



Influence de la nanostructuration énergétique des substrats dans l'adhésion et la différenciation des cellules neuronales modèles PC12

Guillaume Lamour

► To cite this version:

Guillaume Lamour. Influence de la nanostructuration énergétique des substrats dans l'adhésion et la différenciation des cellules neuronales modèles PC12. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2010. Français. <tel-00523656>

HAL Id: tel-00523656

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00523656>

Submitted on 5 Oct 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT (PARIS VII)

ÉCOLE DOCTORALE : Interdisciplinaire pour le Vivant (*iViv*)

DOCTORAT

Biophysique Moléculaire et Cellulaire

Guillaume LAMOUR

INFLUENCE DE LA NANOSTRUCTURATION ÉNERGÉTIQUE DES
SUBSTRATS DANS L'ADHESION ET LA DIFFÉRENCIATION DES
CELLULES NEURONALES MODÈLES PC12

Thèse dirigée par Ahmed HAMRAOUI

Soutenue le 24 juin 2010

JURY

M. Jean-François JOANNY	Président
M. Pierre BONGRAND	Rapporteur
M. Hamidou HAIDARA	Rapporteur
M. Eric BORGUET	Examineur
M. Pierre NASSOY	Examineur
M ^{lle} Sylvie SOUÈS	Examineur
M. Ahmed HAMRAOUI	Directeur de thèse

à ma mère,

à mon père,

à mes sœurs,

à tous les musiciens,

à tous les footballeurs,

à tous mes potes,

à Jeannot le promeneur,

“Who would you have liked to be?”

“A scientist.”

Frank ZAPPA, 1988

Remerciements

Je voudrais avant tout remercier M. Gérard LOUIS de m'avoir accueilli au laboratoire de Neuro-Physique Cellulaire de l'université Paris Descartes (UFR Biomédicale, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris). Je le remercie aussi pour son implication dans l'obtention du financement qui m'a permis d'effectuer ce travail de thèse. Je remercie l'université Paris Diderot qui m'a alloué ce financement, et à travers elle, le ministère de l'Enseignement et de la Recherche.

Je remercie MM. BONGRAND et HAIDARA pour avoir rapporté le manuscrit de cette thèse et pour leurs conseils qui m'ont permis de l'améliorer, ainsi que MM. JOANNY, BORGUET, NASSOY et M^{lle} SOUÈS pour avoir accepté de juger mon travail. Je leur suis à tous reconnaissant.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et ma sincère amitié envers Ahmed HAMRAOUI. Je le remercie pour son encadrement durant ces trois années, pour ses conseils, pour son soutien continu et sa bonne humeur perpétuelle. Ce fut un réel plaisir de l'avoir pour directeur de thèse (sans compter sa machine à café!). Je le remercie de m'avoir initié au travail de recherche scientifique, et de m'avoir inculqué l'état d'esprit et les méthodes requises pour progresser dans ce domaine. Je tiens également à le remercier de la grande liberté qu'il m'a accordée quant à la conduite de mes travaux. Ses avis et suggestions éclairés concernant les orientations que j'ai choisies de suivre m'ont guidé de la façon la plus efficace qui soit. Ses critiques pertinentes sur la qualité des résultats obtenus et les discussions sans fin que nous avons menées à leur propos m'ont permis d'avancer à la fois tête baissée et yeux grands ouverts. En deux mots : mille mercis.

Merci en particulier à Sylvie SOUÈS pour son aide et ses conseils, sa relecture impitoyable des articles, et la disponibilité dont elle a fait preuve à mon égard. Je lui dois une grande partie des connaissances que j'ai acquises en biologie cellulaire. En la matière, mes pensées vont également à Nathalie JOURNIAC, dont l'expérience des immunomarquages me fut plus que précieuse.

Un grand merci à Eric BORGUET, qui m'a accueilli dans son groupe de recherche de l'université Temple de Philadelphie. J'y ai eu la chance d'effectuer un stage très enrichissant, scientifiquement et humainement. Ce stage fut le point de départ d'une collaboration fructueuse, et l'occasion pour moi d'envisager mon travail de thèse sous un angle différent. Je lui adresse donc mes plus sincères remerciements, ainsi qu'à tous ses étudiants avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Merci en particulier à Ali EFTEKHARI-BAFROEI, pour m'avoir initié aux subtilités de l'optique non-linéaire. Merci à Andrii BUVAILO pour son travail sur l'appareil de mesure d'angles de contact.

Je remercie Pierre NASSOY pour son accueil à l'institut Curie (PCC Curie, CNRS-UMR168) et son assistance au microscope à contraste interférentiel. Mes remerciements vont également à Bernard LE BONNIEC, pour son accueil au laboratoire de Relation Structure/Fonction des Protéines de la Coagulation (Inserm-U765, Paris Descartes), et pour m'avoir enseigné les rudiments des techniques de concentration des protéines. Merci à Bernard KRUST, du laboratoire Régulation de la Transcription et Maladies Génétiques (CNRS-FRE3235, Paris Descartes) pour son aide et ses conseils avisés en matière de manipulation ELISA.

Merci à Nathalie BARDOU, Émilie COLLART et Stéphane COLLIN, du laboratoire de Photonique et de Nanostructures (LPN, CNRS-UPR20, Marcoussis), avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer. Merci à Rodolphe ALVES DE SOUSA pour son accueil au laboratoire de Chimie et de Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques (CNRS-UMR8601, Paris Descartes) et son assistance sur le spectromètre infrarouge. Je remercie Philippe DJIAN (IFR 95, Paris Descartes) de m'avoir permis d'utiliser les équipements de son laboratoire en matière de culture cellulaire et de microscopie de fluorescence. J'adresse mes plus sincères remerciements à Zeyni MANSUROGLU et à Fabrice DAUBIGNEY, pour leur assistance en salle de culture (entre autres), ainsi qu'à Sylvain GABRIELE, pour ses commentaires judicieux au sujet d'un article dont je lui ai soumis le manuscrit.

Mes années de doctorat au laboratoire de Neuro-Physique Cellulaire se sont déroulées dans un environnement très amical, et je voudrais donc adresser un grand merci collectif à toutes et à tous. Mes remerciements s'adressent plus particulièrement à Christophe TOURAIN, dont l'assistance technique me fut fort utile, spécialement en matière de microscopie à force atomique. Merci à Roger GUILLET, pour sa réactivité à gérer les problèmes de nature informatique (en général générés par un système d'exploitation dont le nom comporte des carreaux), et à Pierre BERTHOLOM, pour son expertise en mécanique de précision. Merci également à Patrice JEGOZO pour tous les équipements réalisés sur les microscopes. Merci aux stagiaires avec qui j'ai eu l'occasion de travailler : Magalie BOUCAUD, Patricia DUCLOS et Alexandre TEIXEIRA.

Je remercie Marie-Claude FAURÉ pour l'extraordinaire qualité de ses corrigés des travaux dirigés de physique (PCEM), et Stéphanie MOREAU pour son efficacité durant les heures passées ensemble à corriger d'innombrables copies d'examen. Merci à Jean-Michel VESDUN pour son assistance administrative, et pour tous les moments de détente passés en sa compagnie et celle de Lincoln TRAVENS à discuter de tout et de rien. Je remercie Fatima HÉNICHE, Laurent ARNAUD, Amel SÉDIKI et Malika LOUNACI dont j'ai eu la joie de partager le bureau et les éclats de rire. Mes remerciements particuliers à Amel et Malika pour avoir supporté ma tendance récurrente à ouvrir les fenêtres, notamment suite aux explosions provoquées dans la salle de chimie.

Ce travail de thèse n'aurait pu avoir lieu si je n'avais développé une affection particulière pour les questions d'ordre biologique. Ce goût provient en partie de l'excellence des cours qui me furent dispensés au lycée par M. et M^{me} HÉLION. Je tiens donc à les remercier chaleureusement. Merci à Sophie CRIBIER (CNRS-UMR7203, laboratoire des Biomolécules) pour ses encouragements dispensés à l'époque du Master.

Enfin, merci à tous les écrivains de science-fiction qui par leur inspiration, ont stimulé mon imagination et mon intérêt pour les sciences en général, et pour les neurosciences en particulier. Merci aux concepteurs et aux développeurs du logiciel L^AT_EX, grâce auquel le manuscrit a été rédigé et mis en forme. Merci à tous ses contributeurs anonymes, qui au détour d'une ligne de code trouvée sur internet, m'ont permis de rendre ce document plus agréable à lire.

INFLUENCE DE LA NANOSTRUCTURATION ÉNERGÉTIQUE DES
SUBSTRATS DANS L'ADHÉSION ET LA DIFFÉRENCIATION DES
CELLULES NEURONALES MODÈLES PC12

INFLUENCE OF SUBSTRATUM ENERGETIC
NANOSTRUCTURATION ON NEURONAL-MODEL PC12-CELL
ADHESION AND DIFFERENTIATION

Sommaire

Résumé	12
Table des matières	15
Introduction générale	25
I Surfaces : ordre et distribution d'énergie	29
1 Introduction aux surfaces : adhésion, forces, et surfaces auto-assemblées	31
2 Surfaces de verre : techniques expérimentales de modification	43
3 Matériels et méthodes d'analyses des substrats	53
4 Analyse des surfaces dotées de terminaisons méthyle (CH_3)	67
5 Analyse des surfaces dotées de terminaisons amine (NH_2 ou NH_3^+)	89
II Neurones : culture sur surfaces modifiées	109
6 Introduction aux propriétés des cellules neuronales	111
7 Cellules PC12 : manipulation, imagerie, et méthodes d'analyses quantitatives	123
8 Influence de la distribution des énergies de surface sur la neuritogénèse	137
9 Impact des hétérogénéités chimiques à l'échelle nanométrique	149
10 Expériences additionnelles	167
Conclusion générale	181
III Annexes	185
A Détection de micro-aspérités en surface des lamelles de verre	187
B Complément d'analyse AFM, cf. section 10.1	189
C Reproduction de l'article publié dans <i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i>	191
D Reproduction de l'article publié dans <i>Biomaterials</i>	203
E Article en cours de publication dans la revue <i>Journal of Chemical Education</i>	215
Bibliographie	221
Glossaire	233
Index	235

Résumé

Les paramètres de surface contrôlent les fonctions des cellules, en coopération avec leurs codes génétiques. Des études récentes soulignent l'impact combiné des signaux chimiques, topographiques et mécaniques des substrats d'adhésion sur les processus de différenciation. Cette étude se focalise sur le paramètre énergétique, et plus spécialement, sur l'influence exercée par la distribution spatiale des énergies de surface sur la différenciation des cellules neuronales. Le modèle étudié est constitué par les cellules de la lignée PC12, capables de se différencier en neurones suite au traitement par le facteur de croissance nerveux (NGF). Les cellules sont cultivées sur des surfaces de verre modifiées par auto-assemblage de monocouches d'alkylsiloxanes ou de biopolymères. La modification de la nature chimique et du degré d'organisation des monocouches module la distribution des composantes dispersives et polaires de l'énergie de surface, à une échelle inférieure au micron. Sur des substrats très homogènes (dotés de terminaisons CH_3 , NH_2 , ou OH), l'adhésion des cellules PC12 est modulée par le degré d'affinité chimique, et peu de cellules initient des neurites. Inversement, sur des substrats localement très hétérogènes, les cellules adhèrent quel que soit le couple chimique produisant les hétérogénéités (NH_2/OH ou CH_3/OH), et elles génèrent un nombre important de neurites en moins de 48 h, sans traitement au NGF. Ce travail démontre que les hétérogénéités chimiques de surface exercent une influence critique sur les processus de régénérescence des cellules nerveuses, en induisant des gradients dans les énergies d'adhésion aux échelles nanométriques.

Mots-clés

Adhésion cellulaire ; Adhésion cellule-substrat ; Alkylsiloxane ; Angle de contact ; Cellules PC12 ; Chimie de surface ; Croissance axonale ; Croissance neuritique ; Cytosquelette ; Différenciation neuronale ; Énergie de surface ; Étalement cellulaire ; Facteur de croissance nerveux ; Génération de somme de fréquences ; Goutte ; Greffage de surface ; Ingénierie chimique ; Ingénierie des tissus nerveux ; Interface liquide-solide ; Microscopie à force atomique ; Microscopie à contraste interférentiel ; Modification de surface ; Monocouches auto-assemblées ; Neuritogénèse ; Neurobiologie cellulaire ; Neurobiologie moléculaire ; Phéochromocytome ; Régénération nerveuse ; Régénérescence axonale ; Silane ; Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ; Surfaces et interfaces ; Verre.

Abstract

Significant advances have been made in understanding surface adhesion parameters. Several studies recently demonstrated the combined impact of chemical, spatial and mechanical cues of cell culture substrates in controlling cell functions, together with the genetic program of the cell. This study focus on the substratum physical cue that is surface energy, and in particular, on the influence of surface-energy spatial distribution on neuronal cell differentiation. The cell model under consideration is constituted by clonal-line PC12 pheochromocytoma-cells. PC12 cells have the ability to undergo terminal neuronal differentiation, typically when treated with nerve growth factor (NGF). In this study, PC12 cells were seeded on glass surfaces modified by the self-assembly of alkylsiloxanes or of biopolymers such as poly-L-lysine. By changing the structure, ordering and chemical nature of the self-assembled monolayers, the spatial distribution of surface-energy polar and dispersive components is altered. When seeded on well-ordered homogeneous substrates (with CH₃, NH₂, or OH terminal groups), PC12 cell adhesion is driven by chemical affinity, and only a few cells initiate neurites. Conversely, PC12 cell adhesion is guaranteed when seeded on highly disordered substrates, whatever couple of chemical groups (CH₃/OH or NH₂/OH) generates the surface heterogeneities. In addition, high levels of PC12 cell neuritogenesis are observed by less than 48 h of culture, and without NGF treatment. This work demonstrates that surface chemical heterogeneities, that generate nanoscale surface-energy gradients, are critical to biological processes such as nerve regeneration on biomaterials.

Keywords

AFM; Alkylsiloxane; Atomic force microscopy; Axonal growth; Cell adhesion; Cell-to-substratum adhesion; Cell spreading; Cellular neurobiology; Chemical engineering; Contact angle; Culture; Cytoskeleton; Drop; Fourier-transform infrared spectroscopy; FTIR; Glass; Liquid-solid interface; Molecular neurobiology; Nerve growth-factor; Nerve regeneration; Nerve tissue engineering; Neurite outgrowth; Neuritogenesis; Neuronal differentiation; PC12 cells; Pheochromocytoma cells; Reflexion interference contrast microscopy; SAMs; Self-assembled monolayers; SFG; Silane; Sum-frequency generation; Surface chemistry; Surface energy; Surface grafting; Surface modification; Surface science.

Table des matières

Résumé	12
Table des matières	15
Introduction générale	25
I Surfaces : ordre et distribution d'énergie	29
1 Introduction aux surfaces : adhésion, forces, et surfaces auto-assemblées	31
1.1 Énergie de surface	31
1.1.1 Origine physique	31
1.1.2 Travail de surface	32
1.2 Nature des interactions moléculaires engendrées	32
1.2.1 Interactions non-spécifiques	32
1.2.2 Interactions spécifiques	36
1.3 Formation des monocouches d'alkylsiloxanes auto-assemblées sur du verre.	37
1.3.1 Réaction de silylation en phase liquide	37
1.3.2 Influence des terminaisons Y et des groupes hydrolysables X liés au silicium	38
2 Surfaces de verre : techniques expérimentales de modification	43
2.1 Molécules utilisées pour modifier les surfaces de verre	43
2.1.1 Molécules à terminaison méthyle (CH_3)	43
2.1.2 Molécules à terminaison amine (NH_2)	44
2.1.3 Récapitulatif des molécules utilisées	46
2.2 Protocoles de préparation des substrats	46
2.2.1 Supports matériels destinés à la modification	46
2.2.2 Activation des surfaces	48
2.3 Organisation chimique attendue à l'échelle submicrométrique	50
2.3.1 Monocouches de classe 1	50
2.3.2 Monocouches de classe 2	50
2.3.3 Monocouches de classe 3	52
2.3.4 Conclusions	52
3 Matériels et méthodes d'analyses des substrats	53
3.1 Spectroscopies optiques	53
3.1.1 Optique linéaire : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	53
3.1.2 Optique non-linéaire : génération de somme de fréquences (SFG)	54
3.2 Expériences de mouillage	56
3.2.1 Rappels théoriques	56
3.2.2 Mesures d'angles de contact	57
3.2.3 Détermination des énergies de surface	61
3.3 Microscopie à force atomique (AFM)	64
3.3.1 Principe	64
3.3.2 Utilisation	64
3.3.3 Conclusions	65

4	Analyse des surfaces dotées de terminaisons méthyle (CH_3)	67
4.1	Analyse quantitative du matériel adsorbé sur le verre	67
4.1.1	Degré d'hydrophobicité en fonction de la quantité de matériel adsorbé	67
4.1.2	Sensibilité du greffage aux conditions d'adsorption en solution	68
4.1.3	Analyse comparative des spectres infrarouges des différents substrats	71
4.2	Analyse qualitative de l'organisation des groupes CH exposés en surface	72
4.2.1	Première série de manipulations	72
4.2.2	Deuxième série de manipulations	78
4.3	Détermination des énergies libres des surfaces	81
4.3.1	Composantes polaire (γ_s^p) et dispersive (γ_s^d) de l'énergie de surface du solide (γ_s , avec $\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$)	83
4.3.2	Énergie critique de surface (γ_c)	85
4.3.3	Contrôle de l'état de surface par la mesure de θ_{AR}	86
4.3.4	Conclusions	88
5	Analyse des surfaces dotées de terminaisons amine (NH_2 ou NH_3^+)	89
5.1	Surfaces de verre modifiées par chimisorption d'aminosilanes	89
5.1.1	Nanostructures potentielles des surfaces aminosilanisées	89
5.1.2	Analyse croisée des tensions critiques (γ_c), dispersives (γ_s^d) et polaires (γ_s^p)	93
5.2	Étude comparée des substrats eda (temps de greffage : ~ 24 h) et eda' (~ 16 h)	100
5.2.1	Mouillabilité des substrats eda et eda'	100
5.2.2	Rugosité et topographie des substrats eda et eda'	101
5.3	Propriétés des surfaces modifiées par la poly-L-lysine	104
5.3.1	Poly-L-lysine physisorbée sur une lamelle de verre	104
5.3.2	Poly-L-lysine physisorbée sur du polystyrène	107
5.3.3	Conclusions	107
II	Neurones : culture sur surfaces modifiées	109
6	Introduction aux propriétés des cellules neuronales	111
6.1	Spécificités des cellules PC12 en tant que modèle de cellule neuronale	112
6.1.1	Généralités	112
6.1.2	Sensibilité au facteur de croissance nerveux (NGF)	113
6.2	Dynamique des structures du cytosquelette des cellules neuronales	114
6.2.1	Microfilaments d'actine	114
6.2.2	Microtubules	115
6.2.3	Protéines associées aux microtubules	116
6.3	Cône de croissance : « tête chercheuse » ou « cerveau » des neurites	117
6.3.1	Structure et protéines associées aux filaments d'actine	117
6.3.2	Mécanisme d'avancée de la neurite sur un substrat <i>via</i> le cône de croissance	120
7	Cellules PC12 : manipulation, imagerie, et méthodes d'analyses quantitatives	123
7.1	Culture cellulaire	123
7.1.1	Entretien des cellules et culture de routine	123
7.1.2	Culture sur lamelles de verre modifiées	124
7.2	Imagerie des cellules	128
7.2.1	Contraste de phase et interférométrie	128
7.2.2	Microscopie à force atomique (AFM)	130
7.2.3	Immunofluorescence	133
7.3	Analyses quantitatives	134
7.3.1	Quantification de la croissance axonale	134
7.3.2	Comptage des filopodes et des lamellipodes	135
7.3.3	Conclusions	136

8	Influence de la distribution des énergies de surface sur la neuritogénèse	137
8.1	Prolifération <i>vs.</i> neuritogénèse	137
8.1.1	Cellules sur substrats de classe 1 ou 3 en présence ou en l'absence de NGF	137
8.1.2	Influence physique ou influence chimique ?	139
8.2	Caractérisation de l'état de différenciation	141
8.2.1	Estimation des niveaux d'expression de MAP1B	141
8.2.2	Localisation de Tau au sein des cellules différenciées	143
8.3	Structure des interfaces cellule-substrat	143
8.3.1	Forces d'adhésion	143
8.3.2	Adsorption protéique sur les surfaces modifiées	146
8.3.3	Conclusions	148
9	Impact des hétérogénéités chimiques à l'échelle nanométrique	149
9.1	Culture sur surfaces à terminaison CH ₃	149
9.1.1	Observation des cellules et quantification de la croissance axonale	149
9.1.2	Identification du paramètre critique	151
9.1.3	Corrélations entre adhésion et différenciation	152
9.2	Culture sur surfaces à terminaison NH ₂	154
9.2.1	Observation et quantification de la croissance axonale suivant les surfaces .	154
9.2.2	Cinétique de la croissance axonale sur eda	157
9.3	Discussion sur le rôle éventuel des filopodes dans la détection des gradients locaux	161
9.3.1	Dimension des filopodes	161
9.3.2	Adhésion et mobilité des filopodes	163
9.3.3	Conclusions	164
10	Expériences additionnelles	167
10.1	Déstabilisation du cytosquelette d'actine par traitement à la cytochalasine-B . . .	167
10.1.1	Effets sur la cinétique de croissance axonale	168
10.1.2	Stabilité des filaments d'actine suivant la concentration en cytochalasine . .	168
10.2	Culture des cellules PC12 1.1 dans un milieu déprivé en sérum	171
10.2.1	Culture sur collagène de type I	173
10.2.2	Culture sur verre/PLL et sur verre/PLO	174
10.3	Culture sur nanoplots d'or sur du verre et sur de l'or pur	175
10.3.1	Dimensions des nanoplots et conditions expérimentales de culture	175
10.3.2	Observation des cellules	176
10.3.3	Conclusions	179
	Conclusion générale	181
III	Annexes	185
A	Détection de micro-aspérités en surface des lamelles de verre	187
B	Complément d'analyse AFM, cf. section 10.1	189
C	Reproduction de l'article publié dans <i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i>	191
D	Reproduction de l'article publié dans <i>Biomaterials</i>	203
E	Article en cours de publication dans la revue <i>Journal of Chemical Education</i>	215
	Bibliographie	221
	Glossaire	233
	Index	235

