535-548.
- Matsunaga, S., Ito, H. & Sakou, T., 1999. The effect of vitamin K and D supplementation on ovariectomy-induced bone loss. *Calcified Tissue International*, 65(4), 285-289.
- Mau, J. et al., 2003. Randomized multicenter comparison of 2 IMZ and 4 TPS screw implants supporting bar-retained overdentures in 425 edentulous mandibles. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 18(6), 835-847.
- McBeath, R. et al., 2004. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Developmental Cell*, 6(4), 483-495.

- McCabe, L.R. et al., 1996. Developmental expression and activities of specific fos and jun proteins are functionally related to osteoblast maturation: role of Fra-2 and Jun D during differentiation. *Endocrinology*, 137(10), 4398-4408.
- McCracken, M., Lemons, J.E. & Zinn, K., 2001. Analysis of Ti-6Al-4V implants placed with fibroblast growth factor 1 in rat tibiae. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 16(4), 495-502.
- McGlumphy, E.A. et al., 2003. Prospective study of 429 hydroxyapatite-coated cylindrical omniloc implants placed in 121 patients. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 18(1), 82-92.
- Meerschaert, J. & Furie, M.B., 1995. The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 154(8), 4099-4112.
- Metcalf, D., 2007. Concise review: hematopoietic stem cells and tissue stem cells: current concepts and unanswered questions. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(10), 2390-2395.
- Milan, J., Planell, J.A. & Lacroix, D., 2009. Computational modelling of the mechanical environment of osteogenesis within a polylactic acid-calcium phosphate glass scaffold. *Biomaterials*, 30(25), 4219-4226.
- Miller et al., 2006. Plasma coagulation response to surfaces with nanoscale chemical heterogeneity. *Biomaterials*, 27(2), 208-215.
- Miller, D. et al., 2005. Comparison of fibroblast and vascular cell adhesion to nano structured poly(lactic co glycolic acid) films. *Applied Bionics and biochemics*, 1-7.
- Mishima, Y. & Lotz, M., 2008. Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 26(10), 1407-1412.
- Morganstein, D.L. et al., 2010. Human fetal mesenchymal stem cells differentiate into brown and white adipocytes: a role for ERRalpha in human UCP1 expression. *Cell Research*, 20(4), 434-444.
- Morris, H.F. et al., 2000. Periodontal-type measurements associated with hydroxyapatite-coated and non-HA-coated implants: uncovering to 36 months. *Annals of Periodontology / the American Academy of Periodontology*, 5(1), 56-67.
- Mosesson, M.W., 2005. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 3(8), 1894-1904.
- Moursi, A.M., Globus, R.K. & Damsky, C.H., 1997. Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro. *Journal of Cell Science*, 110 ( Pt 18), 2187-2196.
- Müeller, W. et al., 2003a. Evaluation of the interface between bone and titanium surfaces being blasted by aluminium oxide or bioceramic particles. *Clinical Oral Implants Research*, 14(3), 349-356.
- Müeller, W. et al., 2003b. Evaluation of the interface between bone and titanium surfaces being blasted by aluminium oxide or bioceramic particles. *Clinical Oral Implants Research*, 14(3), 349-356.
- Murshed, M. et al., 2005. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes & Development*, 19(9), 1093-1104.
- Murshed, M. et al., 2004. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *The Journal of Cell Biology*, 165(5), 625-630.
- Mustafa, K. et al., 2001. Determining optimal surface roughness of TiO<sub>2</sub> blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone.