Liste des figures

0.1	Schématisation de la régénérescence axonale dans le système nerveux périphérique	26
0.2	Schématisation de la tentative de régénérescence axonale et de la formation de cicatrice gliale dans le système nerveux central	27
0.3	Schémas récapitulant les paramètres qui contrôlent la fonction des cellules	28
1.1	Illustration du déficit énergétique que subit une molécule située à une interface	31
1.2	Schéma de formation d'une liaison spécifique anticorps-antigène	36
1.3	Schéma d'un alkylsilane, précurseur du siloxane chimisorbé	38
1.4	Propagation par « cross-linking » des monomères hydrolysés à la surface du verre	39
1.5	Propagation du recouvrement de la surface de verre par greffage d'OTS	39
1.6	Mécanisme d'adsorption de monomères préalablement condensés	40
1.7	Mécanisme d'adsorption sur du verre d'un triméthoxysilane par autocatalyse	40
1.8	Détail des mécanismes de la réaction d'hydrolyse-condensation entre monomères de triméthoxysilanes	41
2.1	Schémas représentant les différents alkylsilanes à terminaison méthyle	44
2.2	Schémas représentant les différents alkylsilanes à terminaison amine	45
2.3	Schémas représentant la poly-L-lysine (PLL) et la poly-L-ornithine (PLO)	45
2.4	Schématisation de la poly-L-lysine physisorbée sur une surface de silice	46
2.5	Illustrations schématiques décrivant les trois classes de substrats générés pour la culture cellulaire	51
3.1	Principe de la spectroscopie SFG (Génération de Somme de Fréquences)	54
3.2	Illustration des modes de vibration actifs et non-actifs en SFG	55
3.3	Comparatif des spectres IRTF et SFG obtenus pour le même substrat d'ots	55
3.4	Polarisations et vecteur d'onde d'une onde incidente i sur une surface	56
3.5	Illustration de la relation entre l'angle de contact θ et les tensions interfaciales solide-liquide (γ_{SL}), solide-vapeur (γ_{SV}) et liquide-vapeur (γ_{LV})	57
3.6	Photo et schéma du dispositif expérimental utilisé pour mesurer les angles de contact	58
3.7	Angles de contact θ de différents liquides tests en contact avec le substrat ots	59
3.8	Mesure des angles statiques d'équilibre, d'avancée et de recul de l'eau sur le substrat <i>adms</i>	61
3.9	Exemple de Zisman plot pour le substrat ots, permettant la détermination de son énergie critique de surface	63
3.10	Schéma du principe de fonctionnement du microscope à force atomique (AFM)	65
4.1	Spectres infrarouge des substrats composés d'ODMS et d'ODS	68
4.2	Influence de l'agitation de la solution de greffage sur la rugosité des substrats	69
4.3	Tentative de nettoyage du matériel parasite physisorbé sur les surfaces	69
4.4	Spectres infrarouges des substrats élaborés à partir d'OTS et d'OTMS	70
4.5	Analyse comparative des spectres infrarouges dans la région des vibrations d'élongation des groupes CH	71
4.6	Spectres SFG des substrats élaborés par greffage d'OTMS	73
4.7	Spectres utilisés pour calibrer et normaliser les spectres SFG des substrats	75
4.8	Spectres SFG bruts et normalisés des substrats htms _H et odms	76

4.9	Ensemble des spectres SFG d'intérêt pour la première série d'expériences	77
4.10	Spectres SFG obtenus au cours de la deuxième série d'expériences (1)	79
4.11	Spectres SFG obtenus au cours de la deuxième série d'expériences (2)	81
4.12	Distribution des composantes dispersives (γ_s^d) et polaires (γ_s^p) de l'énergie de surface des substrats de verre modifiés par des alkylsiloxanes à terminaison CH_3	84
4.13	Tentative de mise en évidence de la polymérisation verticale subie par l'htms _{MI}	85
4.14	Détermination des énergies critiques de surface γ_c des substrats par le tracé des Zisman plots	86
4.15	Graphiques représentant θ_{AR} en fonction de γ_s^p , ($\gamma_s^p - \gamma_s^d$), $\gamma_{\text{H}_2\text{O}}$, et de la nanorugosité des surfaces	87
5.1	Illustration schématique décrivant les configurations possibles des surfaces aminosilanisées (1)	91
5.2	Illustration schématique décrivant les configurations possibles des surfaces aminosilanisées (2)	92
5.3	Illustrations schématiques de l'EDA et de l'HTMS	93
5.4	Formules semi-développées des liquides tests utilisés pour sonder les surfaces NH_2	93
5.5	Zisman plots permettant la détermination du γ_c des surfaces NH_2	94
5.6	Imagerie AFM et rugosités comparées des substrats adms et aptms	95
5.7	Distribution des composantes γ_s^d et γ_s^p de l'énergie et γ_c des surfaces NH_2 (1)	97
5.8	Distribution des composantes γ_s^d et γ_s^p de l'énergie et γ_c des surfaces NH_2 (2)	98
5.9	Distribution des composantes γ_s^d et γ_s^p de l'énergie et γ_c des surfaces NH_2 (3)	99
5.10	Évaluation de l'influence du temps de greffage de l'EDA : cas des substrats eda (24 h) eda' (16 h)	101
5.11	Comparaison par AFM de la rugosité et de la topographie de l'eda et de deux échantillons d'eda' : eda' (1) et eda' (2)	102
5.12	Topographie de la surface eda' : imagerie par AFM (a) et illustration schématique (b) des paramètres choisis pour calculer les énergies de surface	103
5.13	Schémas représentant les structures supposées des substrats eda' et du verre/PLL	105
5.14	Comparaison topographique par AFM des substrats eda' et verre/PLL	106
5.15	Images AFM d'un échantillon de verre/PLL sur $4 \mu\text{m}^2$ puis sur $100 \mu\text{m}^2$	106
5.16	Spectres IR des substrats verre/PLL et htms _H (surfaces NH_2 et CH_3 de classe 1)	106
5.17	Poly-L-lysine (PLL) adsorbée sur deux substrats de plastique différents	107
6.1	Schéma représentant des neurones parmi la matrice extracellulaire environnante	111
6.2	Image d'une cellule PC12 obtenue à la suite d'un immunomarquage	113
6.3	Structures des complexes NGF/p75 et NGF/TrkA	113
6.4	Illustration de la structure de l'actine globulaire, de l'actine filamenteuse, du cycle de polymérisation/ dépolymérisation des filaments d'actine, et de la croissance rapide d'un filament	115
6.5	Schématisation de la structure et des mécanismes de polymérisation/ dépolymérisation des microtubules	116
6.6	Représentation schématique des MAPs au sein des neurites, et de leurs fonctions de contrôle de l'espace entre les microtubules	117
6.7	Illustration schématique d'un cône de croissance, de ses structures, et de ses fonctions de guidage dans l'orientation de la croissance neuritique	118
6.8	Illustration schématique de protéines s'associant aux filaments d'actine au niveau du cône de croissance	119
6.9	Schéma illustrant la complexité des réseaux de signalisation qui contrôlent la réponse du cône de croissance à des signaux extracellulaires de guidage	120
6.10	Mécanisme d'avancée des neurites <i>via</i> le cône de croissance selon trois phases distinctes	121
7.1	Illustration de l'état des cellules PC12 moins de 24h après un repiquage sur PS/PLL	125
7.2	Schémas illustrant les différents protocoles d'ensemencement des substrats	126

7.3	Illustration du dispositif utilisé pour les observations en RICM	126
7.4	Évaluation de l'impact du NGF sur la propension des cellules PC12 à initier des neurites	128
7.5	Illustration schématique du principe de la RICM	129
7.6	Image RICM d'une cellule PC12 dans les 30 min suivant l'adhésion	129
7.7	Dynamique de rétraction d'un axone par imagerie AFM en milieu liquide	131
7.8	Analyses de section de la neurite imagée à la figure précédente	131
7.9	Images AFM obtenues pour des cellules PC12 fixées sur le substrat	132
7.10	Somas de cellules PC12 imagés par AFM	133
7.11	Exemples d'images de cellules PC12 marquées par des anticorps fluorescents	134
7.12	Illustration de la procédure de mesure et de comptage des neurites	135
8.1	Cellules PC12 cultivées sur eda' (sans NGF) et sur verre/PLL (avec et sans NGF)	138
8.2	Évaluation de l'influence de la nature des terminaisons chimiques	140
8.3	Évaluation de l'influence d'autres paramètres sur la croissance axonale des PC12	141
8.4	Expression de MAP1B sur verre/PLL et eda', en présence ou en l'absence de NGF	142
8.5	Localisation de Tau dans les neurites des cellules PC12 différenciées	144
8.6	RICM en conditions de culture sur des cellules vivantes	145
8.7	Morphologie des neurites évoluant sur verre/PLL et sur eda'	146
8.8	Évaluation de la modification des surfaces par l'adsorption de protéines du sérum (AFM)	147
8.9	Substrat PS/PLL imagé par AFM en milieu ambiant et en milieu liquide (i.e., en conditions de culture)	148
9.1	Corrélation entre ordre surfacique (spectre SFG), distribution des composantes γ^p et γ^d des énergies de surface, et adhésion et différenciation des cellules PC12	150
9.2	Propension des cellules à initier des neurites suivant la classe de surface	151
9.3	Expression de MAP1B dans les PC12 cultivées sur des surfaces de classe 2 ou 3	153
9.4	Localisation de MAP1B dans les PC12 évoluant sur des surfaces de classe 2 ou 3	153
9.5	Photographies des cellules PC12 sur des surfaces NH_2 après 24 h de culture sans NGF	156
9.6	Rappel des propriétés énergétiques des surfaces silanisées à terminaison NH_2	157
9.7	Propension des cellules PC12 à initier des neurites selon les substrats 24 h après ensemencement (culture sans NGF)	157
9.8	Cinétique de la croissance axonale des cellules PC12 sur eda (sans NGF)	158
9.9	Diagramme schématisant les composants du modèle d'élongation neuritique et les notations mathématiques utilisées	160
9.10	Cartographie AFM de neurites fixées sur eda'	161
9.11	Imagerie AFM d'une neurite fixée sur eda'	162
9.12	Analogie dimensionnelle entre la structure de l'eda' et celle d'un filopode	163
9.13	Adhésion des filopodes sur les surfaces de verre/PLO et d'eda' observée par interférométrie	164
10.1	Influence de la cytochalasine-B sur la cinétique de croissance axonale sur peda	169
10.2	Influence de la cytochalasine sur la génération de filopodes et/ou de lamellipodes	170
10.3	Influence de la cytochalasine-B sur la stabilité des filaments d'actine observée par immunofluorescence	172
10.4	Génération de neurites par les cellules PC12 1.1 cultivées sur collagène dans un milieu déprivé en sérum	173
10.5	Imagerie AFM de fibres de collagène adsorbées sur du verre propre	174
10.6	Génération de neurites par les cellules PC12 1.1 cultivées sur verre/PLL et verre/PLO dans un milieu sans NGF et déprivé en sérum	174
10.7	Filopodes et lamellipodes observés le long du corps des neurites sur verre/PLO (images AFM)	175

10.8	Image AFM de nanoplots d'or sur une surface de verre propre	176
10.9	Descriptions par AFM des différentes zones de nanoplots d'or sur du verre utilisées pour la culture cellulaire	177
10.10	Illustration de la configuration des lames modifiées par greffage de nanoplots	178
10.11	Cellules observées au microscope optique sur les zones de nanoplots après 6 jours de culture	178
10.12	Cellules observées au microscope optique sur la lame #2 après 6 jours de culture	179
11.1	Schéma situant notre contribution à l'identification des paramètres de surface modulant la fonction des cellules	183
A.1	Détection de micro-aspérités à la surface de l'otms	188

Liste des tableaux

2.1	Produits chimiques utilisés pour les modifications de surfaces	47
2.2	Description des procédés de modification en phase liquide des substrats de verre	49
3.1	Évaluation de la précision du « fit » du profil de la goutte par ImageJ	60
3.2	Tension de surface (γ ; mN m^{-1}) de quelques liquides	62
4.1	Protocoles de modification par l'OTMS de substrats analysés par SFG	72
4.2	Données collectées par AFM et par mesures d'angles de contact pour les surfaces CH_3	82
5.1	Données collectées par AFM et par mesures d'angles de contact pour les surfaces NH_2	95
5.2	Valeurs des angles : originales mesurées (θ_m) et d'après le fit des données (θ_f)	96
5.3	Valeurs des γ_s^d , γ_s^p et γ_s des surfaces NH_2 selon différentes combinaisons de liquides	97
5.4	Valeurs des γ_s^d , γ_s^p et γ_s moyennés sur toutes les combinaisons de liquides	99
5.5	Récapitulatif des substrats utilisés pour la culture cellulaire	108
7.1	Résumé des conditions de culture des expériences décrites aux chapitres 8 et 9	136
10.1	Propension des extrémités axonales des cellules PC12 à générer des filopodes ou des lamellipodes selon la concentration de cytochalasine-B utilisée	171
B.1	Comptage des filopodes et des lamellipodes suivant les concentrations en CB et en DMSO contenues dans les milieux de culture (1)	189
B.2	Comptage des filopodes et des lamellipodes suivant les concentrations en CB et en DMSO contenues dans les milieux de culture (2)	190

Introduction générale

L'organisation structurelle du système nerveux fait preuve d'un haut degré de complexité. Le cerveau est, dans l'univers connu, le système auto-organisé le plus complexe. D'une part, il assure le maintien des fonctions de l'organisme en exerçant un contrôle permanent sur tous ses processus physiologiques. D'autre part, il permet chez certains mammifères l'apparition de l'intelligence, à savoir la faculté à concocter des plans, autrement dit à se projeter dans le futur pour améliorer son présent. L'étude du cerveau recoupe donc un grand nombre de domaines de la science, en partant d'études cognitives pour aller jusqu'à l'analyse de processus biophysiques se déroulant à une échelle moléculaire. Entre ces deux extrêmes, on trouve des domaines d'études aussi variés que l'anatomie, la physiologie, la biologie cellulaire, la biochimie, ou encore la génétique.

Dans le corps d'un mammifère, le système nerveux se divise en deux sous-systèmes : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Le SNC comprend le cerveau et la moelle épinière. Le SNP comprend toutes les cellules nerveuses dont les noyaux se situent dans la moelle épinière, et dont les axones s'étendent à tous les organes du corps considéré. Le SNP a donc un rôle sensi-moteur, permettant l'interaction de l'organisme avec son milieu environnant, tandis que le SNC intègre les signaux transmis par le SNP, et lui renvoie éventuellement des ordres en réponse à ces signaux.

Les capacités extraordinaires du système nerveux s'appuient sur son unité fonctionnelle, à savoir la cellule nerveuse, appelée neurone. Le cerveau humain, par exemple, comporte un nombre de neurones avoisinant les cent milliards, et un seul de ces neurones peut connecter jusqu'à cent mille autres neurones. Cela produit un nombre potentiel de connections proprement gigantesque. Évidemment, ces connections, que l'on nomme synapses, ne peuvent être établies au hasard, sous peine que le système ne puisse plus assurer convenablement ses fonctions. L'une des facettes de la complexité dont recèle le système nerveux est donc la croissance, ordonnée et orientée, des fibres nerveuses durant l'embryogenèse. Les mécanismes physico-chimiques responsables d'une telle structuration sont cependant loin d'être totalement élucidés.

En 1910, HARRISON montre qu'une des forces impliquées dans la croissance axonale dérive des contacts que les axones établissent au cours de leur développement [1]. Ainsi, l'orientation des axones en phase de croissance dépend de la topographie du milieu extracellulaire [2] et de la porosité créée par les autres cellules présentes dans le milieu [3]. De telles interactions peuvent restreindre l'élongation des neurites à certaines directions, ce qui constitue aussi une participation au guidage. Une autre force influençant les mouvements cellulaires est le chimiotactisme [4]. En 1975, les études pionnières de LETOURNEAU indiquent que les mécanismes d'adhésion de la cellule à son substrat influencent la survie des cellules neuronales et leur faculté à développer des neurites, soit des axones (ou dendrites) en phase de croissance [5, 6].

Les cellules se divisent, prolifèrent, et se différencient d'autant plus facilement qu'elles adhèrent fermement à une surface [7]. La différenciation est le processus suivant lequel une cellule adopte un phénotype particulier, c'est-à-dire un ensemble de formes spécifiques lui permettant d'accomplir des fonctions tout aussi spécifiques. Ce processus résulte en principe d'une expression différentielle des gènes contenus dans son noyau. Il a été récemment montré qu'une cellule souche pouvait se différencier soit en neurone, soit en myoblaste (cellule musculaire), soit en ostéoblaste (cellule d'os) suivant la rigidité ou l'élasticité de la matrice extracellulaire environnante [8].

La compréhension des mécanismes impliqués dans la différenciation neuronale est nécessaire du point de vue de la régénéscence de tissus nerveux endommagés (par une blessure, par exemple). Après une axotomie dans le SNP (figure 0.1), on assiste à une régénéscence de l'axone : idéalement, il suit le chemin emprunté par son prédécesseur, bifurque aux mêmes intersections, et vient finalement réinnerver les mêmes fibres musculaires en reformant des jonctions synaptiques fonctionnelles [9]. Par contre, dans le SNC mature/adulte, la régénéscence axonale est fortement inhibée par le système nerveux lui-même, empêchant généralement l'axone de croître sur une distance supérieure à 1 mm [10]. En effet, des astrocytes migrent vers l'endroit où l'axotomie a eu lieu, formant ainsi une barrière « physique », appelée cicatrice gliale, empêchant de fait la régénéscence axonale [11–13] (figure 0.2). De plus, des études ont mis en évidence que des protéines, présentes au niveau de la gaine de myéline notamment, ont une activité fortement inhibitrice à la régénéscence axonale (barrière « physico-chimique ») [14, 15]. Les lésions (traumatiques, vasculaires ou autres) du SNC des mammifères adultes entraînent donc des déficits neurologiques fonctionnels souvent irréversibles.

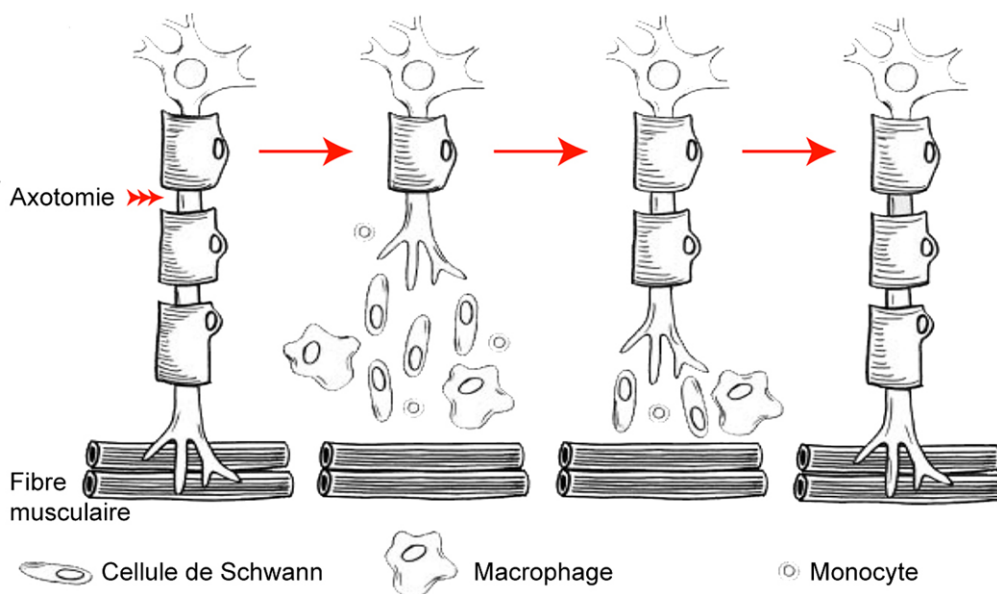


FIGURE 0.1: Schématisation de la régénéscence axonale dans le système nerveux périphérique.

Les cellules qui constituent des organismes complexes, tels que les mammifères, éprouvent pour la plupart le besoin impérieux de créer des liens avec un substrat afin de survivre et de se développer. En effet, seuls quelques types cellulaires particuliers, comme les globules sanguins ou les spermatozoïdes, sont capables de survivre dans un milieu purement liquide. *In vivo*, soit les cellules adhèrent à des protéines de la matrice extracellulaire (exemple : le collagène), soit elles se connectent les unes aux autres afin de constituer des tissus organiques. *In vitro*, cette nécessité se traduit par l'obligation d'offrir aux cellules en culture un *substrat d'adhésion* adéquat.

Ce travail vise à corréliser l'adhésion et la différenciation des cellules neuronales avec certains paramètres influençant l'adhésion cellulaire, telles que les interactions non-spécifiques qu'entretiennent les cellules avec leurs substrats. Plus particulièrement, nous examinerons l'influence de la distribution des énergies de surface des substrats d'adhésion. L'initiation et le guidage des neurites reposent sur une combinaison de signaux provenant de la matrice extracellulaire, parmi lesquels l'énergie d'adhésion joue un rôle [16]. Partant de là, il est fondamental de dévoiler toutes les caractéristiques du substrat susceptibles d'être senties par la cellule, et traduites en extension neuritique en réponse à ces signaux de nature physique. Les études précédemment citées [5, 6] ont donné naissance au modèle du couplage « substrat-cytosquelette » [17, 18], dans lequel les interactions des protéines transmembranaires avec des molécules de la matrice extracellulaire sont

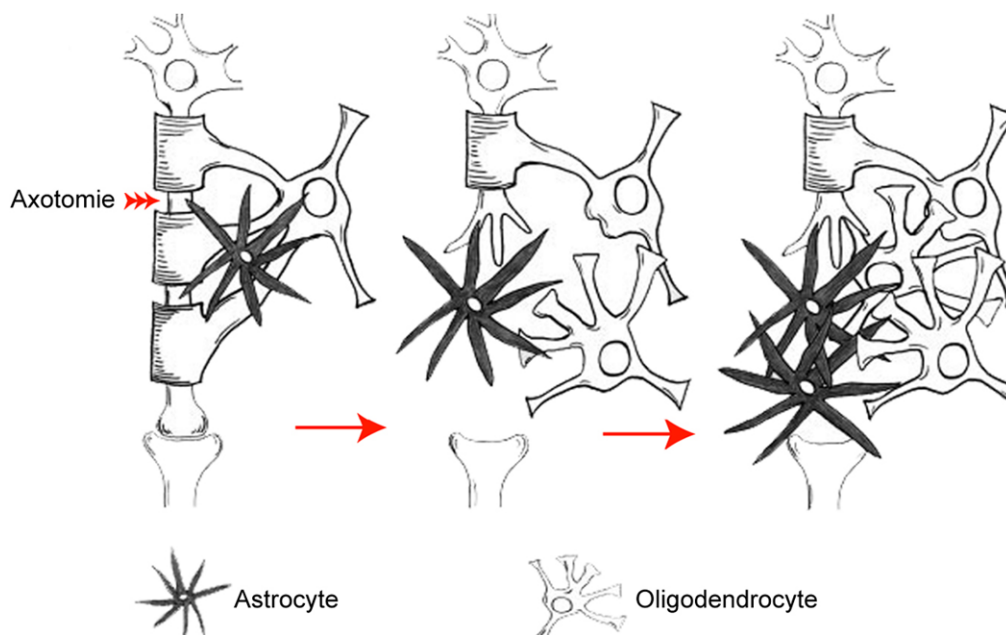


FIGURE 0.2: Schématisation de la tentative de régénérescence axonale et de la formation de cicatrice gliale dans le système nerveux central.

traduites au cytosquelette de la cellule. Cette traduction s'effectue au travers de l'activité d'un panel de molécules, directement liées ou agissant de concert avec les filaments d'actine du cytosquelette. Parmi ces molécules, très nombreuses, citons l'influence critique des ions calcium, qui influent au travers de la membrane de manière très spécifique par l'intermédiaire de canaux ioniques [19, 20]. Les différents mécanismes moléculaires engagés conduisent à la génération de tensions exercées sur la membrane de la cellule, qui au final permettent la croissance neuritique *via* la formation et la stabilisation de points focaux d'adhésion [21, 22].

Les interactions que les substrats d'adhésion entretiennent avec des cellules, dont les cellules nerveuses, modulent les fonctions que ces cellules acquièrent. Plusieurs paramètres sont engagés dans le contrôle de ces interactions. Parmi ces paramètres, on trouve la topographie des substrats à différentes échelles, y compris nanométriques [23–26], et la nature chimique de la surface des substrats [27–29]. L'élasticité ou la rigidité des substrats sont également en mesure d'influer sur la capacité des cellules à initier des neurites [30–33], ainsi que sur leur taux de branchement [34]. En conséquence, la fonction et la forme des cellules, ainsi que des tissus qu'elles forment, sont supposées être le résultat d'un contrôle exercé par un ensemble de signaux de types spatial, chimique, et mécanique, au cœur duquel on trouve le programme génétique (figure 0.3). Cependant, les rôles exacts de l'énergie de surface et de sa distribution spatiale dans ces processus ne sont pas clairement identifiés, et une étude systématique examinant leur influence pourrait contribuer à une meilleure compréhension des paramètres d'adhésion qui contrôlent la neuritogénèse.

L'angle choisi pour étudier ce problème consiste à fabriquer des surfaces de verre modifiées par chimisorption d'organosilanes en phase liquide, et sur lesquelles nous cultivons des cellules capables d'acquérir un phénotype neuronal. La fonctionnalisation des surfaces de verre (ou silice) est effectuée par greffage. Autrement dit, les molécules d'organosilanes sont fixées par liaisons covalentes à la surface du verre [35]. Le greffage s'effectue par auto-assemblage, permettant d'obtenir des films moléculaires dont les propriétés physico-chimiques de surface sont contrôlées à l'extrême, spécialement en termes de distribution d'énergie d'adhésion. Ce procédé de modification trouve de nombreuses applications dans des domaines variés, notamment dans la chimie analytique (exemple : le tapissage des colonnes utilisées en chromatographie liquide [36]), la catalyse [37], ou encore dans les biotechnologies [38, 39]. Concernant le présent travail, la fabrication de biomatériaux modèles, basée sur ce principe d'auto-assemblage, est destinée à nous renseigner sur les effets cellulaires induits par des interactions cellule-surface.

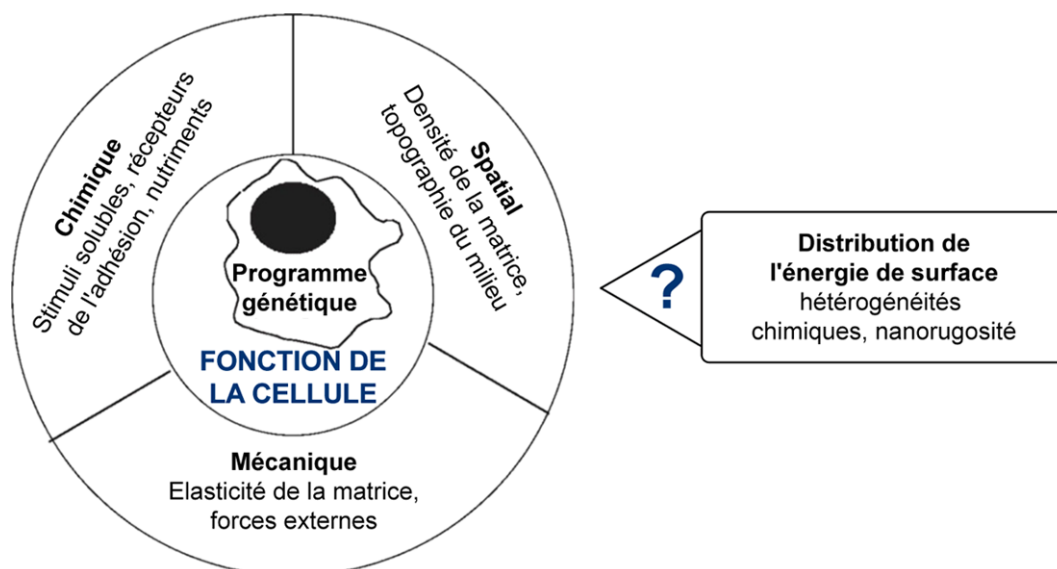


FIGURE 0.3: Schémas récapitulant les paramètres qui contrôlent la fonction des cellules. Les paramètres connus sont représentés dans le cercle du schéma de gauche (adapté de la Réf. [49]), et le paramètre dont l'influence est évaluée dans notre travail est représenté à droite.

Le contrôle exercé sur la formation des monocouches auto-assemblées (connues en anglais sous le nom de « self-assembled monolayers », abrégé en « SAMs ») permet la maîtrise de paramètres tels que la rugosité, la nature et l'organisation des groupements chimiques exposés en surface. La combinaison de ces propriétés génère, aux échelles nanométriques, des distributions d'énergies distinctes, et à des échelles plus grandes, des caractéristiques macroscopiques propres telles que la mouillabilité ou encore la densité surfacique de charge. Les deux catégories de films auto-assemblés les plus connues sont, d'une part, les monocouches d'alkanethiols assemblées sur de l'or [40], et d'autre part, les monocouches d'alkylsiloxanes assemblées sur du verre [41, 42]. Cependant, il en existe bien d'autres ; citons par exemple l'assemblage de nanoparticules colloïdales d'or [43], l'assemblage de domaines antagonistes (mouillants/non-mouillants) [44] ou encore la formation de sondes polypeptidiques auto-assemblées en monocouches superposées [45]. Les films moléculaires auto-assemblés ont fait leurs preuves en matière de contrôle de l'adhésion cellulaire, qu'il s'agisse, par exemple, d'alkylsiloxanes sur du verre [46, 47] ou sur du titane [48]. En particulier, ces monocouches ont montré une aptitude à contrôler la différenciation des cellules neuronales [27, 46, 48]. Dans cette optique, nous chercherons à faire varier la distribution des composantes de l'énergie de surface, en faisant varier les processus d'adsorption à la surface du verre, de manière à faire varier en parallèle le degré d'adhésion et de différenciation des cellules neuronales. Notons que l'habilité à contrôler la distribution des énergies de surface présente un intérêt particulier dans la conception des matériaux biocompatibles, tels que les prothèses.

Ce document se décompose en deux parties, riches de cinq chapitres chacune. Au cours de la première partie, nous traiterons uniquement des surfaces de verre modifiées. Nous y introduirons quelques principes physico-chimiques nécessaires à la compréhension des phénomènes en jeu, puis nous présenterons les techniques de modification et de caractérisation des surfaces élaborées. Les deux derniers chapitres de cette première partie seront consacrés à l'analyse des surfaces. La deuxième partie traitera de la culture des cellules neuronales sur les surfaces élaborées. Après une description du modèle de cellule neuronale utilisé (la cellule PC12) et des mécanismes régulant la croissance axonale, nous présenterons les techniques d'analyses employées pour imager les cellules et pour qualifier et quantifier les différents états d'adhésion et de différenciation. Les troisième et quatrième chapitres de cette deuxième partie (chapitres 8 et 9) seront consacrés à l'analyse proprement dite. Enfin, dans le dernier chapitre, nous exposerons quelques expériences complémentaires réalisées, qui indiquent les suites qui pourraient éventuellement être données à ce travail. Les articles jusqu'à présent extraits de cette thèse sont présentés en annexes.

Première partie

**SURFACES : ORDRE ET
DISTRIBUTION D'ÉNERGIE**

Chapitre 1

Introduction aux surfaces : adhésion, forces, et surfaces auto-assemblées

Même si ce travail ne traite pas directement de l'adhésion cellulaire, mais plutôt des effets cellulaires entraînés par l'adhésion non-spécifique à tel ou tel type de substrat, il nous faut présenter en quoi consiste l'adhésion. Elle fera donc l'objet d'une description purement physique. Puis nous expliciterons en détail la nature des interactions non-spécifiques générées entre une cellule et un substrat, et en particulier la portée et l'intensité de leurs énergies respectives. Enfin nous introduirons les monocouches moléculaires que nous utilisons en guise de substrat pour l'adhésion de nos cellules. Ces monocouches se basent principalement sur la modification de surfaces de verre par l'auto-assemblage de molécules alkyksiloxanées. Nous décrirons donc quelques mécanismes réactionnels se produisant à la surface du verre modifié, avant d'aborder les techniques de modification proprement dites au chapitre suivant.

1.1 Énergie de surface

1.1.1 Origine physique

Considérons deux phases non-miscibles, l'une solide ou liquide, l'autre liquide ou gazeuse, en contact l'une avec l'autre (figure 1.1). Les molécules situées à l'interface sont dans un environnement qui diffère par rapport aux molécules occupant le volume. Une molécule en phase volumique, solide ou liquide, interagit de façon équilibrée avec toutes les molécules qui l'entourent. Ces interactions, de nature attractive, sont par contre réduites pour une molécule située dans la zone interfaciale. Ce phénomène entraîne l'apparition d'une force qui tend à ramener la molécule dans le volume, et qui se trouve à l'origine de ce que l'on nomme la *tension de surface*, l'*énergie de surface*, la *tension superficielle* ou encore la *tension interfaciale*.

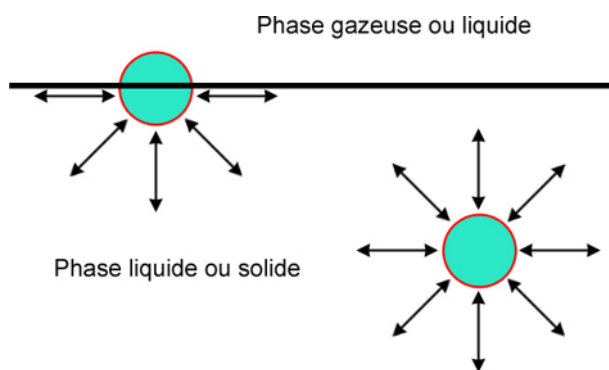


FIGURE 1.1: Illustration du déficit énergétique que subit une molécule située à une interface (adapté de la Réf. [50]). Elle perd alors la moitié de ses interactions attractives.

Exposée à la surface, une molécule est dans un état de déficit énergétique. C’est pour cette raison que les liquides ajustent leur forme pour exposer un minimum de surface : un liquide placé dans le vide adoptera toujours une forme sphérique. Si U est l’énergie de cohésion par molécule, représentant la somme de toutes ses interactions attractives potentielles, alors une molécule en surface perd environ $\frac{1}{2}U$. La tension de surface est une mesure directe de ce défaut d’énergie par unité de surface, qui équivaut à une force par unité de longueur. Cette résultante des forces s’exerce de l’interface vers le volume. Si a est la dimension d’une molécule et a^2 la surface exposée par cette molécule, la tension de surface, notée γ , est telle que $\gamma \approx \frac{U}{2a^2}$. Plus les forces de cohésion au sein du volume seront importantes, plus la tension de surface de la phase considérée sera grande. À fin d’illustration, DE GENNES et coll. citent les exemples suivants dans la référence [50] : pour des huiles, où les interactions sont de type van der Waals (décrites plus loin dans ce chapitre), on a $U \approx k_B T$, soit l’agitation thermique (où k_B est la constante de Boltzmann et T la température). À 25°C, cela donne $\gamma_L \approx 20 \text{ mJ m}^{-2}$, soit 20 mN m^{-1} (γ_L étant la tension superficielle du liquide. Pour un solide, on la notera γ_s). Pour l’eau, où il faut tenir compte en plus des liaisons hydrogène, $\gamma_L \approx 72 \text{ mN m}^{-1}$. Pour le mercure, métal solide très cohésif, on a $\gamma_L \approx 500 \text{ mN m}^{-1}$.

1.1.2 Travail de surface

Pour créer de la surface, c’est-à-dire amener une molécule du volume à la surface, il faut fournir de l’énergie. Du point de vue de la thermodynamique, si on note F l’énergie libre d’un système biphasique, cela se traduit par :

$$\gamma = \left(\frac{\partial F}{\partial A} \right)_{T, V, n} \quad (1.1)$$

où A est l’aire de l’interface, T la température, n le nombre de molécules, et V le volume total [51]. Dès qu’il existe une interface, γ est positive. On retrouve donc le principe exprimant la nécessité pour tout système de minimiser son interface. Pour les molécules situées en zone interfaciale et ne pouvant pénétrer dans le volume, la tension superficielle se traduit aussi par la nécessité de combler cette interface en exerçant une force attractive sur tout objet situé à une distance suffisamment proche. C’est pourquoi dans ce travail, nous l’appellerons souvent l’énergie d’adhésion. Les cellules font naturellement partie des « objets » susceptibles de subir ce type d’attraction. Dans ce cas, l’interaction se déroule dans un milieu liquide, au voisinage d’un substrat solide.

De façon générale, on admettra pour l’instant que pour deux phases, dont l’une au moins est liquide, le principe qui détermine la façon dont elles interagissent, soit de façon attractive, soit de façon répulsive, peut s’énoncer comme suit : « le plus énergétique est mouillé par le moins énergétique ». Nous reviendrons sur ce paramètre d’étalement lorsque nous introduirons les techniques de mouillage, utilisées pour mesurer les tensions de surface des substrats (cf. chapitre 3).

1.2 Nature des interactions moléculaires engendrées

1.2.1 Interactions non-spécifiques

Les énergies de surface dont nous étudierons les effets combinés sur les cellules sont de deux types : dispersives (\leftrightarrow « apolaires ») et non-dispersives (\leftrightarrow « polaires »). Elles appartiennent toutes deux à la classe des interactions non-spécifiques que nous allons décrire à présent, en gardant à l’esprit que les interactions doivent être examinées sous le prisme cellulaire : la mise en jeu de deux surfaces, l’une constituée par le substrat d’adhésion, l’autre par la membrane des cellules, le tout dans un milieu liquide. La membrane d’une cellule, contrairement à nos substrats d’adhésion, ne peut être considérée comme un solide strict. Elle s’apparenterait plutôt à un milieu dispersé à la fois solide et liquide ou à un liquide très condensé. Pour plus de détails au sujet des concepts et équations formulés ci-après, nous invitons le lecteur à se reporter aux références [52–55].

Interactions à longue portée : composante « dispersive » de l'énergie

L'interaction non-spécifique la plus universelle, active en milieu liquide tout comme dans le vide, est l'interaction de van der Waals (VdW). Cette interaction génère des forces du même nom, à l'échelle atomique ou moléculaire, qui, bien que de même nature, se distinguent suivant trois catégories :

- i. Les forces dipôle/dipôle, décrites par KEESOM [56] : les molécules interagissent *via* les forces induites par leurs dipôles permanents.
- ii. Les forces dipôle/dipôle-induit, décrites par DEBYE [57] : le champ produit par un dipôle permanent induit un dipôle dans un atome ou une molécule apolaire.
- iii. Les forces dispersives, décrites par LONDON [58], puis par LIFSHITZ [59] : ces forces sont dues à des fluctuations de charge des atomes, causant un déplacement instantané du barycentre des charges positives vis-à-vis du barycentre des charges négatives. À un instant donné, un dipôle apparaît donc, et induit l'apparition d'un dipôle dans un autre atome situé à proximité. Par conséquent, des atomes apolaires (exemple : le néon), des groupements d'atomes très peu polaires (exemple : le groupe CH₃) ou des molécules apolaires s'attirent mutuellement. Notons que ces forces font l'objet d'une description très récente qui se signale par sa pédagogie [60]. Pour diverses raisons, ces interactions de VdW–London sont considérées comme prépondérantes dans le cas de corps macroscopiques au sein d'un système condensé [61]. Par convention, nous parlerons donc de composante dispersive de l'énergie de surface au sujet de la somme de toutes les interactions de VdW, et nous noterons cette grandeur physique γ^d .

Les forces de VdW de nature attractive exercent une interaction qui décroît exponentiellement à la distance d entre deux atomes ou deux surfaces suivant $\frac{1}{d^n}$, où n dépend de la géométrie des objets interagissant (par exemple entre une sphère et une surface plane ou entre deux surfaces planes). Pour une sphère 1 de rayon R située à une distance $d \ll R$ d'une surface plane 2, la force attractive F et l'énergie d'adhésion de van der Waals W_{VdW} s'écrivent :

$$F(d) = -\frac{AR}{6d^2} \implies W_{\text{VdW}}(d) = \frac{AR}{6d} = 2\sqrt{\gamma_1^d \gamma_2^d}, \quad (1.2)$$

où A est appelée la « constante de Hamaker » que l'on peut écrire [62] :

$$A = \pi^2 k \bar{\alpha}_L (\bar{\alpha}_S - \bar{\alpha}_L) \quad (1.3)$$

où k est une constante, et où les $\bar{\alpha}$ sont les polarisabilités par unité de volume d'un liquide L au voisinage d'une surface solide S (on considère ici la cellule comme une « sphère » liquide pour simplifier). Le fait que A s'annule pour $\bar{\alpha}_S = \bar{\alpha}_L$ est normal : si le liquide est identique au solide, il n'y a plus d'énergie spécifique associée à la distance séparant les deux objets. Cette constante est stable pour des distances inférieures à 10 nm (au-delà, les forces de dispersion décroissent beaucoup plus vite avec la distance séparant les deux objets). Le signe de A est non-trivial : le cas le plus fréquent est celui où le solide est plus polarisable que le liquide ($\bar{\alpha}_S > \bar{\alpha}_L \Leftrightarrow A > 0$) : c'est le cas d'une surface dite de « haute énergie ». Elle est parfois négative, mais le plus souvent positive dans notre cas, compte-tenu des énergies de surface relativement peu élevées des membranes cellulaires aux températures physiologiques ($\sim 37^\circ\text{C}$).

Typiquement, à 37°C , pour une membrane cellulaire, soit une bicouche lipidique, A est de l'ordre de $4\text{--}8 \cdot 10^{-21}$ J, soit environ l'énergie thermique ($\Leftrightarrow \sim 1\text{--}2 k_B T$). Ainsi, à des distances de l'ordre de la taille d'une cellule (ici : $R \simeq 10 \mu\text{m}$), l'effet des forces de dispersion engendrées par le substrat d'adhésion sera quasi-nul. Par contre, à une distance de 10 nm, on aura :

$$\gamma^d(10 \cdot 10^{-9}) \approx \frac{8 \cdot 10^{-21} \times 10 \cdot 10^{-6}}{6 \times 10 \cdot 10^{-9}} \approx 1,33 \cdot 10^{-18} \text{ J} \Leftrightarrow \gamma^d \approx 333 k_B T, \quad (1.4)$$

ce qui représente une valeur considérable. En faisant l'approximation grossière que la constante de Hamaker voit sa valeur divisée par 10 pour une distance de séparation de 100 nm, le calcul indique une valeur de $\sim 3,3.k_B T$. Divisée par 50, on obtiendrait $\sim 0,7.k_B T$, soit une valeur de l'ordre de l'énergie thermique. On peut donc estimer que, pour les cellules et les substrats considérés dans cette étude, les forces de dispersion deviennent sensibles pour des distances de séparation inférieures à environ 100 nm, et deviennent d'autant plus critiques que la cellule est proche du substrat.

Nous verrons que parmi toutes les surfaces élaborées au cours de ce travail, pour lesquelles on a $21,3 \text{ mN m}^{-1} \leq \gamma_s \leq 59,9 \text{ mN m}^{-1}$, seules trois d'entre elles empêchent toute adhésion des cellules, et il s'agit des trois surfaces ayant les énergies les plus faibles ($\gamma_s \approx 21,6 \text{ mN m}^{-1}$, $\gamma_s \approx 23,6 \text{ mN m}^{-1}$, et $\gamma_s \approx 24,5 \text{ mN m}^{-1}$). Sans vouloir anticiper sur l'interprétation des résultats, il est possible que cette observation résulte d'une inversion de signe de la constante de Hamaker, relative aux transitions de mouillage [63], et/ou d'interactions de van der Waals de nature répulsive. Ces dernières sont également appelées « pression de disjonction de van der Waals » et n'apparaissent que pour des corps distincts interagissant au sein d'un milieu tiers [64], cas qui correspond à nos travaux.

Interactions à courte portée : liaisons acide-base de Lewis ou donneur-accepteur d'électron

Les composés déficitaires en électrons sont des acides de Lewis. Comme les radicaux, les acides de Lewis tendent à compléter leur couche de valence, l'idéal pour eux est donc de réagir avec une molécule possédant des doublets d'électrons libres. Les molécules possédant des doublets non-liants sont appelées des bases de Lewis. L'association d'un acide et d'une base de Lewis forme un « adduit ». La formation d'un adduit lors d'une réaction acide-base au sens de Lewis est un exemple parfait de liaison donneur-accepteur. Une liaison donneur-accepteur est une liaison où les deux électrons de la liaison sont fournis par le même atome. L'atome donneur possède un doublet libre et l'atome accepteur une déficience en paire d'électrons.

Au regard des interactions colloïdales, l'intensité des liaisons acide-base de Lewis en tant que forces de nature physique a longtemps été négligée vis-à-vis des forces engendrées par des interactions de VdW. Il apparaît cependant que les forces générées par ces interactions peuvent atteindre des intensités dont l'ordre de grandeur est de une à deux fois plus élevé par rapport aux interactions de VdW [52]. Ces interactions ou liaisons donneur-accepteur (incluant la liaison hydrogène), présentent, contrairement aux interactions de VdW, un caractère essentiellement asymétrique. Les caractères électroniques respectivement donneur et accepteur de l'énergie associée à cette interaction, et souvent indiquée (imparfaitement [52]) sous l'appellation « polaire » (et notée γ^P) peuvent donc s'exprimer par γ^- et γ^+ . La composante « polaire » de l'énergie libre d'interaction entre deux matériaux 1 et 2 s'exprime suivant :

$$W_{12}^P = 2 \left(\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} + \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+} \right), \quad (1.5)$$

afin de prendre en compte les caractères donneur et accepteur d'électron des deux matériaux. La composante « polaire » (terme que nous utiliserons dans ce travail de thèse pour dénommer en fait toutes les composantes « non-dispersives ») de l'énergie libre de cohésion de n'importe quel matériau i s'exprime donc suivant :

$$W_{ii}^P = 4\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-} \implies \gamma_i^P = 2\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-}. \quad (1.6)$$

La portée des interactions non-dispersives, soit des liaisons acide-base de Lewis ou hydrogène, s'exerce entre deux objets séparés d'une distance avoisinant les 3 Å, soit une portée infime par rapport aux interactions de type Lifshitz–VdW. Un exemple de son intensité relative vis-à-vis des interactions de VdW–London est fourni par l'eau, pour laquelle on a $\gamma^P = 51 \text{ mN m}^{-1}$, alors

que $\gamma^d = 21,8 \text{ mN m}^{-1}$ (Nous y reviendrons au [chapitre 3](#), cf. [tableau 3.2](#)). Dans l'eau, ce haut degré d'interaction « polaire » s'explique essentiellement par la formation de nombreuses liaisons hydrogène. La liaison hydrogène est une liaison très spéciale à bien des égards. Elle se forme entre un atome d'hydrogène dépolarisé positivement et un doublet d'électrons non-liants porté par un atome très électronégatif, comme l'oxygène dans le cas de l'eau. Bien que classée dans les interactions de type « polaire » voire électrostatique, elle présente par certains côtés un caractère covalent indéniable [65]. Son influence implique une hausse considérable des tensions de surface des liquides dont la structure permet aisément son apparition. Ainsi, on enregistre des températures de fusion beaucoup plus élevées chez les composés H_2O , NH_3 , et HF , comparés à leurs homologues respectifs H_2S , PH_3 et HCl .