- Clinical Oral Implants Research*, 12(5), 515-525.
- Nakano, Addison, W.N. & Kaartinen, M.T., 2007. ATP-mediated mineralization of MC3T3-E1 osteoblast cultures. *Bone*, 41(4), 549-561.
- Nakashima, K. et al., 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108(1), 17-29.
- Newham, P. & Humphries, M.J., 1996. Integrin adhesion receptors: structure, function and implications for biomedicine. *Molecular Medicine Today*, 2(7), 304-313.
- Novaes, A.B. et al., 2002. Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4 different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 17(3), 377-383.
- Ogawa, T., Saruwatari, L. et al., 2008. Ti nano-nodular structuring for bone integration and regeneration. *Journal of Dental Research*, 87(8), 751-756.
- Ogawa, T., Takeuchi & Ohno, N., 2008. Ti nano-nodular structuring for bone integration and regeneration. *J Dent Res*, 751-756.
- Ogura, N. et al., 2004. Differentiation of the human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and enhancement of cell attachment by fibronectin. *Journal of Oral Science*, 46(4), 207-213.
- Oh et al., 2005. Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes. *Biomaterials*, 26(24), 4938-4943.
- Oh, S. et al., 2009. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7), 2130-2135.
- Oh, W. et al., 2008. Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Cellular Immunology*, 251(2), 116-123.
- Oliva, F.Y. et al., 2003. Adsorption of human serum albumin (HSA) onto colloidal TiO<sub>2</sub> particles, Part I. *Journal of Colloid and Interface Science*, 261(2), 299-311.
- Olivares-Navarrete et al., 2010. Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage. *Biomaterials*, 31(10), 2728-2735.
- Olivares-Navarrete, R. et al., 2010. Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage. *Biomaterials*, 2728-2735.
- Owen, M., 1988. Marrow stromal stem cells. *Journal of Cell Science. Supplement*, 10, 63-76.
- Ozaki, Y. et al., 2007. Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 16(1), 119-129.
- Pacifici, 1998. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. *Endocrinology*, 139(6), 2659-2661.
- Parfitt, A.M., 2000. The mechanism of coupling: a role for the vasculature. *Bone*, 26(4), 319-323.
- Park et al., 2007. Nanosize and vitality: TiO<sub>2</sub> nanotube diameter directs cell fate. *Nano Letters*, 7(6), 1686-1691.
- Patel, K.D., Nollert, M.U. & McEver, R.P., 1995. P-selectin must extend a sufficient length from the plasma membrane to mediate rolling of neutrophils. *The Journal of Cell Biology*, 131(6 Pt 2), 1893-1902.
- Perizzolo, D., Lacefield, W.R. & Brunette, D.M., 2001. Interaction between topography and coating in the

- formation of bone nodules in culture for hydroxyapatite- and titanium-coated micromachined surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 56(4), 494-503.
- Piattelli et al., 2003. Residual aluminum oxide on the surface of titanium implants has no effect on osseointegration. *Biomaterials*, 24(22), 4081-4089.
- Piattelli et al., 1994. Histochemical and confocal laser scanning microscopy study of the bone-titanium interface: an experimental study in rabbits. *Biomaterials*, 15(3), 194-200.
- Pierres et al., 2003. Cell membrane alignment along adhesive surfaces: contribution of active and passive cell processes. *Biophysical Journal*, 84(3), 2058-2070.
- Pilliar, R.M., 2005. Cementless implant fixation--toward improved reliability. *The Orthopedic Clinics of North America*, 36(1), 113-119.
- Pittenger, M.F. et al., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), 143-147.
- Plow, E.F. et al., 2000. Ligand binding to integrins. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(29), 21785-21788.
- Poole et al., 2005. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(13), 1842-1844.
- Protivínský, J. et al., 2007. Effect of chemically modified titanium surfaces on protein adsorption and osteoblast precursor cell behavior. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 22(4), 542-550.
- Puckett, S., Pareta, R. & Webster, T.J., 2008. Nano rough micron patterned titanium for directing osteoblast morphology and adhesion. *International Journal of Nanomedicine*, 3(2), 229-241.
- Puleo, D.A. & Nanci, A., 1999. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*, 20(23-24), 2311-2321.
- R Olivares-Navarrete et al., 2008. Integrin alpha2beta1 plays a critical role in osteoblast response to micron-scale surface structure and surface energy of titanium substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(41), 15767-15772.
- Raghavendra, S., Wood, M.C. & Taylor, T.D., 2005. Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 20(3), 425-431.
- Razzouk, S. et al., 2002. Osteopontin posttranslational modifications, possibly phosphorylation, are required for in vitro bone resorption but not osteoclast adhesion. *Bone*, 30(1), 40-47.
- Richter, W., 2009. Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. *Journal of Internal Medicine*, 266(4), 390-405.
- Roach, P. et al., 2007. Modern biomaterials: a review-bulk properties and implications of surface modifications. *J Mater Sci Mater Med*, 1263-1277.
- Rocci, A., Martignoni, M. & Gottlow, J., 2003. Immediate loading of Brånemark System TiUnite and machined-surface implants in the posterior mandible: a randomized open-ended clinical trial. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 5 Suppl 1, 57-63.
- Rock, G. et al., 2006. The contribution of platelets in the production of cryoprecipitates for use in a fibrin glue. *Vox Sanguinis*, 91(3), 252-255.
- Rohanizadeh, R., Al-Sadeq, M. & Legeros, R.Z., 2004. Preparation of different forms of titanium oxide on titanium surface: effects on apatite deposition. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 71(2), 343-352.