Interactions électrostatiques

Dans un système polaire, tel qu'un milieu aqueux, très peu de macromolécules ou particules (et donc des surfaces organiques ou inorganiques) sont totalement dénuées de charges. Deux surfaces chargées peuvent être respectivement attractives ou répulsives suivant que leurs signes sont respectivement contraires ou identiques. Leur portée est fixée par le rayon d'écran de Debye–Hückel, représentant l'épaisseur de la couche diffuse nécessaire au rééquilibrage de la charge totale de surface par les contre-ions. Pour illustrer cela, considérons une surface de verre propre plongée dans l'eau, liquide polaire. La grande majorité des substrats élaborés au cours de ce travail comporte des groupes silanol (SiOH), présents à la surface du verre. Les groupes silanol vont dans une certaine mesure, et pour une certaine gamme de pH, s'ioniser selon :



Se forment alors des doubles couches (à $\text{pH} \sim 7$) composées de la surface négative et de la couche formée par les contre-ions positifs tels K^+ ou Na^+ . Ces ions sont également présents en surface des membranes des cellules neuronales, et permettent l'établissement d'un potentiel de repos (de l'ordre de -70 mV) grâce à l'existence de canaux ioniques (notons par ailleurs que la dépolarisation des membranes par afflux des ions K^+ et Na^+ au travers de la membrane permet l'influx du signal nerveux). Deux surfaces chargées interagissent électrostatiquement dès que leurs couches diffuses sont suffisamment proches pour se recouvrir mutuellement. Le potentiel d'interaction généré s'écrit dans ce cas :

$$W_{\pm} \simeq \alpha e^{-d/\lambda_D} \quad (1.8)$$

où α est une constante et λ_D est le rayon d'écran de Debye–Hückel. Ce potentiel décroît donc exponentiellement avec la distance. De plus, il décroît aussi lorsque la concentration en sels du milieu environnant augmente. Dans le cadre de cultures cellulaires, qui nécessitent des conditions physiologiques adaptées, cette concentration est relativement élevée ($\sim 100 \text{ mM}$), et implique $\lambda_D \approx 2 \text{ nm}$. Cela signifie que pour des cellules au voisinage d'une surface, les forces de dispersion, de plus longue portée, prennent le pas sur les interactions coulombiennes. En outre, nous considérons que nos surfaces, bien que dotées pour la plupart de groupes silanol, sont *a priori* peu chargées. Seul un substrat, élaboré à partir de poly-L-lysine, polymère chargé positivement, présente *a priori* ce caractère dans des proportions significatives.

Les interactions dispersives et non-dispersives décrites précédemment devraient ainsi être en mesure d'influer plus fortement que les interactions purement électrostatiques sur le caractère énergétique des surfaces élaborées. Ce caractère sera donc évalué suivant l'angle « composantes dispersives/polaires » (soit apolaires/polaires ou dispersives/non-dispersives) de l'énergie de surface, et donc de l'énergie d'adhésion des substrats élaborés vis-à-vis des cellules.

1.2.2 Interactions spécifiques

Les interactions spécifiques résultent d'interactions de type « clef-serrure », soit l'association de molécules particulières, appelées récepteur et ligand, et capables de se reconnaître de façon très spécifique [66]. Bien que, comme précisé en préambule du présent chapitre, les interactions spécifiques entre cellule et substrat ne soient pas le sujet de cette thèse, il est cependant fort probable qu'elles aient un rôle à jouer dans les résultats observés. Nous supposons par exemple que, selon la spécificité des interactions non-spécifiques nouées par les cellules avec les substrats d'adhésion, les cellules excrètent une matrice extracellulaire susceptible de leur fournir un support pour des interactions spécifiques. Elles pourraient aussi interagir spécifiquement avec des protéines du sérum, contenues dans les milieux de culture et plus ou moins adsorbées sur les substrats (cf. chapitre 8). C'est pourquoi nous allons aussi brièvement que possible présenter les interactions spécifiques et certains de leurs mécanismes. Nous présenterons ensuite quelques molécules biologiques de l'adhésion.

Mécanismes de la liaison récepteur-ligand

L'activation de molécules biologiques comme les protéines membranaires s'effectue souvent par le biais de sites d'adhésion spécifiques reconnus par d'autres macromolécules. L'association se produit *via* une combinaison de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes ou polaires (par exemple entre des groupements aromatiques inclus dans les chaînes latérales de certains acides aminés). En immunologie, le site de reconnaissance d'un anticorps s'appelle un « paratope » et celui d'un antigène (soit une protéine que l'on cherche à détecter) un « épitope » (figure 1.2).

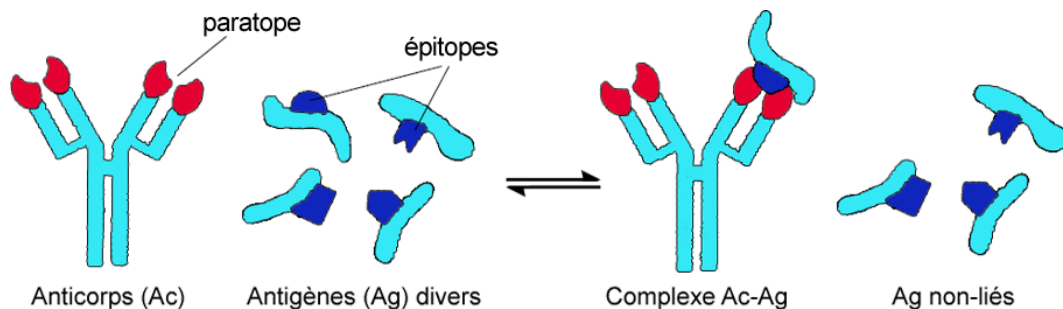


FIGURE 1.2: Schéma de formation d'une liaison spécifique anticorps-antigène [67].

Alors que les interactions non-spécifiques sont essentiellement fonction de la distance entre deux objets, les interactions spécifiques se caractérisent plutôt par leurs constantes d'affinité et par leurs constantes cinétiques d'association et de dissociation. Le degré d'association d'un récepteur R et d'un ligand G est ainsi analogue à un équilibre chimique entre un état lié et un état non lié et s'exprime selon :



À l'équilibre, cette relation est caractérisée par une constante d'affinité K telle que :

$$K = \frac{[RG]}{[R][G]}. \quad (1.10)$$

La cinétique de la réaction se traduit à travers les constantes d'association k_{on} et de dissociation k_{off} selon :

$$\frac{d[RG]}{dt} = k_{\text{on}}[R][G] - k_{\text{off}}[RG], \quad (1.11)$$

où k_{on} (exprimée en $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) dépend du temps nécessaire à la formation de la liaison et k_{off} (exprimée en s^{-1}) correspond à la durée de vie de la liaison entre le récepteur et le ligand. k_{on} et k_{off} sont liées à la constante d’affinité K selon $K = k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$. K traduit donc la probabilité de trouver le ligand et le récepteur associés l’un à l’autre. Concrètement, un site de liaison anticorps-antigène peut posséder une constante d’affinité intrinsèque de l’ordre de 10^9 l mol^{-1} et un taux de dissociation d’environ 10^{-3} s^{-1} [68,69]. Ces valeurs correspondent à une durée de vie d’environ 15 min dans le cas où la liaison ne subit pas de force extérieure. Notons que k_{on} et k_{off} , plutôt que d’être envisagées comme des constantes, traduiraient plutôt la fréquence d’attachement du ligand au récepteur en fonction de la distance d les séparant, soit $k_{\text{on}}(d)$, et la fréquence de rupture du couple ligand-récepteur en fonction de la force F subie, soit $k_{\text{off}}(F)$ [70].

Protéines de l’adhésion cellulaire

Les progrès effectués depuis quelques dizaines d’années dans l’utilisation des anticorps monoclonaux et de la génétique moléculaire ont permis d’identifier des centaines de récepteurs d’adhésion. Il est possible que près de la moitié des molécules présentes sur la membrane d’une cellule soient impliquées dans l’adhésion [71]. Ces protéines comportent une partie extracellulaire, une partie transmembranaire hydrophobe intégrée au sein de la bicouche lipidique, et une partie intracellulaire (ou « intracytosolique ») liée à d’autres molécules qui permettent de faire le lien, notamment, avec les filaments du cytosquelette. Nous reviendrons en détails sur les structures associées au cytosquelette au cours du chapitre 6 (partie II du document). En outre, cette partie intracellulaire peut déclencher des cascades de signalisation à l’intérieur du cytoplasme qui peuvent, par exemple, donner naissance à la synthèse de nouvelles protéines, et donc à la possibilité pour la cellule d’élargir sa palette de fonctions. La partie extracellulaire est celle qui interagit suivant les mécanismes décrits plus haut avec, soit d’autres cellules, soit d’autres types de substrats [72]. Parmi les protéines de l’adhésion les plus connues se trouvent les cadhérines, importantes en matière d’adhésion cellule-cellule, et les intégrines, très impliquées dans l’adhésion à la matrice extracellulaire. Pour plus d’informations à ce sujet, se reporter à [73].

Dans bon nombre de cas, l’adhésion résulte d’une compétition ou d’une association d’interactions spécifiques et non-spécifiques. Par exemple, pour s’attacher d’une manière spécifique, la cellule peut avoir recours à des interactions répulsives de nature non-spécifique [74]. Dans ce travail, nous n’étudierons pas l’adhésion sous cet angle, mais sur l’influence que peut exercer la distribution de divers types d’interactions non-spécifiques au niveau de l’adhésion et de la différenciation des cellules. Pour ce faire, nous avons élaboré des substrats modèles à base de verre modifié, principalement par auto-assemblage d’alkylsiloxanes à la surface du verre. Ayant déjà introduit ces surfaces au cours de l’introduction générale, nous allons à présent présenter quelques mécanismes réactionnels qui permettent leur formation.

1.3 Formation des monocouches d’alkylsiloxanes auto-assemblées sur du verre.

1.3.1 Réaction de silylation en phase liquide

La modification du verre par des alkylsiloxanes est réalisée avec des organosilanes possédant au moins une fonction hydrolysable, X. Notons que, dans le cadre de cette thèse, les organosilanes sont divisés en deux catégories suivant la nature de leur groupe hydrolysable : les chlorosilanes et les méthoxysilanes. Autrement dit, les groupes X des alkylsilanes utilisés (figure 1.3) sont soit des groupes chlorés (Cl) soit des groupes méthoxy (OCH_3). La chimisorption de siloxanes sur du verre requiert leur activation préalable, au cours de laquelle un ou plusieurs groupes réactifs X liés au silicium sont remplacés par des groupes hydroxyle (OH) provenant de l’eau adsorbée à la

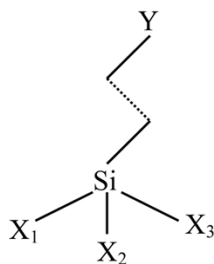


FIGURE 1.3: Schéma d'un alkylsilane, précurseur du siloxane chimisorbé.

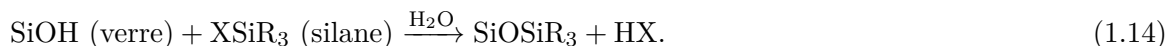
surface du verre [41]. Cette première étape d'activation correspond à une hydrolytation :



La condensation du groupe silanol (SiOH) résultant, avec un autre groupement silanol provenant de la surface de verre, produit la liaison siloxane. Cette seconde étape est schématisée ci-dessous par la réaction :



Le bilan correspond à la réaction de silylation qui s'écrit :



Cette réaction schématise la formation d'une liaison chimique entre une molécule d'alkylsilane et la surface de verre, valable dans tous les cas. Cependant, nous allons voir qu'en ce qui concerne la formation des monocouches, qui intègrent de nombreux monomères, plusieurs cas peuvent être distingués suivant la nature des groupes X ou Y (figure 1.3) qui composent ces monomères.

1.3.2 Influence des terminaisons Y et des groupes hydrolysables X liés au silicium

Cas de l'octadécyltrichlorosilane (OTS ; Y = CH₃, X₁ = X₂ = X₃ = Cl)

Les surfaces de verre modifiées par l'octadécyltrichlorosilane [OTS ; Cl₃Si(CH₂)₁₇CH₃] font partie des monocouches d'alkylsiloxanes auto-assemblées les plus étudiées [42, 75–78]. Plusieurs approches peuvent être envisagées pour le mécanisme de formation d'une telle monocouche [79]. L'une d'elles consiste à décomposer le processus en deux étapes. La première consiste en un processus de nucléation qui voit une molécule ou un groupe de molécules former une première liaison ou une première série de liaisons avec la surface de verre, suivant la réaction de silylation décrite plus haut. La seconde étape voit d'autres molécules s'assembler de proche en proche en formant des liaisons latérales (« cross-linking ») jusqu'à recouvrir entièrement la surface : c'est l'étape de propagation, schématisée ci-dessous (figure 1.4).

Dans le cas des chlorosilanes, la cinétique de réaction entraînant l'hydrolyse et la condensation des molécules en phase liquide s'effectue en un temps relativement court du fait de la haute réactivité des groupes chlorés [78]. À température ambiante, nous constatons le recouvrement complet de la surface de verre après ~15 min en solution, bien que le recouvrement total soit probablement atteint pour des temps de l'ordre de quelques dizaines de secondes, voire quelques secondes. Il est ainsi possible de « visualiser » le début de la phase de propagation (figure 1.5), en plongeant une lamelle de verre propre à température ambiante dans une solution de greffage contenant de l'OTS pendant un temps très court (< 1 sec). Par ailleurs, la formation d'îlots d'OTS, soit de noyaux de nucléation, est également observée dans différentes conditions de température, de durée en immersion ou de composition de la solution utilisée pour le greffage [79, 80].

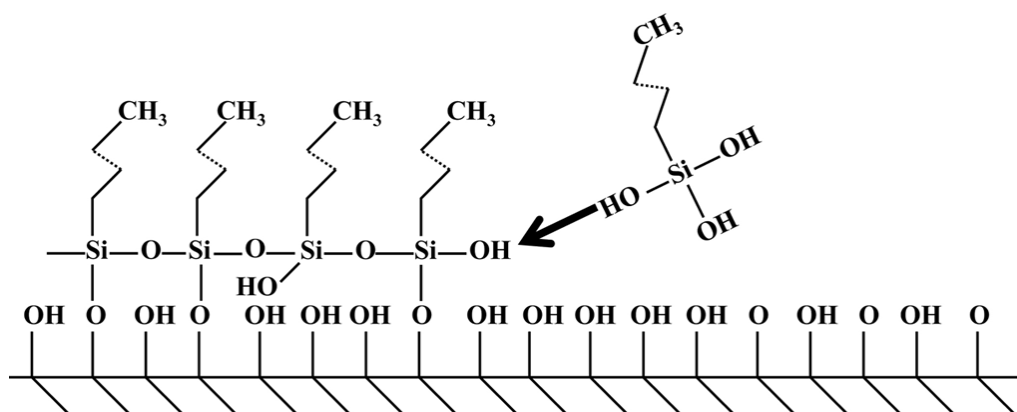


FIGURE 1.4: Propagation par « cross-linking » des monomères hydrolysés à la surface du verre.

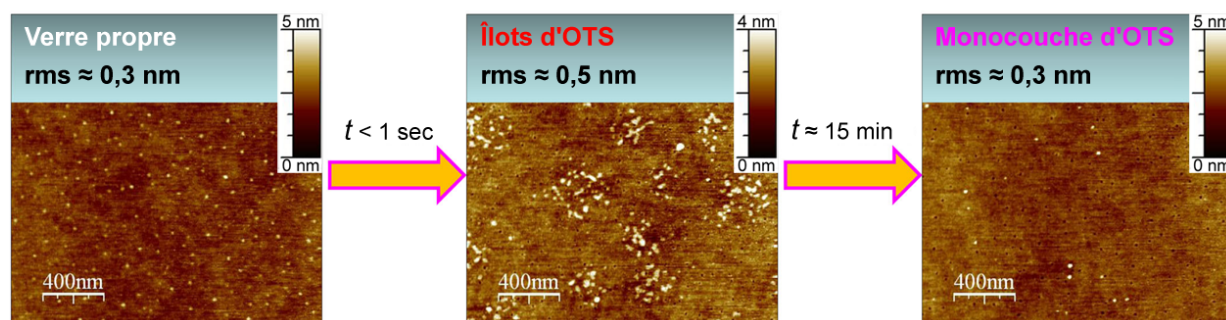


FIGURE 1.5: Propagation du recouvrement de la surface de verre par greffage d'OTS. Le rms est une mesure de la rugosité (nous y reviendrons en détail au chapitre 3, page 65).

Les images de la figure 1.5 ont été obtenues par l'analyse des surfaces au microscope à force atomique (cf. chapitre 3). L'image de gauche montre une surface de verre propre. Pour cette surface, les valeurs de rugosité constatées fluctuent aux alentours de 0,3 nm pour le rms (\leftrightarrow mesure de la rugosité, cf. section 3.3). L'image du centre montre des groupes d'îlots de nucléation régulièrement espacés de quelques centaines de nanomètres, composés de molécules d'OTS chimisorbées sur le verre. L'analyse de rugosité indique une valeur proche de 0,5 nm pour le rms, soit une valeur supérieure à celle du verre propre. Une fois la réaction de greffage terminée (image de droite), les molécules recouvrent entièrement la surface au sein de la monocouche auto-assemblée. Il n'est donc plus possible de distinguer des zones de molécules greffées de la surface de verre. La valeur du rms retombe donc aux alentours de 0,3 nm.

Triméthoxysilanes à terminaison méthyle ($Y = \text{CH}_3$, $X_1 = X_2 = X_3 = \text{OCH}_3$)

Les triméthoxysilanes ont un mode d'adsorption similaire à ceux des trichlorosilanes, à ceci près que l'hydrolyse des groupements méthoxy est beaucoup moins rapide que celle des groupes chlorés, ce qui permet un meilleur contrôle de l'adsorption [81–83]. Un greffage optimal nécessitera donc des temps en solution de l'ordre de l'heure, voire de la dizaine d'heures. Cette durée est plus ou moins variable du fait de la grande sensibilité de l'adsorption à des paramètres tels que la température, le solvant utilisé et la quantité d'eau contenue en solution [42, 76, 84–87]. Par ailleurs, l'adsorption des organosilanes ne s'effectue pas seulement par l'addition de monomères venant s'ajouter aux monomères préalablement chimisorbés, selon le processus illustré à la figure 1.4. Parallèlement, les monomères subissent une condensation « latérale » précédant l'adsorption au verre [88] (figure 1.6). Il est probable que l'importance relative des deux types de processus soit régie par des facteurs tels que la réactivité du groupe hydrolysable, la longueur de la chaîne latérale des monomères, ou encore la concentration en eau adsorbée à la surface du verre.

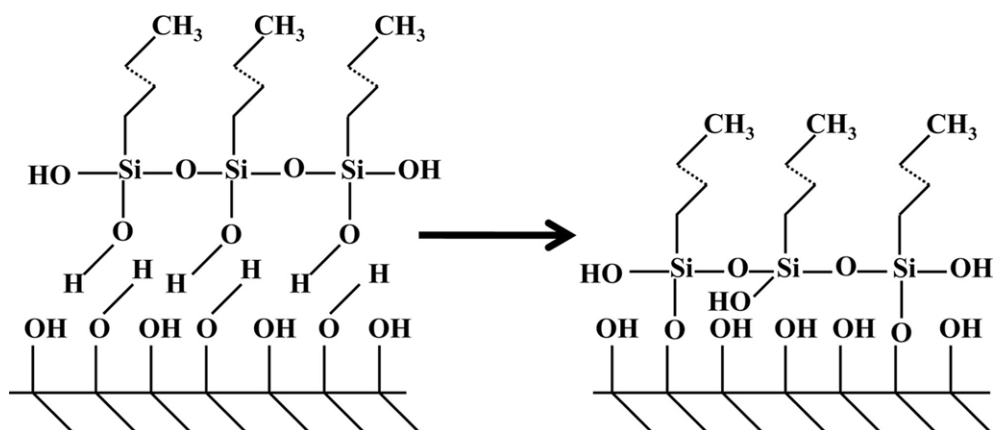


FIGURE 1.6: Mécanisme d'adsorption de monomères préalablement condensés.

Triméthoxysilanes à terminaison amine ($Y = \text{NH}_2$, $X_1 = X_2 = X_3 = \text{OCH}_3$)

Les aminosilanes possèdent, à la tête de leur chaîne carbonée, un groupe NH_2 , par nature beaucoup plus réactif qu'un groupe CH_3 : l'atome d'azote étant porteur d'un doublet d'électrons non-appariés, les liaisons hydrogène impliquant le groupe NH_2 sont beaucoup plus stables. En conséquence, les aminosilanes sont susceptibles de faire intervenir leur groupe amine dans le processus d'adsorption au verre [89]. La figure 1.7 illustre l'activation de la surface par assistance nucléophile et autocatalyse, théoriquement possible dans un milieu totalement anhydre, contrairement à toutes les réactions évoquées précédemment. Cette réaction est précédée de la physisorption d'au moins deux aminosilanes, par l'intermédiaire de liaisons hydrogène entre les groupes silanol (SiOH) de la surface et les terminaisons NH_2 des molécules [37].

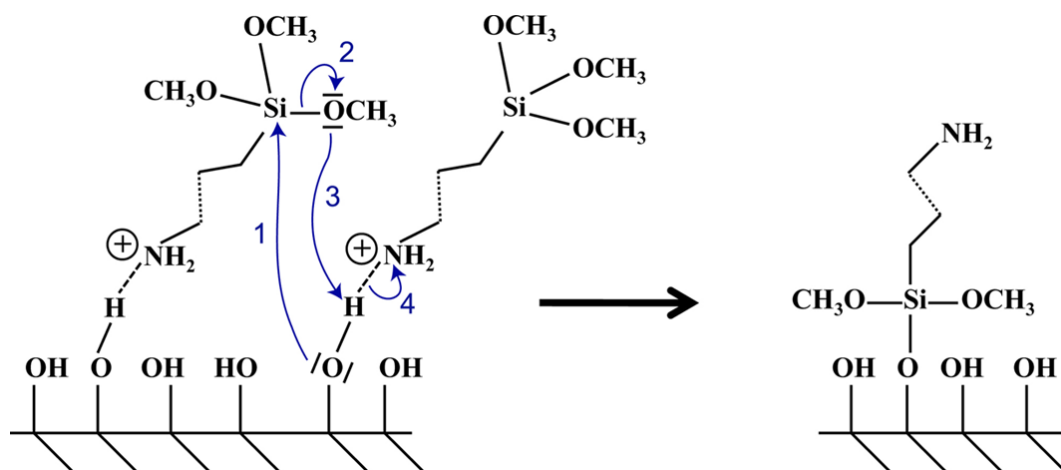


FIGURE 1.7: Mécanisme d'adsorption sur du verre d'un triméthoxysilane par autocatalyse. Cette réaction ne concerne que les aminosilanes.