- Rosenberg, K. et al., 1998. Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(32), 20397-20403.
- Ross, F.P. et al., 1993. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(13), 9901-9907.
- Rozé, J. et al., 2009. Correlating implant stability to bone structure. *Clinical Oral Implants Research*, 20(10), 1140-1145.
- Ruggiero, F. et al., 1994. Interactions between cells and collagen V molecules or single chains involve distinct mechanisms. *Experimental Cell Research*, 210(2), 215-223.
- Ruggiero, F. et al., 1996. Structural requirements for alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrin mediated cell adhesion to collagen V. *Journal of Cell Science*, 109 ( Pt 7), 1865-1874.
- Ruoslahti, E., 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12, 697-715.
- Sabri, S. et al., 1995. Influence of surface charges on cell adhesion: difference between static and dynamic conditions. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 73(7-8), 411-420.
- Salasznyk, R.M. et al., 2004. Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2004(1), 24-34.
- Santiago et al., 2005. Response of osteoblastic cells to titanium submitted to three different surface treatments. *Brazilian Oral Research*, 19(3), 203-208.
- Sastry, S.K. & Horwitz, A.F., 1993. Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 5(5), 819-831.
- Sautier, J.M., Nefussi, J.R. & Forest, N., 1992. Mineralization and bone formation on microcarrier beads with isolated rat calvaria cell population. *Calcified Tissue International*, 50(6), 527-532.
- Sawase, T. et al., 2008. Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. *Clinical Oral Implants Research*, 19(5), 491-496.
- Scacchi, M., Merz, B.R. & Schär, A.R., 2000. The development of the ITI DENTAL IMPLANT SYSTEM. Part 2: 1998-2000: Steps into the next millennium. *Clinical Oral Implants Research*, 11 Suppl 1, 22-32.
- Schildhauer, T. et al., 2007. Fixation of porous calcium phosphate with expanded bone marrow cells using an autologous plasma clot. *mater sci eng technol*, 1012-1014.
- Schlaepfer, D.D. & Hunter, T., 1998. Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends in Cell Biology*, 8(4), 151-157.
- Schneider, G. & Burridge, K., 1994. Formation of focal adhesions by osteoblasts adhering to different substrata. *Experimental Cell Research*, 214(1), 264-269.
- Schüpbach, P. et al., 2005. The human bone-oxidized titanium implant interface: A light microscopic, scanning electron microscopic, back-scatter scanning electron microscopic, and energy-dispersive x-ray study of clinically retrieved dental implants. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 7 Suppl 1, S36-43.
- Schwartz et al., 1991. Effect of glass ceramic and titanium implants on primary calcification during rat tibial bone healing. *Calcified Tissue International*, 49(5), 359-364.
- Schwartz & Boyan, 1994. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *Journal of Cellular Biochemistry*, 56(3), 340-347.

- Schwartz et al., 1992. In vivo regulation of matrix vesicle concentration and enzyme activity during primary bone formation. *Bone and Mineral*, 17(2), 134-138.
- Sensebé, L. et al., 2010. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sanguinis*, 98(2), 93-107.
- Shalabi, M.M., Wolke, J.G.C. & Jansen, J.A., 2006. The effects of implant surface roughness and surgical technique on implant fixation in an in vitro model. *Clinical Oral Implants Research*, 17(2), 172-178.
- Shankar, K. et al., 2007. Highly-ordered TiO<sub>2</sub> nanotube arrays up to 220µm in length: use in water photoelectrolysis and dye-sensitized solar cells.
- Shattil, S.J., Kim, C. & Ginsberg, M.H., 2010. The final steps of integrin activation: the end game. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(4), 288-300.
- Shibata, Y. et al., 2002. Glow discharge plasma treatment of titanium plates enhances adhesion of osteoblast-like cells to the plates through the integrin-mediated mechanism. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 17(6), 771-777.
- Shioi, A. et al., 2002. Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circulation Research*, 91(1), 9-16.
- Sigal, G., Mrksich, M. & Whitesides, G., 1998. Effect of surface wettability on the adsorption of proteins and detergents. , 3464-3473.
- Singh, S.P. et al., 2007. Cyclic mechanical strain increases production of regulators of bone healing in cultured murine osteoblasts. *Journal of the American College of Surgeons*, 204(3), 426-434.
- Son, W. et al., 2003. In vivo histological response to anodized and anodized/hydrothermally treated titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 66(2), 520-525.
- Sousa, Moradas-Ferreira, P. & Barbosa, M.A., 2005. TiO<sub>2</sub> type influences fibronectin adsorption. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 16(12), 1173-1178.
- Stein, G.S. & Lian, J.B., 1993. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine Reviews*, 14(4), 424-442.
- Steinemann, S.G., 1998. Titanium--the material of choice? *Periodontology 2000*, 17, 7-21.
- Steitz, S.A. et al., 2002. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *The American Journal of Pathology*, 161(6), 2035-2046.
- Stenfelt, S. & Goode, R.L., 2005. Bone-conducted sound: physiological and clinical aspects. *Otology & Neurotology: Official Publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 26(6), 1245-1261.
- Stevens, M.M. & George, J.H., 2005. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5751), 1135-1138.
- Streicher, R.M., Schmidt, M. & Fiorito, S., 2007. Nanosurfaces and nanostructures for artificial orthopedic implants. *Nanomedicine (London, England)*, 2(6), 861-874.
- Suh, J. et al., 2003. Effect of hydrothermally treated anodic oxide films on osteoblast attachment and proliferation. *Biomaterials*, 24(2), 347-355.
- Sul, 2010. Electrochemical growth behavior, surface properties, and enhanced in vivo bone response of TiO<sub>2</sub> nanotubes on microstructured surfaces of blasted, screw-shaped titanium implants. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 87-100.
- Sul, 2002a. Oxidized titanium screws coated with calcium ions and their performance in rabbit bone. *The*

- International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 17(5), 625-634.
- Sul, 2002b. Resonance frequency and removal torque analysis of implants with turned and anodized surface oxides. *Clinical Oral Implants Research*, 13(3), 252-259.
- Sul et al., 2005. Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 20(3), 349-359.
- Sul et al., 2002. Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodised implants. *Biomaterials*, 23(8), 1809-1817.
- Sul, Y.T. et al., 2001. Oxidized implants and their influence on the bone response. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 12(10-12), 1025-1031.
- Swaminathan, R., 2001. Biochemical markers of bone turnover. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 313(1-2), 95-105.
- Swart, K.M. et al., 1992. Short-term plasma-cleaning treatments enhance in vitro osteoblast attachment to titanium. *The Journal of Oral Implantology*, 18(2), 130-137.
- Takada, Y., Ye, X. & Simon, S., 2007. The integrins. *Genome Biology*, 8(5), 215.
- Takagi, J., 2004. Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins. *Biochemical Society Transactions*, 32(Pt3), 403-406.
- Tanaka, Y. et al., 1995. Osteoblasts are regulated by the cellular adhesion through ICAM-1 and VCAM-1. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 10(10), 1462-1469.
- Tinsley, D., Watson, C.J. & Russell, J.L., 2001. A comparison of hydroxylapatite coated implant retained fixed and removable mandibular prostheses over 4 to 6 years. *Clinical Oral Implants Research*, 12(2), 159-166.
- Turner, C.H. & Pavalko, F.M., 1998. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *Journal of Orthopaedic Science: Official Journal of the Japanese Orthopaedic Association*, 3(6), 346-355.
- Udagawa, N. et al., 1990. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(18), 7260-7264.
- Vetrone, F. et al., 2009. Nanoscale oxidative patterning of metallic surfaces to modulate cell activity and fate. *Nano Letters*, 9(2), 659-665.
- Vogel, J.P. et al., 2006. Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. *Platelets*, 17(7), 462-469.
- Vogler et al., 1995. Contact activation of the plasma coagulation cascade. I. Procoagulant surface chemistry and energy. *Journal of Biomedical Materials Research*, 29(8), 1005-1016.
- Wagner, E.F., 2002. Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61 Suppl 2, ii40-42.
- Wang & El-Deiry, 2003. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene*, 22(53), 8628-8633.
- Wang et al., 2005. Quantitation of osteoblast-like cell mineralization on tissue culture polystyrene and Ti-6Al-