Les aminosilanes présentent donc des caractéristiques particulières susceptibles d'influencer les mécanismes de greffage, par rapport aux méthylsilanes dont l'adsorption au verre est beaucoup plus facilement contrôlable, les réactions se déroulant toutes au niveau des groupes méthoxy. Ainsi, nous constaterons au cours du chapitre 4 que l'obtention d'une monocouche dont les terminaisons sont parfaitement ordonnées est aisée lorsqu'on manipule des méthylsilanes.

Au cours de cette étude, la chimisorption des aminosilanes sur des surfaces de silice sera toujours effectuée en présence de larges quantités d'eau dans la solution de greffage. En conséquence, plutôt que le phénomène d'autocatalyse illustré à la figure 1.7, le mode d'adsorption préférentiel des aminosilanes sera vraisemblablement similaire à celui présenté à la figure 1.6, où les phases d'hydrolyse et de condensation entre monomères précèdent l'adsorption. Quoiqu'il en soit, les pro-

cessus de polymérisation (i.e., de condensation *entre monomères*) de triméthoxysilanes restent les mêmes, qu'il s'agisse de molécules à terminaison NH_2 ou CH_3 . Ces processus ne peuvent avoir lieu qu'en présence d'eau [90] et sont plus efficaces en présence d'un catalyseur dans la solution de greffage (figure 1.8). Dans notre protocole, c'est l'acide acétique qui servira de catalyseur à l'hydrolyse des groupes méthoxy.

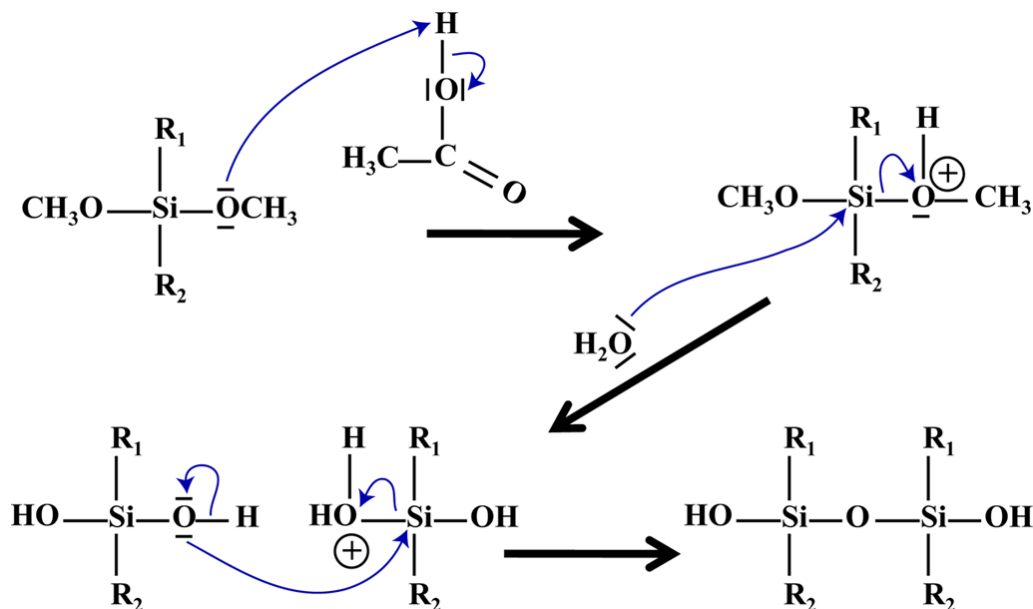


FIGURE 1.8: Détail des mécanismes de la réaction d'hydrolyse-condensation entre monomères de triméthoxysilanes.

Les descriptions sommaires présentées au cours de cette section nous ont permis d'aborder les principes sur lesquels se fondent les surfaces auto-assemblées, et donc les mécanismes suivant lesquels les monomères s'assemblent en phase liquide sur une surface de verre. Les techniques expérimentales de modification du verre mettant ces principes en œuvre font l'objet du chapitre suivant. Nous y décrirons de façon exhaustive toutes les molécules à terminaisons amine (NH_2 ou NH_3^+) ou méthyle (CH_3) employées dans ce but.

Chapitre 2

Surfaces de verre : techniques expérimentales de modification

Hormis quelques surfaces dont il sera fait mention au [chapitre 10](#) de cette thèse, le présent chapitre décrit de façon quasi-exhaustive toutes les surfaces auxquelles élaborées au cours de cette étude. Les molécules et les substrats destinées à la culture cellulaire y ont été regroupés à dessein dans deux tableaux distincts ([tableaux 2.1](#) et [2.2](#)), de façon à pouvoir s'y référer au fur et à mesure des analyses constituant les développements de ce travail. Essentiellement, les substrats fabriqués sont composés d'alkylsiloxanes greffés sur des surfaces de verre, dont nous avons décrits les différents modes d'adsorption au chapitre précédent (cf. [section 1.3](#)). Les groupes chimiques composant les terminaisons des alkylsiloxanes sont soit des groupes méthyle (CH_3), soit des groupes amine (NH_2). Nous évoquerons également l'adsorption sur du verre de biopolymères tels que la poly-L-lysine (PLL ; dotée d'une terminaison NH_3^+) et la poly-L-ornithine (PLO ; NH_2). La dernière section du chapitre sera consacrée à la présentation des différents types d'organisation surfacique que nous sommes sensés obtenir suivant les modes de greffage utilisés pour chaque type de molécule. L'ajustement de ces paramètres nous permettra de réaliser des monocouches parfaites ou des substrats à surfaces moyennement ou fortement désordonnées.

2.1 Molécules utilisées pour modifier les surfaces de verre

2.1.1 Molécules à terminaison méthyle (CH_3)

Les alkylsilanes présentés à la [figure 2.1](#) possèdent tous une terminaison méthyle (CH_3). Ces groupes méthyle étant très peu réactifs, les réactions de condensation, soit avec les groupes silanol de la surface de verre, soit entre monomères, auront lieu uniquement au niveau des groupes chlorés (Cl) ou méthoxy (OCH_3) des molécules. En outre, les différences structurales entre molécules vont se traduire par des propriétés de surface distinctes une fois les lamelles modifiées par ces molécules. Ainsi, on distingue deux catégories d'alkylsilanes suivant leur mécanisme de greffage sur une surface de verre :

- i. Le *monochlorosilane* ODS et le *monométhoxysilane* ODMS ne possédant qu'un unique groupe réactif (chlore ou méthoxy) lié à leurs atomes de silicium, ils ne peuvent par conséquent former qu'une seule liaison chimique, que ce soit avec la surface, ou avec une autre molécule de la même espèce afin de former un dimère. Dans ce dernier cas, le dimère sera « fermé » et ne pourra donc ni former d'autre liaison, ni se lier chimiquement à la surface.
- ii. Le *trichlorosilane* OTS et les *triméthoxysilanes* OTMS et HTMS correspondent aux cas étudiés au cours du [chapitre 1](#). Ils possèdent — comme leur nom l'indique — trois groupes susceptibles de réagir, permettant la formation de liaisons chimiques « latérales » entre les monomères, tout en gardant la possibilité de se lier chimiquement à la surface.

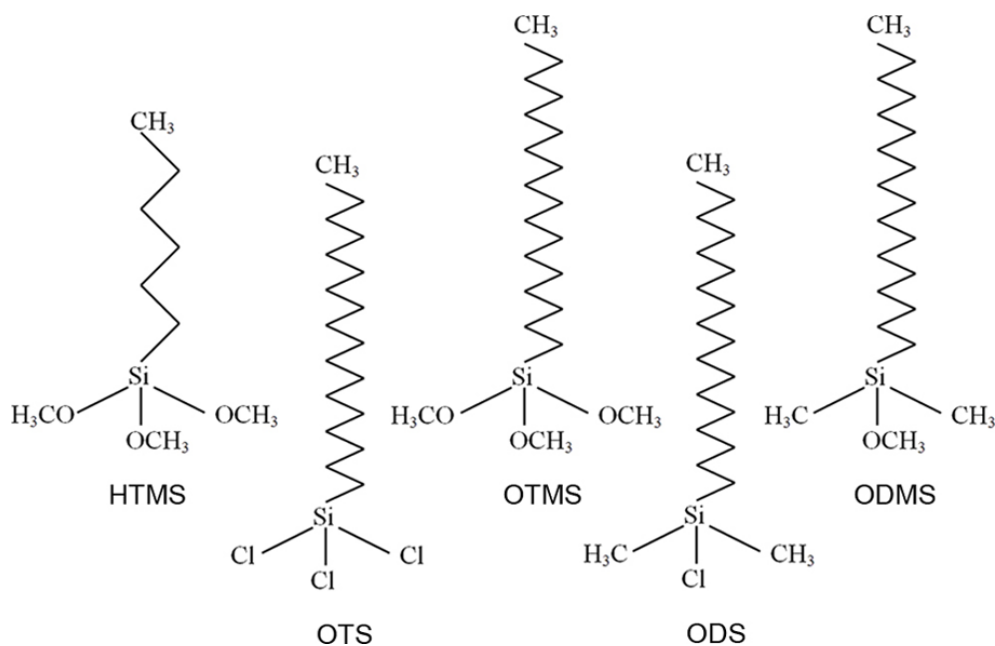


FIGURE 2.1: Schémas représentant les différents alkylsilanes à terminaison méthyle utilisés pour la modification des surfaces de verre propre.

Une classification alternative à la première consiste à distinguer les molécules suivant la longueur de leur chaîne carbonée, relativement courte pour l'HTMS (5 groupes CH_2 précédant la terminaison CH_3), et plus longue pour les quatre autres molécules (17 groupes CH_2 précédant la terminaison CH_3).

2.1.2 Molécules à terminaison amine (NH_2)

Aminosilanes

De même que pour les alkylsilanes à terminaison méthyle, les aminosilanes considérés (figure 2.2) se distinguent, d'une part, entre le monométhoxysilane ADMS et les triméthoxysilanes APTMS, EDA, DETA et PEDA, et d'autre part, suivant la longueur et les particularités chimiques propres à leur chaîne latérale. L'influence de tous ces paramètres sur les propriétés des surfaces de verre modifiées par ces molécules sera évaluée au chapitre 5. Il conviendra notamment de comparer :

- i. ADMS et APTMS, qui possèdent la même chaîne latérale.
- ii. APTMS, EDA et DETA, qui ne se distinguent que par la longueur de leur chaîne latérale, laquelle comporte, respectivement, une, deux, et trois amines en comptant l'amine terminale.
- iii. EDA et PEDA, qui bien que possédant chacun le même nombre d'amines, se distinguent par la longueur de leur chaîne latérale, dotée ou non d'un groupe phényle (cas du PEDA).

Biopolymères

Les biopolymères fournissent un très bon support d'adhésion non-spécifique aux cellules. C'est pourquoi ils sont couramment utilisés en biologie cellulaire, et en particulier en neurobiologie [91,92]. Pratiquement, les expérimentateurs les utilisent pour « couvrir » des surfaces de plastique tels que les boîtes de pétri pour la culture cellulaire, ou bien des lamelles de verre quand il s'agit, par exemple, de mener des expériences de fluorescence. Dans les deux cas, ces polymères (la poly-L-lysine, PLL et la poly-L-ornithine, PLO ; figure 2.3) sont utiles à deux égards :

- i. Ils s'adsorbent facilement sur le verre propre et sur certains plastiques [92,93].
- ii. Ils renforcent considérablement l'adhésion des cellules au substrat [5,94].

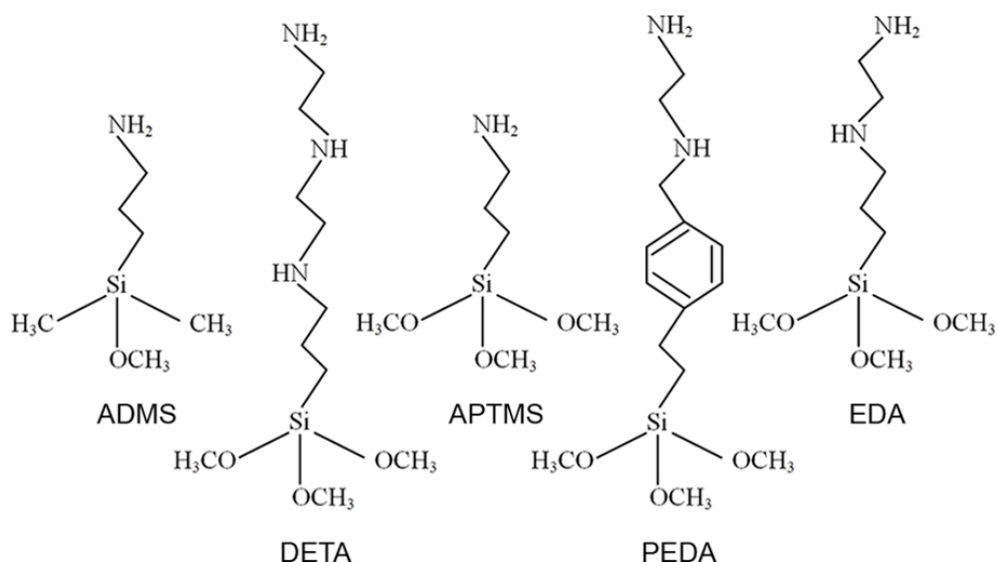


FIGURE 2.2: Schémas représentant les différents alkylsilanes à terminaison amine utilisés pour la modification des surfaces de verre propre.

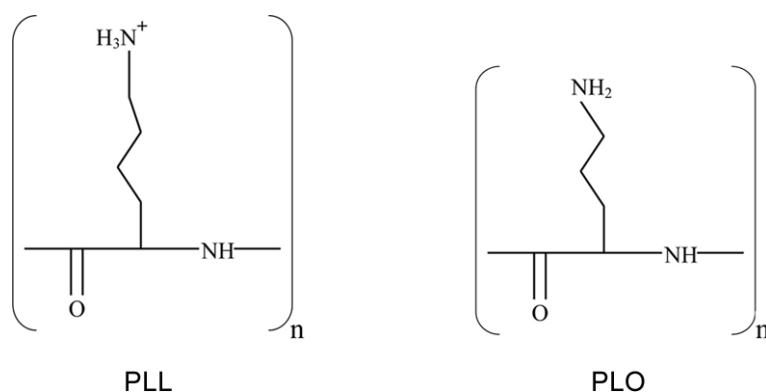


FIGURE 2.3: Schémas représentant la poly-L-lysine (PLL) et la poly-L-ornithine (PLO).

Les biopolymères PLL et PLO ne forment pas de liaison chimique covalente avec les substrats de verre ou de plastique. Les liaisons qui leur permettent d'adhérer sont de plus faible énergie : il s'agit de liaisons de van der Waals et de liaisons hydrogène, auxquelles s'ajoutent des liaisons électrostatiques dans le cas de la poly-L-lysine. La figure 2.4 schématise une possible conformation de la PLL sur une surface de verre propre. Ses propriétés lui permettent théoriquement de s'auto-assembler en formant un copolymère stabilisé par des interactions stériques entre ses chaînes latérales [95]. Une modélisation des interactions entre la PLL et le verre réalisée par WEST et coll. indique cependant que seul environ un acide aminé sur huit est effectivement en interaction rapprochée avec la surface, du fait de l'autorotation du squelette de la chaîne polypeptidique sur lui-même [96].

Il est raisonnable d'envisager le même mode d'adsorption que la PLL pour la PLO, au cours duquel une partie des chaînes latérales se fixe au substrat et une autre pointe vers l'extérieur. Cependant, la chaîne latérale de la poly-L-ornithine comportant un groupe CH₂ de moins que la PLL, son amine terminale n'est pas chargée positivement comme l'est celle de la PLL. Cette différence de charge entre les deux molécules entraîne une conséquence importante. Une fois la première couche de PLO adsorbée à la surface de verre, rien *a priori* n'exclue la possibilité de formation de multicouches physisorbées interagissant par liaisons hydrogène entre groupements amine. Par contre, la charge positive que comporte chaque monomère de PLL adsorbée interagit théoriquement de façon répulsive avec tout autre monomère de PLL en solution, lui aussi chargé positivement. Ainsi, la PLL, en s'adsorbant, va tendre à adopter le profil d'une monocouche moléculaire dont les propriétés de rugosité, de rigidité et de densité des terminaisons amine seront très

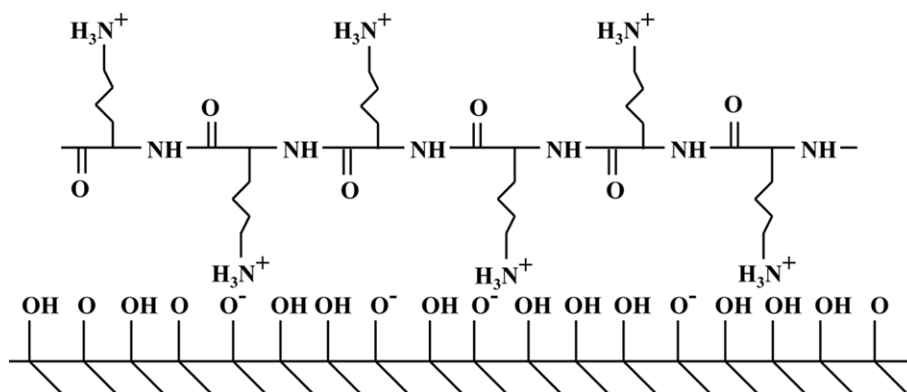


FIGURE 2.4: Schématisation de la poly-L-lysine physisorbée sur une surface de silice.

similaires à certaines monocouches auto-assemblées formées d'aminosilanes. Cela nous autorisera donc à comparer ces deux types de surfaces. Dans ce cadre, les biopolymères apparaissent comme susceptibles de fournir un contrôle reconnu. Nous montrerons au [chapitre 5](#) qu'il est possible de produire une surface présentant une grande densité de groupes amine en utilisant la poly-L-lysine. Cette faculté de la PLL doit notamment lui permettre de générer une distribution très homogène de l'énergie de surface.

2.1.3 Récapitulatif des molécules utilisées

Le [tableau 2.1](#) expose toutes les molécules dont il a déjà été fait mention précédemment de façon plus ou moins abrégée, et en introduit quelques nouvelles dont nous nous servons pour détailler les protocoles de modification de surface proprement dits.

2.2 Protocoles de préparation des substrats

2.2.1 Supports matériels destinés à la modification

Propriétés des lames et lamelles de verre utilisées

Le support fournissant la surface destinée à être modifiée par les molécules récapitulées dans le [tableau 2.1](#) est un solide amorphe : le verre borosilicaté (D263). Ce verre est essentiellement composé d'un mélange de dioxyde de silice (SiO_2 , $\sim 80\%$), d'oxyde de bore (B_2O_3 , $\sim 15\%$) et d'oxyde de sodium (Na_2O , $\sim 5\%$). Très dur (module de Young : $E \approx 72,9$ GPa), ce verre présente une résistance à des températures élevées (jusqu'à 529°C), ce qui lui permet de subir sans dommage le traitement au piranha (procédé de nettoyage, voir ci-après). La densité des groupes hydroxyle à la surface des substrats de silice amorphe est évaluée à environ 5 groupes OH par nm^2 [97].

Deux catégories de substrats de verre ont été employées, suivant le type d'expériences menées. Pour les manipulations suivantes : AFM, mesures d'angle de contact, et culture cellulaire, nous avons choisi d'utiliser des lamelles de verre rondes de 30 mm de diamètre et 100 μm d'épaisseur (Menzel-Glaser). Pour les analyses d'optique linéaire (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, IRTF) et non linéaire (génération de somme de fréquences, SFG), les substrats sont des lames de verre (Superfrost[®], $25 \times 75 \times 1$ mm³, Menzel-Glaser) que nous avons découpées dans le sens de la largeur à l'aide d'une pointe en diamant. Les lames, plus épaisses que les lamelles, présentent l'avantage d'être plus résistantes, et donc plus pratiques à transporter d'un laboratoire à un autre lorsque le matériel d'analyse adéquat ne se trouve pas sur place. En revanche, les lamelles sont plus adaptées à la culture cellulaire. Leur forme ronde s'adapte mieux à la forme également ronde des boîtes de pétri dans lesquelles elles sont disposées. En outre, leur fine épaisseur n'implique pas d'augmenter les volumes de milieu de culture qui doivent impérativement recouvrir la face supérieure des substrats. La mesure des rugosités, effectuée pour des régions d'environ

TABLEAU 2.1: Produits chimiques utilisés pour les modifications de surfaces.

Type/Utilisation	Molécule	Abrév.	Fabricant	Pureté (%)
Méthylsilane/ Greffage	n-Hexyltriméthoxysilane	HTMS	ABCR	97
	n-Octadécyltriméthoxysilane	OTMS	Acros Organics	95
	Octadécyldiméthyl- méthoxysilane	ODMS	ABCR	95
	n-Octadécyltrichlorosilane	OTS	Acros Organics	95
	Octadécyldiméthylchlorosilane	ODS	Sigma-Aldrich	95
Aminosilane/ Greffage	n-[3-Triméthoxysilyl]propyl]- éthylènediamine	EDA	Acros Organics	97
	[3-(Triméthoxysilyl)propyl]- diéthylènetriamine	DETA	Sigma-Aldrich	≥ 85
	3-Aminopropyl- triméthoxysilane	APTMS	Acros Organics	95
	3-Aminodiméthyl- méthoxysilane	ADMS	Acros Organics	97
	(Aminoéthylaminométhyl)- phényltriméthoxysilane	PEDA	ABCR	90
Biopolymère/ Greffage	Poly-L-Lysine	PLL	Sigma-Aldrich	0,01 ds H ₂ O
	Poly-L-Ornithine	PLO	Sigma-Aldrich	0,01 ds H ₂ O
Réactif/Nettoyage	Péroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich	40 (m/v ds H ₂ O)
	Acide sulfurique	H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich	95-97
Réactif/Catalyseur	Acide acétique	AA	Carlo Erba Reagents	99,9 (RPE)
Solvent/Solution de greffage et/ou Rinçage	Eau-ultrapure-déionisée (Elga UHQ PS MK3)	H ₂ O	Veolia-Water Systems	($\rho=18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$)*
	Hexanes (mixture d'isomères)	HX	Sigma-Aldrich	≥ 98,5 (ACS) [†]
	Méthanol	MET	Carlo Erba Reagents	> 99,9 (HPLC) [†]
	Chloroforme [‡]	CF	Carlo Erba Reagents	> 99,8 (ACS)
	n-Hexadécane	HD	Acros Organics	99

* La concentration en C.O.T (carbone organique total) est < 10 ppb.

[†] La quantité d'eau présente en solution avant ouverture est ≤ 0,01% (v/v).

[‡] Le chloroforme est également employé pour « dégraisser » le verre préalablement à l'étape « piranha ».