- 4V alloy disks by Tc-99m-MDP labeling and imaging in vitro. *Bone*, 36(1), 84-92.
- Wang, L. et al., 2006. Integrin beta1 silencing in osteoblasts alters substrate-dependent responses to 1,25-dihydroxy vitamin D3. *Biomaterials*, 27(20), 3716-3725.
- Watson, P.A., 1991. Function follows form: generation of intracellular signals by cell deformation. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 5(7), 2013-2019.
- Webster et al., 2000. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(3), 475-483.
- Weibrich, G. et al., 2004. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*, 34(4), 665-671.
- Wennerberg et al., 1995. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clinical Oral Implants Research*, 6(1), 24-30.
- Wennerberg et al., 1998. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clinical Oral Implants Research*, 9(1), 11-19.
- Wheeler, S.L., 1996. Eight-year clinical retrospective study of titanium plasma-sprayed and hydroxyapatite-coated cylinder implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 11(3), 340-350.
- Wickham, M.Q. et al., 2003. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (412), 196-212.
- von Wilmsky, C. et al., 2009. In vivo evaluation of anodic TiO<sub>2</sub> nanotubes: an experimental study in the pig. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 89(1), 165-171.
- Wong, C. et al., 2003. Fibrin-based biomaterials to deliver human growth factors. *Thrombosis and Haemostasis*, 89(3), 573-582.
- Woo, K., Chen, V. & Ma, P., 2003. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *J Biomed Mater Res A*, 531-537.
- Wu et al., 2003. Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro. *Endocrinology*, 144(12), 5545-5555.
- Xavier, S.P. et al., 2003. Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. *Journal of Dentistry*, 31(3), 173-180.
- Xiropaidis, A.V. et al., 2005. Bone-implant contact at calcium phosphate-coated and porous titanium oxide (TiUnite)-modified oral implants. *Clinical Oral Implants Research*, 16(5), 532-539.
- Yajima, T., Kumegawa, M. & Hiramatsu, M., 1984. Ectopic mineralization in Fibroblast cultures. *Arch. histol. jap.*, 43-55.
- Yang, Y. et al., 2002. Morphological behavior of osteoblast-like cells on surface-modified titanium in vitro. *Biomaterials*, 23(5), 1383-1389.
- Yao, C., Slamovich, E.B. & Webster, T.J., 2008. Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 85(1), 157-166.
- Yoshida, C.A. et al., 2002. Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nature Genetics*, 32(4), 633-638.
- Yoshida, C.A. & Komori, T., 2005. Role of Runx proteins in chondrogenesis. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 15(3), 243-254.
- Zaidel-Bar, R. et al., 2003. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of

- migrating cells. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 22), 4605-4613.
- Zannettino, A.C.W. et al., 2008. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *Journal of Cellular Physiology*, 214(2), 413-421.
- Zhang, L. & Han, Y., 2010. Effect of nanostructured titanium on anodization growth of self-organized TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Nanotechnology*, 21(5), 55602.
- Zhao et al., 2007. Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. *Biomaterials*, 28(18), 2821-2829.
- Zhao et al., 2005. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 74(1), 49-58.
- Zhou, Dziak, E. & Opas, M., 1993. Adhesiveness and proliferation of epithelial cells are differentially modulated by activation and inhibition of protein kinase C in a substratum-dependent manner. *Journal of Cellular Physiology*, 155(1), 14-26.
- Zhu et al., 2004. Cellular reactions of osteoblasts to micron- and submicron-scale porous structures of titanium surfaces. *Cells, Tissues, Organs*, 178(1), 13-22.
- Zhu, B. et al., 2004. Nanotopographical guidance of C6 glioma cell alignment and oriented growth. *Biomaterials*, 25(18), 4215-4223.
- Zimmermann, R. et al., 2005. Electrokinetic characterization of poly(acrylic acid) and poly(ethylene oxide) brushes in aqueous electrolyte solutions. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 21(11), 5108-5114.
- Zinger, O. et al., 2005. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials*, 26(14), 1837-1847.
- Zuk, P.A. et al., 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279-4295.

## RESUME et MOTS CLES

### RESUME :

Les implants métalliques permettent des réhabilitations prothétiques présentant de fort taux de succès cliniques grâce leurs propriétés de surface. Différentes études ont montré que les propriétés de surfaces telles que la rugosité et la composition chimique modulent l'adhésion et la différenciation cellulaire et par conséquent, l'ostéointégration des implants. L'étude des interactions entre les cellules et les surfaces implantaires est essentielle pour la compréhension de leur intégration tissulaire. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été l'étude de l'adhésion et la différenciation de cellules souches mésenchymateuse (CSM) sur des surfaces en titane nanostructurées mimant la chimie de l'implant. Dans un premier temps, nous avons étudié l'adhésion et la différenciation des CSM sur des substrats ayant une composition différente et une rugosité similaire. Puis, des surfaces de titane nanostructurées ont été réalisées et caractérisées. Une évaporation de titane a été réalisée sur des membranes de polycarbonate percées par des pores de 50, 200 ou 400 nm de diamètre. Une méthode d'anodisation a permis d'obtenir une surface en nid d'abeille avec des pores de 30, 50 et 100 nm de diamètre. La dernière étape de ce travail a consisté à étudier les interactions entre CSM et surfaces nanostructurées. L'adhésion et la différenciation ostéoblastique ont été étudiées par immunomarquage, analyse d'image et PCR arrays suivit de Q-PCR. Enfin, l'histomorphométrie après 1 et 3 semaine d'implantation de fil de titane anodisé dans des tibias de rats a permis de caractériser l'ostéointégration des implants et une corrélation avec les résultats obtenu *in vitro*. La caractérisation des propriétés de surfaces et l'étude biologique des différents types cellulaires sur ces surfaces permettront de mieux appréhender le comportement cellulaire et ces conséquences dans l'ostéointégration des implants en titane.

### MOTS CLES :

Cellules souches mésenchymateuses, nanostructure, adhésion, différenciation ostéoblastique, ostéointégration

### SUMMARY:

Metal implants allow nowadays prosthetic rehabilitations with high clinical success due to their surface properties. Some studies have shown that surface properties such as roughness, wettability and chemistry changed the adhesion and differentiation of cells, and thereby, the integration of implant in tissues. Understanding of the interactions between cells and implant surfaces is essential in the field of tissue engineering and biomaterials. Attachment, adhesion and spreading of cells establish the first step of interaction between cells and surfaces and, so the quality of this step determined the cell capacity to proliferate and differentiate on implant surface. In this context, the aim of this study was to study the adhesion and differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSC) on nanostructured surface. In the first part, the adhesion, proliferation and differentiation of hMSC, osteoblasts and gingival fibroblasts were compared on substrates with similar surface roughness and wettability, but different chemistries. Secondly, nanostructured titanium surface were realized and characterized. Titanium vapor deposition was performed on polycarbonate membranes with pores of 50, 200 or 400 nm of diameter. Anodisation also allowed obtaining a regular surface with pores of 30, 50 and 100 nm of diameter. In the last part of this work, the adhesion and osteoblastic differentiation of hMSC were studied on these nanostructured surfaces. Cell adhesion and differentiation have been investigated using staining, immunostaining, image analysis and gene expression. Finally, histomorphometric analysis of anodized implant after 1 and 3 weeks of implantation in rat tibia allowed the characterization of osteointegration. The characterization of surface properties and biological study of different cell type on nanostructured surface was necessary to understand the behaviour of cells and so, the consequence for the osteointegration.

### KEYS WORDS:

Mesenchymal stem cells, nanostructuring, adhesion, osteoblastic differentiation, osseointegration