1 $\mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$, montre que les lames et les lamelles sont identiques de ce point de vue. Pour chacune d'elles, le verre idéalement nettoyé exhibe une valeur rms d'environ 0,3 nm (cf. figure 1.4 à propos du greffage d'OTS; cf. page 64 du chapitre 3 à propos du rms).

Protocole de nettoyage

La procédure de nettoyage des substrats de verre consiste en deux étapes successives [84] :

- i. La lamelle est placée dans un bécher rempli de chloroforme, lui-même placé dans un bain à ultrasons pendant une vingtaine de minutes. Ainsi une grande partie des contaminants superficiels est éliminée.
- ii. Après séchage sous une hotte à flux laminaire, la lamelle est introduite dans une solution corrosive, appelée « piranha », composée d'un mélange de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et d'acide sulfurique concentré (H₂SO₄) dans des proportions 1:3 (H₂O₂: H₂SO₄; v/v). Cette réaction est fortement exothermique et se révèle explosive en présence de composés organiques. Il est donc nécessaire de prendre toutes les précautions possibles lors de la manipulation (le port de lunettes protectrices, d'une blouse et de gants en nitrile ou latex est très fortement recommandé). Le piranha solubilise toutes les impuretés organiques adsorbées à la surface du verre, y compris tous les groupes adsorbés par des liaisons chimiques.

À ce stade, la surface du verre expose essentiellement des groupes silanol (SiOH). Précisons que les lames de verre, étant déjà « relativement » propres, se sont vues dispensées de l'étape de sonication précédant le passage des substrats au piranha, contrairement aux lamelles. Les substrats

de verre sont laissés dans le piranha pendant environ 30 min jusqu'à ce que la température de la solution redescende à une valeur proche de la température ambiante. Ensuite, les substrats propres sont rincés abondamment à l'eau ultrapure. Une manière simple de vérifier que le verre est propre est de constater que l'eau mouille parfaitement la surface. L'eau ayant une tension de surface de $72,8 \text{ mN m}^{-1}$, et le verre propre une tension de surface théoriquement supérieure à 150 mN m^{-1} [50,98], l'eau doit donc s'étaler complètement de façon à former un angle de contact nul, ceci en vertu du principe que « le plus énergétique est mouillé par le moins énergétique » (cf. chapitre 1). Par conséquent, une goutte d'eau qui aurait un angle de contact supérieur à zéro signifierait que la surface considérée a une énergie inférieure à $72,8 \text{ mN m}^{-1}$. Cela peut être dû à des contaminations lors de l'étape de rinçage, où il importe de manipuler le substrat à l'aide de pinces appropriées, si possible dotées d'un recouvrement en céramique ou en téflon. Dans ce cas, le substrat doit être soit jeté, soit nettoyé à nouveau.

2.2.2 Activation des surfaces

Chimisorption en solution

Une fois les substrats de verre nettoyés et rincés, ils sont immédiatement séchés sous un flux d'azote et immergés dans les solutions contenant les molécules destinées à les modifier. Le réceptacle contenant ces solutions sont des béchers ou flacons en verre ayant eux-aussi préalablement subi le traitement au piranha, de façon à éviter toute source de contamination possible. Les béchers sont ensuite scellés à l'aide d'un film de paraffine et/ou d'une feuille de papier aluminium, et laissés à température ambiante ($20\text{--}25^\circ\text{C}$) le temps nécessaire à l'adsorption. L'humidité relative était d'environ 50% dans la pièce où furent réalisés ces procédés de modification. Les traitements subis par les lames/lamelles de verre sont récapitulés ci-après (tableau 2.2). Nous avons choisi, par convention destinée à faciliter la lecture, de donner des noms aux substrats similaires à ceux des molécules qui leur ont donné naissance. Les noms des substrats sont notés en lettres minuscules, alors que les molécules seront toujours notées en lettres majuscules. Les abréviations employées font référence aux molécules dont les noms complets sont indiqués dans le tableau 2.1.

Dès que le temps imparti pour la phase d'adsorption est terminé, les substrats sont rincés avec les solvants bruts (et n'ayant pas fait l'objet de purification supplémentaire). Ils sont ensuite soit directement utilisés pour des manipulations, soit stockés dans des flacons en verre (cas des lames) ou dans des boîtes de pétri neuves et stériles (cas des lamelles), normalement utilisées pour la culture cellulaire (Falcon 350001, $\varnothing = 35 \text{ mm}$). Préalablement au stockage ou aux analyses, les substrats sont séchés sous un flux d'azote. Préalablement à la culture cellulaire, les substrats sont stérilisés à l'aide d'une solution de méthanol à 70% dans l'eau, puis disposés sous une hotte stérile à flux laminaire, de façon à les laisser sécher pendant une vingtaine de minutes.

Remarque : la modification du verre par *physisorption* de la PLL et de la PLO n'a pas été incluse dans le tableau 2.2 car elle ne nécessite aucune préparation préalable et/ou particulière. Les solutions aqueuses de biopolymères, fournies comme telles (et stériles), sont simplement étalées sur du verre propre pendant une à deux heures à température ambiante, et dans des conditions stériles si elles sont destinées à servir de substrat pour la culture cellulaire. Elles sont ensuite rincées dans une solution de PBS (« Phosphate Buffered Saline », tampon salin) et à l'eau, puis laissées à sécher sous une hotte stérile ou bien sous un flux d'azote.

Choix des solvants

Le tableau 2.2 expose les différents solvants utilisés pour la modification du verre. Le premier impératif dans le choix de ces solvants était de garantir un greffage relativement homogène sur toute la surface de verre considérée. Les solvants ont donc été sélectionnés de façon à ce que les molécules de greffage y soient solubles. Dans un solvant non-propice à la solubilisation, les

TABLEAU 2.2: Description des procédés de modification en phase liquide des substrats de verre. Les abréviations font référence aux molécules décrites dans le [tableau 2.1](#).

Substrat	Solution de greffage	Durée	Rinçage	Note(s)
ots	0,1% OTS + 20% CF + 80% HD	15 min	CF & MET	*
ods	0,1% ODS + 20% CF + 80% HD	15 min	CF & MET	*,†
otms	1% OTMS + 99% HX	4 h	HX & MET	
otms _x	1% OTMS + 99% HX	4 h	HX & MET	*
odms	1% ODMS + 99% HX	4 h	HX & MET	
odms _{x1}	1% ODMS + 99% HX	4 h	HX & MET	*
odms _{x2}	1% ODMS + 99% HX	~10 h	HX & MET	*
odms _{24h}	1% ODMS + 99% HX	>24 h	HX & MET	
htms _{M1}	2% HTMS + 94% MET + 4% H ₂ O + 1mM AA	~16 h	MET	
htms _{M2}	2% HTMS + 94% MET + 4% H ₂ O + 1mM AA	~24 h	MET	
htms _{M3}	2% HTMS + 94% MET + 4% H ₂ O + 1mM AA	>72 h	MET	
htms _H	1% HTMS + 99% HX	4 h	HX & MET	
htms _{Hx}	1% HTMS + 99% HX	4 h	HX & MET	*
peda	94% MET + 4% H ₂ O + 1mM AA + 2% PEDA	~24 h	MET	
deta	94% MET + 4% H ₂ O + 1mM AA + 2% DETA	~24 h	MET	
aptms	94% MET + 4% H ₂ O + 1mM AA + 2% APTMS	~24 h	MET	
adms	94% MET + 4% H ₂ O + 1mM AA + 2% ADMS	~24 h	MET	
eda	94% MET + 4% H ₂ O + 1mM AA + 2% EDA	~24 h	MET	
eda'	94% MET + 4% H ₂ O + 1mM AA + 2% EDA	~16 h	MET	
peda'	94% MET + 4% H ₂ O + 1mM AA + 2% PEDA	~16 h	MET	

* La solution est doucement agitée par un aimant tournant pendant toute la durée de l'adsorption.

† L'ODS est chauffé jusqu'à atteindre la phase liquide (à 28–30°C) juste avant d'être ajouté à la solution.

molécules précipitent, ce qui équivaut à une polymérisation incontrôlable. Cela ne peut convenir à nos manipulations, nécessitant un contrôle optimum du greffage.

La solubilité d'une molécule dans un solvant dépend principalement de deux facteurs : la polarisabilité et la taille des molécules, qui doivent être de dimension comparable entre solvant et soluté. C'est pourquoi une « petite » molécule polaire sera plus facilement soluble dans un solvant composé également de « petites » molécules polaires. Par exemple, une petite molécule polaire comme le méthanol (CH₃OH) est un bon solvant pour tous les aminosilanes considérés. Le méthanol est également capable de solubiliser une molécule, moins polaire mais de dimension réduite, telle que le HTMS [(OCH₃)₃Si(CH₂)₅CH₃], mais pas l'OTMS [(OCH₃)₃Si(CH₂)₁₇CH₃], aussi peu polaire que l'HTMS mais de dimension plus importante. À l'inverse, les hexanes non-polaires [CH₃(CH₂)₄CH₃] solubilisent à la fois le HTMS et l'OTMS, mais plus difficilement les composés polaires dotés d'une terminaison amine.

Impact du solvant sur le mode d'adsorption

L'hydrolyse nécessaire aux processus de greffage des silanes sur du verre ne nécessite qu'une infime quantité d'eau. Théoriquement, une seule molécule d'eau adsorbée à la surface du verre suffit à provoquer l'hydrolyse d'un groupe hydrolysable tel que le chlore (pour l'OTS ou l'ODS), car cette réaction est très favorable d'un point de vue énergétique. Les solvants tels que le n-hexadécane et les hexanes contiennent une très faible quantité d'eau (< 0,01%, *v/v*) et par ailleurs, sont très hydrophobes. Cela implique que les quelques molécules d'eau présentes en solution, qu'elles proviennent de l'atmosphère chargée d'humidité ou directement du solvant, vont avoir tendance à se concentrer dans une région très proche d'une surface hydrophile, comme le verre propre, si cette surface est placée dans un tel solvant. Cette concentration de l'eau permet l'occurrence des réactions d'hydrolyse nécessaires au greffage, tout en évitant que les molécules polymérisent en solution dans une région très éloignée du verre. Pour toutes ces raisons, le contrôle exercé pour un tel greffage est optimisé au maximum, et il est attendu que les surfaces générées dans de tels solvants seront des monocouches relativement ordonnées.

Cependant, nous pouvons aussi chercher à réduire ce contrôle afin d’obtenir une monocouche plus désordonnée, voire une multicouche [99], sans pour autant aller jusqu’à l’adsorption d’un précipité en solution. Pour ce faire, nous utilisons une solution de méthanol qui comprend de l’acide acétique et une quantité d’eau (4%) suffisante pour accélérer les phénomènes d’hydrolyse-condensation précédant l’adsorption sur le verre. Une molécule comme le HTMS, ou l’EDA, placée dans ces conditions, va polymériser de façon plus désordonnée que dans le cas où elle est placée dans une solution d’hexanes relativement anhydre. Ses groupes méthoxy sont rapidement hydrolysés. Les groupes silanol néoformés se condensent en liaisons siloxane, et c’est le polymère résultant qui va former des liaisons chimiques avec la surface de silice (cf. [figure 2.5](#)). Autrement dit, cela consiste à introduire une dose de « chaos contrôlé » qui va nous permettre de faire varier la distribution d’énergie de surface, à une échelle nanométrique, tout en gardant une distribution de l’énergie totale (toutes composantes comprises) homogène sur toute la surface.

L’agitation des solutions durant la phase d’adsorption a volontairement été mise à l’écart de la description, pourtant minutieuse, que nous avons fournie concernant les protocoles de modification de surface. Nous y reviendrons ultérieurement lorsque le contexte s’y prêtera de façon plus appropriée (cf. [chapitre 4](#)).

2.3 Organisation chimique attendue à l’échelle submicrométrique

Les illustrations schématiques présentées à la [figure 2.5](#) récapitulent les trois classes de monocouches auto-assemblées susceptibles d’être générées en fonction, soit du type de solvant utilisé, soit du type de molécule (taille et groupements chimiques liés au silicium). Ces trois classes se distinguent par une organisation surfacique propre, et donc par une distribution particulière des énergies de surface. Les terminaisons chimiques sont soit des groupes méthyle (CH_3), soit des groupes amine (NH_2). Pour plus de clarté, la [figure 2.5](#) ne fait état que du cas où les terminaisons sont des groupes méthyle.

2.3.1 Monocouches de classe 1

Très ordonnées, ces monocouches voient la plupart des monomères de silane qui les composent se lier latéralement, par le biais de liaisons siloxane. De plus, les chaînes carbonées des monomères sont toutes en conformation *trans* [100,101]. Cette conformation découle *a priori* de la stabilisation mutuelle de ces chaînes, notamment par des interactions de type van der Waals, et implique que les terminaisons chimiques situées aux extrémités des chaînes ont toutes la même orientation. Dans le cas où les monomères sont des aminosilanes tel le DETA, possédant des amines intermédiaires, il est possible d’imaginer que des liaisons hydrogène fassent également office de stabilisateur entre les chaînes carbonées [102]. Ces liaisons hydrogène hypothétiques seraient alors formées entre le doublet d’électrons non-liant (donneur) de l’azote d’une chaîne C1 et l’atome d’hydrogène (receveur) appartenant à la fonction amine d’une chaîne C2, proche voisine de C1.

Les monocouches de classe 1 se caractérisent donc par une distribution très homogène de l’énergie de surface. Cette énergie sera fonction de la terminaison des monomères, et non pas du verre, dans la mesure où une infime quantité de groupes silanol émergent à la surface. La densité de greffage obtenue pour ce type de surface, où l’adsorption est optimale, est estimée à une molécule pour $20\text{--}25 \text{ \AA}^2$ [103]. Ce chiffre correspond à la densité de groupes OH présents en surface du verre propre. En considérant un greffage optimal, et un volume de 100 μl des organosilanes utilisés, chaque solution contient suffisamment de molécules pour couvrir au minimum une surface de l’ordre de 50 m^2 de verre.

2.3.2 Monocouches de classe 2

Ces monocouches découlent de l’adsorption de *monométhoxysilane* — ou de *monochlorosilane* — sur du verre. Pour chaque monomère, il n’existe qu’une seule fonction hydrolysable, et donc

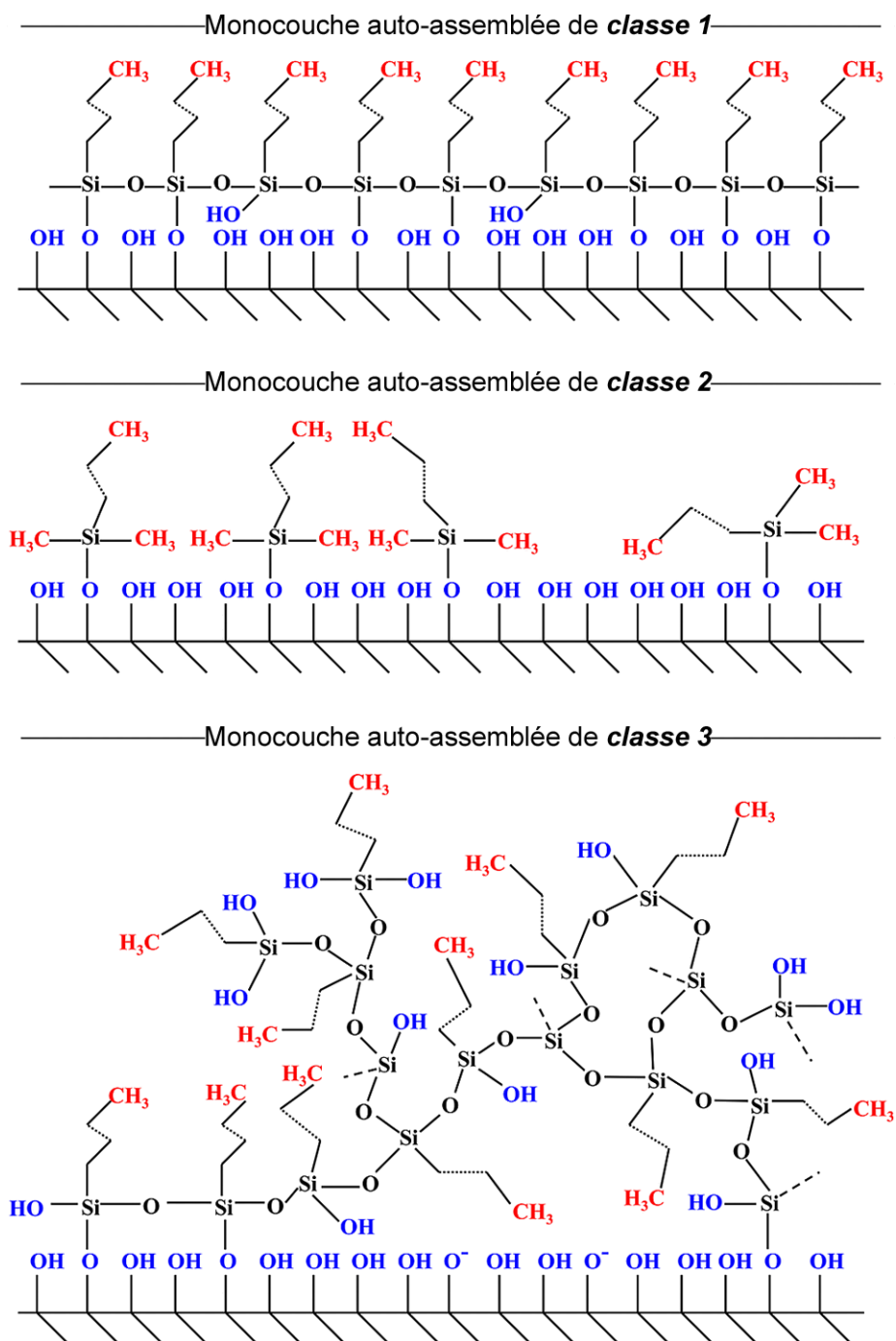


FIGURE 2.5: Illustrations schématiques décrivant les trois classes de substrats générés pour la culture cellulaire. Les films moléculaires générés sont très ordonnés (classe 1), modérément désordonnés (classe 2), et très désordonnés (classe 3).

qu'une seule possibilité de formation de liaison chimique. Ainsi, contrairement aux monocouches de classe 1, les monocouches de classe 2 ne peuvent former de liaisons latérales entre monomères. De ce fait, la densité surfacique de monomères greffés est moindre, et les molécules sont plus éloignées les unes des autres. Donc, les monomères sont *a priori* moins sujets aux phénomènes de stabilisation des chaînes latérales. En outre, le squelette carboné de la chaîne latérale est supposé adopter des conformations à la fois *cis* et *trans*. Nous supposons également que cette chaîne latérale est susceptible de « s'étaler » sur la surface, et par-là même de couvrir plusieurs sites d'adsorption potentiels de la surface de silice. Autre conséquence d'une densité réduite de monomères greffés : les monocouches de classe 2 sont composées d'une quantité significative de groupes silanol accessibles à la surface, comparativement aux monocouches de classe 1.

Pour toutes ces raisons, les monocouches de classe 2 semblent donc relativement désordonnées, et laissent apparaître la possibilité de gradients locaux dans la distribution des énergies de surface, et par conséquent dans les énergies d'adhésion. L'intensité de ces gradients sera fonction de la différence d'énergie entre celle engendrée par les groupes silanol exposés et celle engendrée par les terminaisons (CH_3 ou NH_2) des monomères composant la monocouche. Notons que l'impossibilité pour les molécules de se lier latéralement entraîne pour l'état de surface une ultime conséquence : la formation de multicouches, c'est-à-dire de monocouches se chevauchant sur plusieurs niveaux, est impossible. Ce phénomène est donc cette fois de nature à maintenir un ordre relatif durant le processus de greffage, en comparaison des monocouches de classe 3 discutées ci-dessous.

2.3.3 Monocouches de classe 3

Comme expliqué précédemment (en haut de la page 50, au sujet de l'impact du solvant), les monocouches de classe 3 résultent de la polymérisation chaotique d'un triméthoxysilane, suivant une complexation spécifique. Leur formation découle de la possibilité pour les monomères de se lier entre eux, non seulement de façon « latérale » (comme pour les monocouches de classe 1), mais aussi de façon « verticale ». Ainsi, il devient possible, pour un monomère donné, au sein d'un tel polymère, d'être lié chimiquement à trois autres monomères (figure 2.5). Nous parlerons d'ailleurs ici de « polymérisation verticale » pour décrire ce phénomène, comparativement aux monocouches de classe 1, pour lesquelles les termes de « polymérisation horizontale » peuvent être employés [104, 105].

Notons que la proportion de groupes OH exposés est supposée être la plus importante parmi les trois classes considérées. En accord avec le schéma présenté à la figure 2.5, ces groupes OH non liés proviennent à la fois de la surface du verre, et des terminaisons des monomères après hydrolyse des groupes méthoxy. La spécificité des monocouches de classe 3 consiste donc en une hétérogénéité chimique accrue aux échelles submicrométriques, et le processus d'adsorption de ces monocouches n'exclue pas l'apparition de multicouches.

2.3.4 Conclusions

L'objectif visé par les procédés d'élaboration susmentionnés consiste à faire graduellement varier la compacité des terminaisons des molécules greffées. Ainsi, nous souhaitons contrôler la qualité des surfaces obtenues de pures (CH_3 ou NH_2), à graduellement mixtes (CH_3/OH ou NH_2/OH). Notons que pour les surfaces méthyle, cela se traduit par des surfaces purement apolaires (CH_3) ou graduellement mixtes apolaires/polaires (CH_3/OH).

Au regard de la structure intrinsèque des molécules et des solvants utilisées, il était attendu que les monocouches de classe 1 seraient générés par l'OTS et l'OTMS. Les monocouches de classe 2 seraient quant à elles générées par l'ODS, l'ODMS, ou l'ADMS. L'adsorption d'HTMS devrait *a priori* conduire à, soit des monocouches de classe 1, soit des monocouches de classe 3 suivant le type de solvant (anhydre ou non). Les aminosilanes EDA, PEDTA, APTMS et DETA devraient, théoriquement, tous conduire à la formation de monocouches de classe 3. Enfin, les biopolymères PLL et PLO sont supposés être en mesure de simuler des monocouches silanisées de classe 1, bien que leur mode d'adsorption sur du verre (physisorption) diffère de ces dernières (chimisorption). Nous verrons au cours des chapitres 4 et 5 dans quelle mesure ces prédictions se révèlent plus ou moins exactes. Pour ce faire, nous analyserons en détail les propriétés particulières de chaque classe de monocouche, et tenterons d'assigner chacun des substrats élaborés à chacune de ces classes de monocouches. Avant d'aborder ces différents sujets, il nous faut décrire les techniques nous permettant d'effectuer cette caractérisation. Ce point fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 3

Matériels et méthodes d'analyses des substrats

Différentes techniques ont été employées afin de caractériser la surface des substrats élaborés. Nous pouvons les regrouper dans trois catégories : les techniques optiques, les techniques de mouillage, et les analyses topographiques réalisées à l'aide du microscope à force atomique (AFM). Les techniques optiques sont l'infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) [106], et la génération de somme de fréquence (SFG) [107]. L'IRTF fournit des informations de nature quantitative sur le matériel adsorbé au verre. La SFG est basée sur des processus d'optique non-linéaire et permet de ce fait une caractérisation des surfaces à la fois quantitative et qualitative sur le degré d'organisation des monocouches. Les techniques de mouillage consistent à mesurer les angles de contact statiques (d'équilibre, d'avancée et de recul) de gouttes de liquides sur les surfaces solides des substrats. Elles permettent, entre autres, la détermination des composantes polaires et dispersives de l'énergie de surface [108] et la détermination de l'énergie critique de surface [109]. L'AFM [110] apporte des informations sur la rugosité et la morphologie des surfaces étudiées. Notons que la caractérisation de monocouches peut également s'effectuer par des techniques autres que celles employées ici, telles que l'ellipsométrie [111] ou la diffractométrie de rayons X [112].

3.1 Spectroscopies optiques

3.1.1 Optique linéaire : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

L'IRTF est une technique suffisamment connue pour qu'il ne soit pas nécessaire de faire ici un rappel détaillé de toutes les circonvolutions théoriques qui la caractérisent. Contentons-nous donc de quelques rappels et descriptions utiles à son utilisation présente, à savoir la caractérisation des substrats dont nous avons détaillé les procédures de préparation au chapitre précédent.

L'IRTF consiste à envoyer un faisceau laser infrarouge, d'une section d'environ 300 μm , à travers une lame de verre modifiée, avec une incidence normale par rapport à la lame. L'examen de la lumière transmise indique la quantité d'énergie absorbée à chaque longueur d'onde. L'utilisation par l'instrument de la transformée de Fourier permet de mesurer toutes les longueurs d'onde simultanément. Il est alors possible de produire le spectre en absorbance et d'indiquer les longueurs d'onde d'absorption. Ces dernières sont caractéristiques de la structure moléculaire de l'échantillon. L'intensité des pics du spectre est également fonction de l'absorption, et donc de la quantité de molécules présentes sur la lame. L'IRTF est donc utilisé ici en tant que mesure quantitative du matériel moléculaire adsorbé sur nos surfaces de verres. Le spectromètre utilisé est un Bruker Optics TENSOR 27 équipé d'un détecteur DGTS. La région du spectre qui nous intéresse est située exclusivement entre 2800 et 3000 cm^{-1} . Cette région comprend les modes de vibration suivants : élongation symétrique du groupe CH_2 ($\text{CH}_2\text{-sy}$; $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$), élongation an-

tisymétrique du groupe CH_2 ($\text{CH}_2\text{-as}$; $\sim 2920 \text{ cm}^{-1}$) et élongation antisymétrique du groupe CH_3 ($\text{CH}_3\text{-as}$; $\sim 2955 \text{ cm}^{-1}$). Le bruit de fond des spectres infrarouges des lames modifiées est corrigé par soustraction du spectre d'une lame de verre propre et enregistré par l'intégration de 200 scans d'une résolution de 4 cm^{-1} .

3.1.2 Optique non-linéaire : génération de somme de fréquences (SFG)

Bases théoriques

La spectroscopie SFG (« Sum-Frequency Generation ») est, au contraire de l'IRTF, peu conventionnelle, et de ce fait mérite une attention plus particulière sur ses fondements théoriques. La SFG est une spectroscopie vibrationnelle de surface basée sur un processus non-linéaire du second ordre. Dans ce processus, deux rayons laser de fréquences ω_1 et ω_2 se chevauchent sur la surface (figure 3.1) et génèrent une réponse cohérente dont la fréquence est la somme des deux rayons laser incidents ($\omega_{\text{SFG}} = \omega_1 + \omega_2$). Dans l'approximation dipolaire électrique, les processus non-linéaires du second-ordre, y compris la SFG, sont impossibles dans un milieu doté d'une symétrie centrale, tel qu'un cristal.

En revanche, ces processus sont possibles aux interfaces, puisque la symétrie centrale y est nécessairement brisée. Par conséquent, en sélectionnant un des rayons incidents dans la région infrarouge du spectre ($\omega_1 = \omega_{\text{IR}}$) et l'autre dans la région du visible ($\omega_2 = \omega_{\text{Vis}}$), la SFG peut se révéler très puissante dans l'optique de mesurer des spectres vibrationnels spécifiques à une surface donnée [113].

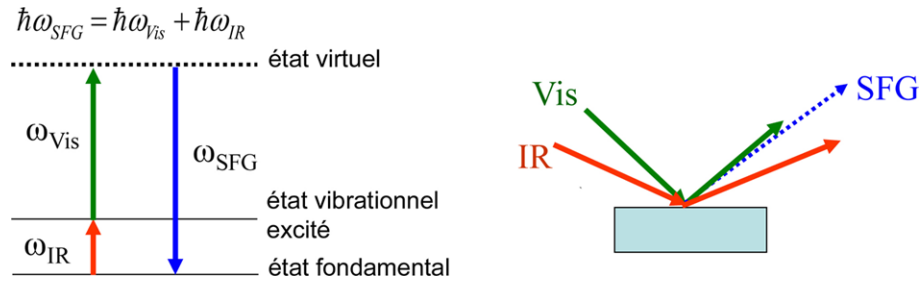


FIGURE 3.1: Principe de la spectroscopie SFG (Génération de Somme de Fréquences). La SFG résulte de l'addition des fréquences (i.e. des énergies) produites par les rayonnements visible (Vis) et infrarouge (IR).

L'intensité du rayonnement de la fréquence somme est proportionnelle à la susceptibilité magnétique efficace du second ordre de la surface et aux intensités des rayonnements visible et infrarouge selon la relation :

$$I_{\text{SFG}} \propto |\chi_{\text{eff}}^{(2)}|^2 I_{\text{IR}} I_{\text{Vis}}. \quad (3.1)$$

La susceptibilité magnétique efficace est elle-même la somme de deux termes, l'un résonnant, l'autre non-résonnant, suivant :

$$\chi_{\text{eff}}^{(2)} = \chi_{\text{R}}^{(2)} + \chi_{\text{NR}}^{(2)}. \quad (3.2)$$

Enfin, le terme de susceptibilité résonnant pour chaque raie du spectre SFG fait état de la spécificité moléculaire propre à chacune des raies suivant la relation :

$$\chi_{\text{R}}^{(2)} \propto \left| \sum_n \frac{A_n}{\omega_{\text{IR}} - \omega_n + i\Gamma} \right|^2 \quad (3.3)$$

où ω_{IR} est la fréquence ajustable du rayon infrarouge, ω_n est la fréquence de résonance de chaque

raie du spectre, Γ la largeur de la raie considérée, et A_n le produit des moments de transition infrarouge et Raman. En effet, pour être « active » en SFG, une vibration moléculaire spécifique doit être à la fois active en infrarouge et en Raman. Le rayon incident dont la longueur d'onde est située dans l'infrarouge déclenche la réponse IR de la surface, tandis que le rayon incident « visible » excite les modes de vibration actifs en Raman.

Exemple d'utilisation de la SFG et de ses performances vis-à-vis de l'IRTF

Considérons une surface de verre modifiée par une monocouche très homogène de groupes octadécylsilane (cas du substrat « ots », cf. chapitres 1 et 2). Une représentation de la conformation spatiale de cette monocouche et des modes de vibration des groupes chimiques qui la composent est présentée ci-dessous (figure 3.2).

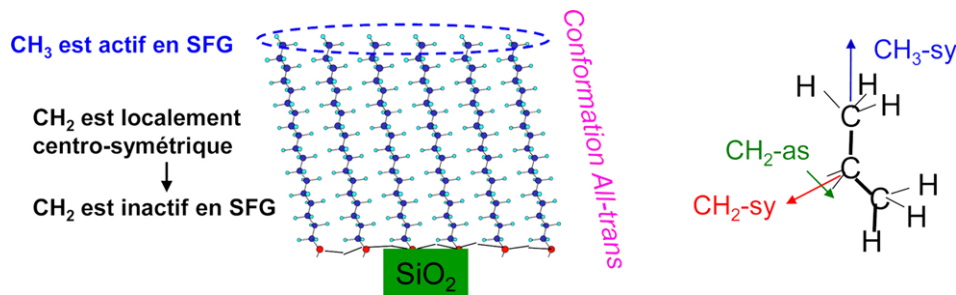


FIGURE 3.2: Illustration des modes de vibration actifs et non-actifs en SFG. Sont représentés, sur le schéma de droite, les vibrations d'élongation symétriques CH₂-sy et CH₃-sy, et la vibration d'élongation antisymétrique CH₂-as.

Comme indiqué sur la figure 3.2, les groupes CH₂, bien qu'actifs en IRTF, sont inactifs en SFG. En revanche, les groupes CH₃ sont actifs à la fois en IRTF et SFG, ce qui se traduit par l'allure des spectres suivants (figure 3.3) :

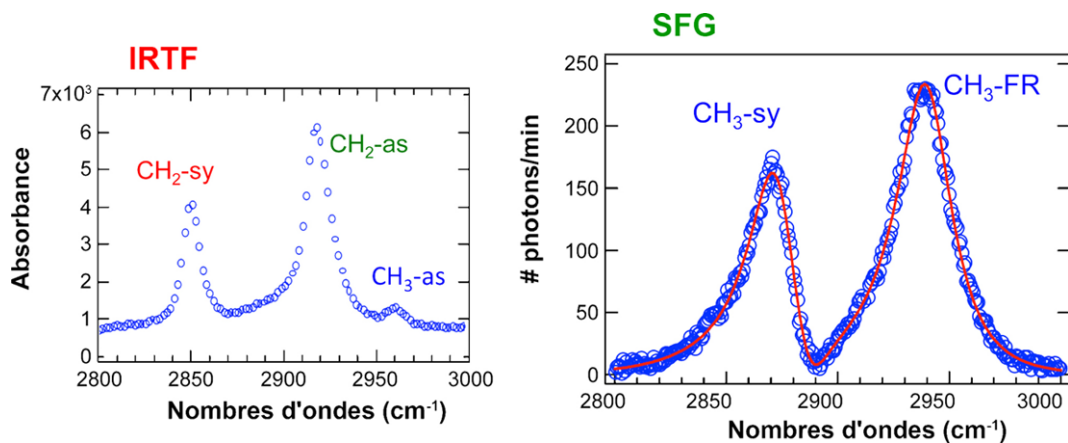


FIGURE 3.3: Comparatif des spectres IRTF et SFG obtenus pour le même substrat d'ots. Les vibrations d'élongation des groupes CH₂ n'apparaissent qu'en IRTF, alors que la SFG fournit des informations beaucoup plus complètes sur l'organisation en surface des groupes CH₃ (pics CH₃-sy et CH₃-FR, invisibles en IRTF).

Ces spectres montrent clairement la spécificité surfacique propre à la spectroscopie SFG. La raie du spectre SFG située vers 2940 cm^{-1} correspond à la résonance de Fermi du groupement méthyle. Cette résonance découle vraisemblablement du couplage entre le mode de vibration d'élongation symétrique et une harmonique du mode de vibration de cisaillement, qui ont des niveaux d'énergie proches [101, 114].

Dispositif expérimental

Les détails afférents au protocole utilisé pour produire la SFG sont disponibles dans la référence [115]. Brièvement, des rayons pulsés IR et visible, d'énergies respectives 15 et 2 μJ , d'angles d'incidence respectifs 72° et 65° par rapport à la surface, sont focalisés en faisceaux de tailles respectives 250 et 200 μm . Le rayonnement SFG est détecté par un capteur photographique CDD (« Charge-Coupled Device », ou dispositif à transfert de charge ; Princeton Instruments) couplé à un spectrographe (300i, Acton Research Corp.).

Au sein d'un rayon lumineux approchant une surface, la polarisation s de la lumière est perpendiculaire au plan d'incidence, et la polarisation p est contenue dans ce plan, si bien que la polarisation s n'a en fait qu'une composante parallèle à la surface, tandis que la polarisation p possède à la fois une composante normale et une autre parallèle à la surface (figure 3.4).

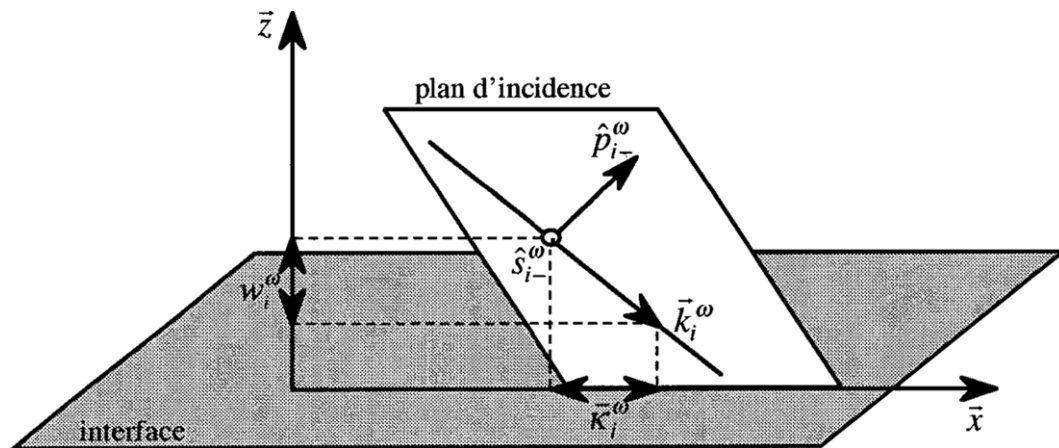


FIGURE 3.4: Polarisations et vecteur d'onde d'une onde incidente sur une surface (extrait de la Réf. [116]). La polarisation p est contenue dans le plan d'incidence (\vec{p}, \vec{k}) , tandis que la polarisation s est perpendiculaire à ce plan.

La polarisation des rayons visible et SFG est contrôlée par une combinaison de polariseurs et de demi-lames à retard (i.e. un outil optique capable de modifier la polarisation de la lumière la traversant ; contrairement à un polariseur, l'état de polarisation de la lumière à la sortie de la lame dépend de l'état à l'entrée). Dans les expériences que nous présenterons au chapitre 4, la combinaison de polarisation des rayons SFG, visible, et IR est soit s,s,p, soit p,p,p.

3.2 Expériences de mouillage

3.2.1 Rappels théoriques

La mesure des angles de contact est fréquemment utilisée pour évaluer les effets de traitements de surface développés soit dans l'industrie, soit dans la recherche fondamentale, comme c'est le cas ici. Les angles de contact sont très utiles lorsqu'il s'agit d'évaluer les propriétés macroscopiques des surfaces, telles que l'énergie de surface [117], ou la mouillabilité [118]. À l'origine de ces propriétés macroscopiques, se trouvent des caractéristiques à l'échelle nanométrique de l'état de surface telle que la nanorugosité [119], la distribution des terminaisons chimiques [120], ou bien le type d'interactions non-spécifiques produites par la surface (notamment les composantes polaires et dispersives de l'énergie de surface [108]). Ainsi, il est possible de « remonter » vers ce type de propriétés très localisées tout en pratiquant des mesures à une échelle plus grande.

Une goutte de liquide pur sur une surface rigide et relativement lisse est sujette à des forces qui la contraignent à adopter une certaine forme. Les forces adhésives entre le liquide et le substrat favorisent l'étalement de la goutte, tandis que les forces cohésives au sein du liquide contrebalancent

l'étalement. Cette contrainte entre les forces adhésives et cohésives est décrite par l'équation de Young [121], qui met en relation l'angle de contact θ (figure 3.5) avec les énergies interfaciales γ d'un système contenant à la fois les phases solide (S), liquide (L) et vapeur (V) selon :

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_{LV} \cos \theta, \quad (3.4)$$

où γ_{SV} est l'énergie libre de la surface solide, γ_{LV} est l'énergie libre de la surface liquide, et γ_{SL} est l'énergie libre de l'interface solide-liquide. L'énergie de surface est aussi très souvent dénommée par le terme équivalent de « tension de surface ». Elle équivaut à une énergie d'adhésion. L'angle de contact est mesuré à l'interface des trois phases solide/liquide/vapeur, également appelée « ligne triple ».

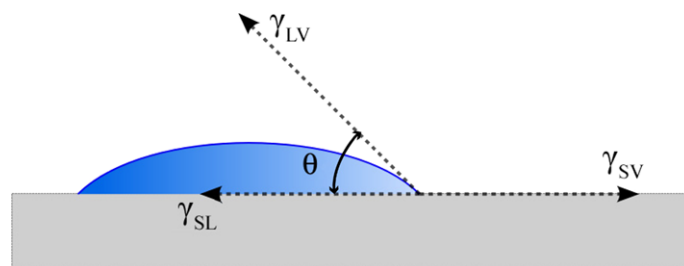


FIGURE 3.5: Illustration de la relation entre l'angle de contact θ et les tensions interfaciales solide-liquide (γ_{SL}), solide-vapeur (γ_{SV}) et liquide-vapeur (γ_{LV}).

La relation de Young induit plusieurs types de phénomènes suivant les valeurs respectives des énergies considérées. Prenons le cas où les forces adhésives dominent les forces cohésives ($\gamma_{SV} > \gamma_{LV}$), si bien que la goutte s'étale complètement et l'angle de contact devient nul. C'est par exemple le cas de l'eau pure sur une surface de verre propre, déjà évoqué, et qui physiquement signifie la formation d'une monocouche moléculaire s'étalant à l'infini d'un bord à l'autre de la surface. Inversement, si la relation $\gamma_{SV} < \gamma_{LV}$ est vérifiée, l'angle de contact sera non nul. On distingue alors deux cas. Soit le substrat est considéré comme « mouillant » ($\theta < 90^\circ$), cas des substrats ayant une énergie de surface relativement élevée, soit le substrat est considéré comme « non-mouillant » ($\theta > 90^\circ$), cas des substrats ayant une énergie de surface relativement faible, comme le téflon ($\sim 18 \text{ mN m}^{-1}$). Si le liquide considéré est l'eau, ces deux types de substrat sont respectivement qualifiés d'« hydrophile » et d'« hydrophobe ». Un exemple de surface hydrophobe est le substrat modèle OTS, qui voit l'eau former un angle de contact d'environ 110° sur sa surface [75]. Cette mesure permet de vérifier la qualité de la surface. Si l'angle formé est inférieur à 110° , cela signifie ou bien que la monocouche d'alkylsiloxanes n'est pas correctement assemblée, ou bien que la surface est contaminée. Cette contamination de la surface peut éventuellement se propager au liquide. L'eau pure est ainsi susceptible d'être rapidement et facilement contaminée par des polluants extérieurs, comme des poussières de particules organiques, et dans ce cas sa tension de surface diminue, résultant en une diminution de l'angle de contact.

3.2.2 Mesures d'angles de contact

Les appareils habituellement utilisés pour mesurer des angles de contacts s'appellent des goniomètres. Ces appareils, dont le coût n'est pas négligeable, mesurent les angles avec une grande précision grâce à des systèmes permettant un grand nombre de mesures automatiques ($\sim 50\text{--}100$) sur une seule goutte [122]. Le procédé de mesure étant relativement simple, nous avons élaboré et construit notre propre appareillage, dont le développement a par ailleurs donné lieu à la rédaction d'un article, en cours de publication dans la revue *Journal of Chemical Education* (cf. annexe E). Nous dévoilons ici les principes d'assemblage et d'utilisation de notre appareil.

Montage de l'appareil

Toutes les parties du dispositif sont fixées sur une table optique (figure 3.6). Le support du substrat est quant à lui monté sur un système de translation (\vec{x} , \vec{y}) de façon à pouvoir, d'une part, ajuster le focus en permanence une fois la goutte déposée sur le substrat (translation suivant \vec{x}), et d'autre part, analyser plusieurs gouttes successivement (translation suivant \vec{y}). Une lentille de distance focale 50 mm est située entre l'objectif de la caméra et la goutte. Une lampe commerciale de puissance comprise entre 50 et 200W est positionnée derrière le dispositif de façon à faire apparaître la goutte en noir sur un fond clair. Cette disposition est nécessaire à la précision de la mesure, aussi bien qu'au processus de traitement de l'image de la goutte permettant la détermination de l'angle de contact. La goutte de liquide ne doit pas réfléchir de lumière parasite qui pourrait perturber la mesure. À cet effet, les expériences doivent être conduites en l'absence de lumière, hormis celle provenant de la lampe.

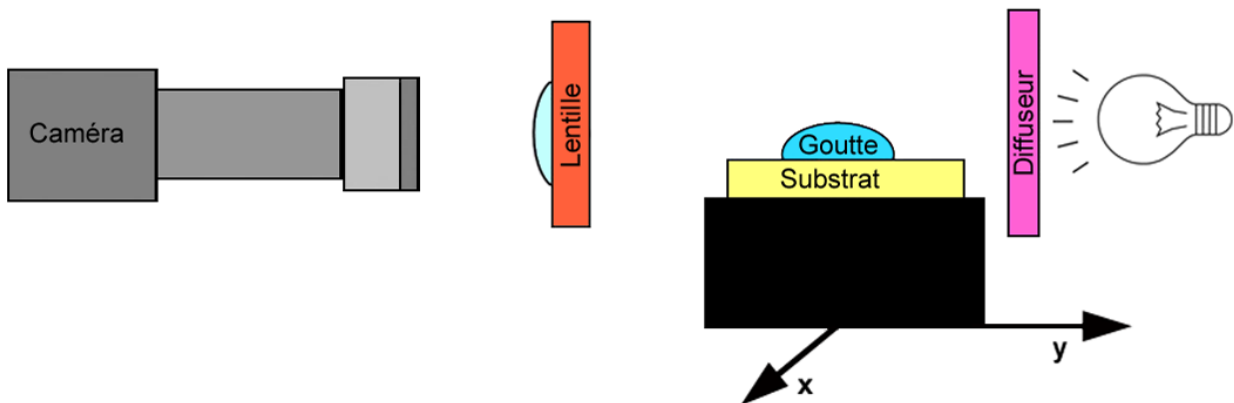
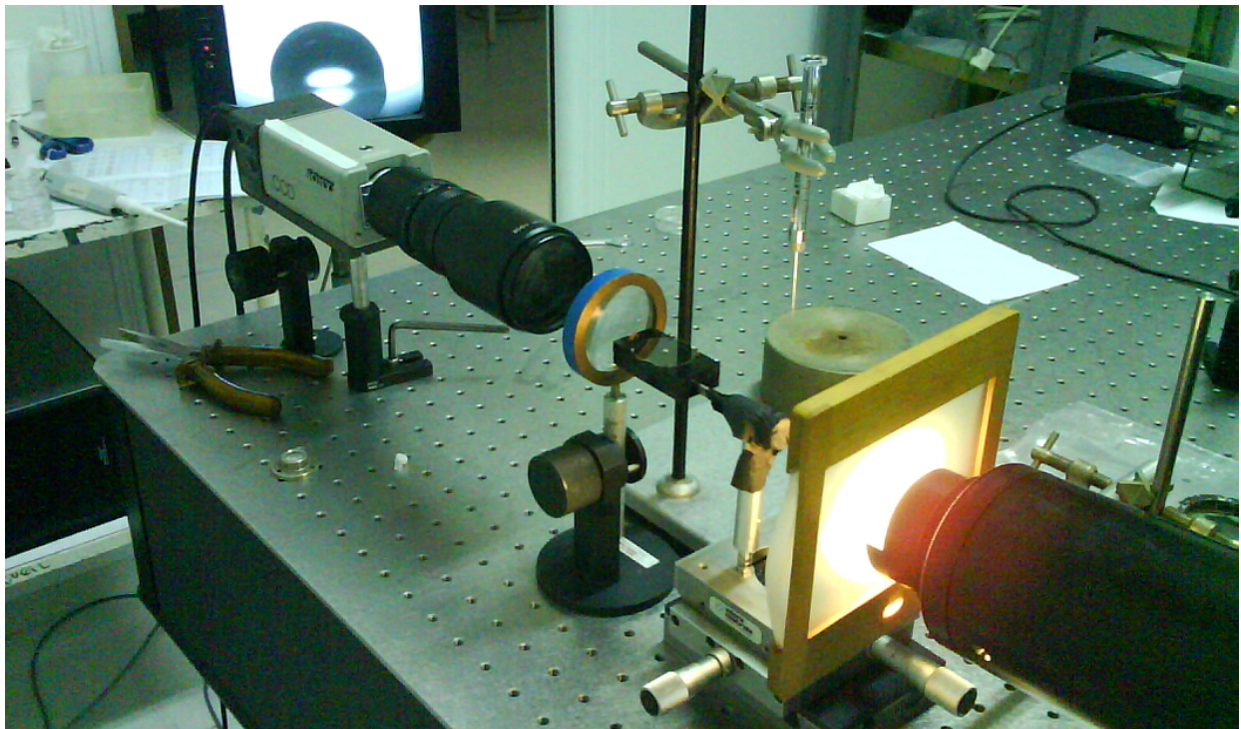


FIGURE 3.6: Photo et schéma du dispositif expérimental utilisé pour mesurer les angles de contact. L'arrière-plan diffus derrière la goutte est obtenu grâce à un filtre composé de papier calque, positionné entre la goutte et le système d'éclairage. La goutte est visualisée en direct, ce qui permet un ajustement immédiat du focus (suivant \vec{y}) à l'aide du système de translation. La translation suivant \vec{x} permet de photographier à la suite plusieurs gouttes situées côte-à-côte. La seringue positionnée au-dessus du dispositif permet la détermination des angles statiques d'avancée et de recul (cf. figure 3.8).

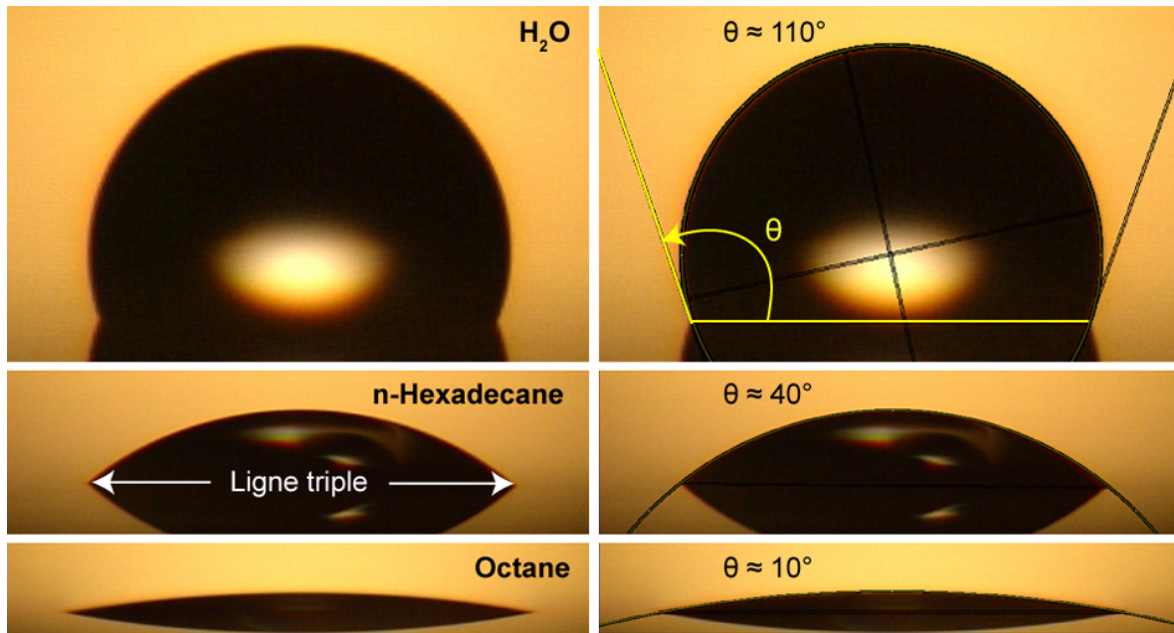


FIGURE 3.7: Angles de contact θ de différents liquides tests en contact avec le substrat ots. Les images de droite montrent les fits réalisés par le logiciel ImageJ sur les profils des gouttes.

L'élément le plus critique au regard de la précision de la mesure est l'éclairage de la goutte. Le fond clair généré doit être suffisamment homogène pour que l'image soit ensuite traitée correctement. Un filtre diffuseur de lumière tel qu'une simple feuille de papier calque placée entre la lampe et la goutte permet l'homogénéisation de l'arrière-plan. En outre, la hauteur de la caméra doit être ajustée de manière à permettre l'observation de la goutte et son image réfléchiée dans le substrat de verre. La ligne triple à l'interface solide/liquide/vapeur devient alors aisément observable (figure 3.7), sous la forme de deux points situés de chaque côté du profil de la goutte.

Mesure de l'angle de contact statique à l'équilibre

Des gouttes de volume compris entre 3,5 et 5 μl sont déposées sur les substrats (préalablement nettoyés par immersion dans un bain de méthanol ou de chloroforme, puis séchés sous flux d'azote ou à l'air libre) à l'aide d'une micropipette de 10 μl . Le volume d'une goutte ne doit pas dépasser 5 μl , valeur en-dessous de laquelle la gravité n'exerce aucune influence sur la sphéricité du profil de la goutte [123]. L'ajustement du focus et la photographie de la goutte sont effectuées dans les dix secondes suivant le dépôt de la goutte. Cette manipulation permet d'éviter son évaporation et sa contamination éventuelle suite à l'absorption de poussières environnantes.

L'image du profil d'une goutte est prise à l'aide d'une caméra vidéo CCD (Sony DXC-101P). L'image est ensuite traitée par le logiciel gratuit ImageJ (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD) en utilisant la macro « Contact Angle » (Marco Brugnara, Université de Trento, Italie). La macro dessine le cercle ajusté au profil de la goutte et calcule ensuite l'angle de contact associé à ce cercle. À titre de contrôle, la précision du « fit » effectué par la macro sur une seule image a été évaluée pour plusieurs gouttes en contact avec le substrat modèle ots (cf. tableau 3.1).

Le traitement opéré par la macro est stable et renvoie des valeurs sensiblement proches, que la même goutte soit analysée un petit ou un grand nombre de fois. Ainsi la différence entre les angles maximaux et minimaux mesurés par le programme n'excède pas $\Delta = 2,5^\circ$, excepté pour les gouttes dont l'angle de contact est proche de 90° (cas du formamide sur l'ots : $\Delta = 3,6^\circ$). Ce degré de précision sur l'analyse d'une goutte est comparable avec celui obtenu par des goniomètres conventionnels disponibles dans le commerce [122]. De plus les valeurs des angles, obtenues ici dans le cas de l'ots, sont en bon accord avec les valeurs relevées dans la littérature pour le même substrat et les mêmes liquides, notamment l'eau et le n-hexadécane [75–77].

TABLEAU 3.1: Évaluation de la précision du « fit » du profil de la goutte par ImageJ. La macro « Contact Angle », intégrée à ImageJ, effectue un fit qui varie peu pour une image donnée. Les variations les plus élevées sont relevées pour les angles de contact avoisinant les 90° .

Liquide (γ , $mN\ m^{-1}$)	Eau (72,80)	Formamide (58,20)	n-Hexadécane (27,47)	n-Undécane (24,66)	n-Octane (21,62)
θ_- , <i>deg</i> , valeur min.	109,6	88,6	39,4	26,5	9,4
$\bar{\theta}$, <i>deg</i> , moy.* \pm éc. type	110,2 \pm 0,4	90,3 \pm 0,8	40,7 \pm 0,6	27,3 \pm 0,4	9,8 \pm 0,4
θ_+ , <i>deg</i> , valeur max.	111,3	92,2	41,8	27,9	10,8
$\Delta = \theta_+ - \theta_-$, <i>deg</i>	1,7	3,6	2,4	1,4	1,4

* La moyenne $\bar{\theta}$ est effectuée sur un minimum de 20 traitements (\leftrightarrow 20 fits) pour une seule image.

Pour des substrats plus hétérogènes que l’ots, l’angle de contact est susceptible de varier de façon plus prononcée, même si la surface et le liquide considérés sont parfaitement propres. Il est donc requis d’opérer l’analyse de plusieurs gouttes (au moins 3) afin d’obtenir une précision raisonnable sur une mesure d’angle. La moyenne des angles mesurés pour toutes ces gouttes définit l’angle de contact d’un liquide spécifique sur un substrat particulier. De plus, l’écart-type de la valeur de l’angle peut être sensiblement plus élevée que l’incertitude sur l’analyse d’une seule goutte, reportée dans le [tableau 3.1](#). Dans ces conditions, une seule analyse par image est suffisante, à la condition que le « fit » du profil de la goutte considérée semble avoir été correctement effectué.

Mesure des angles de contact statiques d’avancée et de recul

La mesure de l’hystérèse, représentant l’intervalle $[\theta_A, \theta_R]$ entre angles statiques d’avancée (θ_A) et de recul (θ_R), permet d’évaluer des propriétés de surface telles que la rugosité, la porosité des monocouches ou leur hétérogénéité chimique [118, 124]. L’origine de l’hystérèse se situe dans l’existence de puits de potentiels énergétiques locaux, au sein desquels une partie de la goutte de liquide peut se retrouver piégée. La goutte adopte alors différents états métastables correspondant à des états de surface pour lesquels l’angle de contact diffère de l’angle statique d’équilibre au niveau macroscopique [125]. Il est possible de forcer l’apparition de ces états métastables en exerçant une force sur la goutte, de façon à ce que l’angle de contact soit gouverné par les propriétés locales du solide au niveau de la ligne de contact [126]. Ce procédé est utilisé lorsque l’angle d’avancée est mesuré sur une surface non-mouillée au préalable. La ligne triple d’un liquide comme l’eau va par exemple « buter » sur d’éventuels patches hydrophobes présents à la surface, si bien que l’angle d’avancée peut devenir supérieur à l’angle statique observé à l’équilibre pour la même surface. L’angle de recul est quant à lui toujours inférieur à l’angle d’avancée. Cela s’explique par le fait qu’une surface mouillée est susceptible de retenir des molécules du liquide, et donc d’augmenter les forces adhésives entre le liquide et le substrat, une fois ce dernier préalablement mouillé. L’eau, qui est une petite molécule, est capable de diffuser au sein d’une monocouche hydrocarbonée adsorbée sur du verre [126], comme celles présentées dans cette étude. L’angle de recul est donc d’autant plus faible que la monocouche est hydrophile. En revanche, une molécule de dimension plus importante telle que le diiodométhane s’intercalerait plus difficilement entre les chaînes carbonées de la monocouche, et verrait donc son angle de recul avoir une valeur proche de son angle d’avancée sur le même substrat.

Le dispositif de mesure d’angle de contact est équipé d’une seringue de contenance 50 μl ([figure 3.6](#)). Cette seringue est emplie d’eau ultrapure, que nous utilisons pour mesurer θ_A et θ_R sur un substrat. Pour ce faire, une goutte de volume compris entre 5 et 10 μl y est déposée à l’aide de la seringue, munie d’un tube capillaire ($\varnothing \approx 1\ \text{mm}$) à son extrémité. Le tube reste en contact permanent avec la goutte. L’acquisition du film de la goutte par la caméra est alors déclenchée. La goutte est progressivement gonflée en appuyant sur le pressoir de la seringue, jusqu’à ce que la ligne de contact (là où l’angle de contact est mesuré) « décroche ». Le film est ensuite analysé image par image. L’image qui précède immédiatement le décrochage est sélectionnée puis analysée de la même manière que l’angle de contact statique d’équilibre ([figure 3.8](#)). Elle révèle un angle

de contact supérieur à ce dernier : l'angle d'avancée θ_A . Pour l'angle de recul θ_R , on effectue la manipulation inverse, consistant à aspirer la goutte à travers le tube capillaire de la seringue. Dans ce cas, on part d'une goutte de volume plus important ($\sim 30 \mu\text{l}$), de façon à minimiser l'effet perturbateur de la seringue. Le profil de la goutte est ainsi maintenu suffisamment sphérique aux abords de l'interface solide-liquide, ce qui évite d'avoir à mesurer l'angle de contact manuellement. On suppose que les effets d'aplatissement dus à la gravité restent négligeables pour ce type de manipulation, comme en atteste le profil de la goutte d'eau aspirée sur une surface d'*adms*, sphérique de la ligne de contact jusqu'à la seringue :

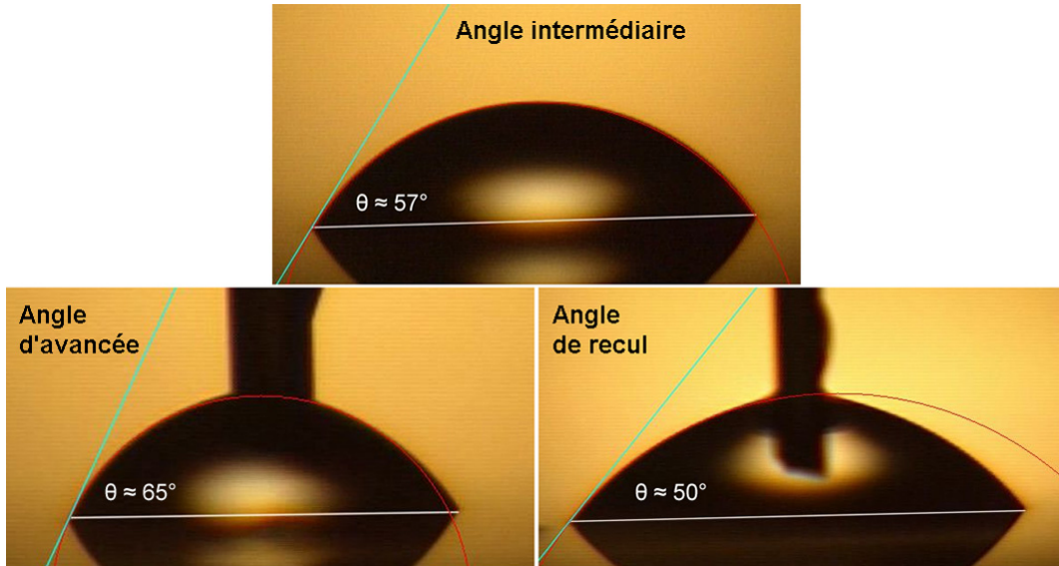


FIGURE 3.8: Mesure des angles statiques d'équilibre, d'avancée et de recul de l'eau sur le substrat *adms*. Le liquide est repoussé sur la surface par une seringue afin de mesurer l'angle d'avancée, et il est aspiré pour mesurer l'angle de recul.

Les angles de contact présentés ci-dessus ont été mesurés à l'aide du logiciel « Contact Angle », logiciel libre conçu et développé par Alexandre TEIXEIRA, étudiant ingénieur à l'école centrale d'électronique de Paris (ECE), lors de son stage au sein du laboratoire. Ce logiciel permet l'analyse du profil des gouttes malgré la présence de la seringue sur l'image, impossible pour ImageJ à moins d'effacer manuellement la seringue par un traitement d'image. Le logiciel permet aussi l'analyse des angles statiques d'équilibre (figure 3.8), mais se révèle plus difficilement utilisable pour certains angles, notamment ceux dont la valeur avoisine les 90° . Nous avons donc limité l'utilisation de Contact Angle à la détermination des angles d'avancée et de recul, et utilisé ImageJ pour la détermination de tous les angles de contact à l'équilibre. Cependant, Contact Angle a parfois été utilisé pour contrôler des valeurs d'angles intermédiaires, lorsque nous avons un doute sur la qualité du fit réalisé par ImageJ.

3.2.3 Détermination des énergies de surface

Calcul des composantes polaires et dispersives de l'énergie de surface

Comme indiqué au chapitre 1, l'énergie libre de surface d'un solide ou d'un liquide peut se décomposer en deux composantes distinctes :

- i. La composante dispersive γ^d , qui équivaut à des interactions non-spécifiques à longue portée ($< 100 \text{ nm}$) de type Lifshitz–van der Waals.
- ii. La composante polaire γ^p , équivalente à des interactions non-spécifiques à courte portée ($\sim 3 \text{ \AA}$) de type acide-base de Lewis, ou liaison hydrogène par exemple.

TABLEAU 3.2: Tension de surface (γ_L ; mN m^{-1}) de quelques liquides (adapté de la Réf. [127]). γ_L^d est la composante dispersive de la tension superficielle des liquides considérés, tandis que γ_L^p en est la composante polaire.

Liquide	Abrév.	γ_L	γ_L^d	γ_L^p	Fabricant	Pureté (%)
Eau	H ₂ O	72,8	21,8	51	cf. tableau 2.1	
Glycérol	GL	64	34	30	Acros Organics	≥99
Formamide	FA	58	39	19	Fisher Scientific	≥99,5
Diiodométhane	MI	50,8	50,8	~0	Acros Organics	≥99,5
α -Bromonaphthalène	BN	44,4	44,4	~0	Acros Organics	>96
n-Hexadécane	HD	27,47	27,47	~0	Acros Organics	99
Tétradécane	TD	26,56	26,56	~0	Sigma-Aldrich	≥99
n-Dodécane	DD	25,35	25,35	~0	Fisher Scientific	>98
n-Undécane	UD	24,66	24,66	~0	Acros Organics	99
n-Octane	OC	21,62	21,62	~0	Acros Organics	95

Le modèle Owens–Wendt [108] permet de déterminer ces deux composantes pour une surface solide suivant la relation :

$$W_{sL} = (1 + \cos \theta) \gamma_L = 2\sqrt{\gamma_s^d \gamma_L^d} + 2\sqrt{\gamma_s^p \gamma_L^p} \quad (3.5)$$

où γ_s est l'énergie libre de la surface du solide, γ_L est l'énergie libre de surface du liquide, et W_{sL} le travail nécessaire à la création d'une interface solide-liquide, autrement dit son énergie associée. Deux liquides sont utilisés en tant que sondes pour la détermination des composantes de l'énergie libre de surface. Les angles de contact statiques à l'équilibre des deux liquides sont injectés tour-à-tour dans l'équation 3.5, de même que les tensions superficielles associées aux liquides ([tableau 3.2](#)). Il en résulte une combinaison linéaire de deux équations, dont la résolution fournit les valeurs de γ_s^p et γ_s^d du substrat considéré.

La combinaison des liquides est spécifique à chaque catégorie de substrat. Elle est essentiellement fonction du type de terminaisons chimiques de la monocouche analysée. Pour les substrats à terminaison méthyle, nous utilisons la combinaison (H₂O, n-hexadécane) qui paraît plutôt bien adaptée, puisque dans ce cas précis, les groupes exposés seront soit des groupes (CH₂)_nCH₃, soit des groupes hydroxyle (OH). Pour les substrats à terminaison amine, plusieurs combinaisons ont fait l'objet de tests. Nous examinerons au [chapitre 5](#) les différentes possibilités impliquant l'eau, le formamide, le diiodométhane et l' α -bromonaphthalène.

En guise d'exemple, nous présentons le détail du calcul effectué pour déterminer les composantes énergétiques polaires et dispersives du substrat ots. Les énergies W_1 et W_2 associées à la création des interfaces ots/H₂O et ots/HD sont, d'après l'équation 3.5, respectivement :

$$W_1 = (1 + \cos 110,2^\circ) \times 72,8 = 2\sqrt{\gamma_s^d \times 21,8} + 2\sqrt{\gamma_s^p \times 51} \approx 47,7 \text{ mN m}^{-1}, \text{ et}, \quad (3.6)$$

$$W_2 = (1 + \cos 40,7^\circ) \times 27,47 = 2\sqrt{\gamma_s^d \times 27,47} + 2\sqrt{\gamma_s^p \times 0} \approx 48,3 \text{ mN m}^{-1}. \quad (3.7)$$

On a donc :

$$3.7 \implies \gamma_s^d \approx \left(\frac{48,3}{2\sqrt{27,47}} \right)^2 \approx 21,2 \text{ mN m}^{-1}, \text{ et}, \quad (3.8)$$

$$3.6 \text{ et } 3.8 \implies \gamma_s^p \approx \left(\frac{47,7 - 2\sqrt{21,2} \times \sqrt{21,8}}{2\sqrt{51}} \right)^2 \approx 0,1 \text{ mN m}^{-1}. \quad (3.9)$$

Comme prévu, le substrat ots, composé d'une monocouche très dense et ordonnée de terminaisons méthyle hydrophobes et apolaires, expose une contribution polaire quasiment nulle.

Énergie critique de surface

L'énergie critique empirique γ_c correspond au point de mouillage total, c'est-à-dire à la tension en-dessous de laquelle tout liquide ayant une tension de surface inférieure à γ_c s'étale infiniment sur le substrat. Par convention, les termes de « surface de basse énergie » sont généralement employés pour décrire tous les substrats ayant un γ_c inférieur à environ 50 mN m^{-1} , ce qui est le cas de toutes les monocouches organiques auto-assemblées sur du verre ou de l'or [128]. Pour les autres surfaces, tel le verre propre, où $\gamma_c \geq 150 \text{ mN m}^{-1}$ [50, 98], on parle inversement de surface de haute énergie [128].

Dans notre travail, les valeurs de γ_c sont calculées à l'aide de l'approximation de Fox–Zisman [109] en traçant ce qu'il est coutume d'appeler des « Zisman plots », représentant le cosinus des angles de contact d'une série de liquides analogues sur un substrat en fonction de la tension de surface de ces mêmes liquides. Pour des valeurs de tension de surface γ des liquides proches de la valeur de la tension critique du substrat ($\gamma > \gamma_c$), l'approximation de Fox–Zisman peut être comprise comme l'approximation au premier ordre de l'équation de Good–Girifalco [129]. Dès lors, $\cos \theta$ est tracé en fonction de $\gamma^{\frac{1}{2}}$, selon l'équation suivante :

$$\cos \theta = -1 + 2 \left(\frac{\gamma_c}{\gamma} \right)^{\frac{1}{2}}. \quad (3.10)$$

Une approximation linéaire de cette équation au voisinage de γ_c entraîne :

$$\cos \theta \approx 1 - \left(\frac{\gamma - \gamma_c}{\gamma} \right), \quad (3.11)$$

impliquant $\cos \theta \simeq 1 \iff \gamma \simeq \gamma_c$. Cette relation est illustrée à la figure 3.9. L'énergie critique de surface γ_c est ainsi définie par l'intersection de la ligne horizontale d'équation $\cos \theta = 1$ avec la droite représentant $\cos \theta = f(\gamma)$, obtenue par régression linéaire des données obtenues pour chacun des liquides tests.

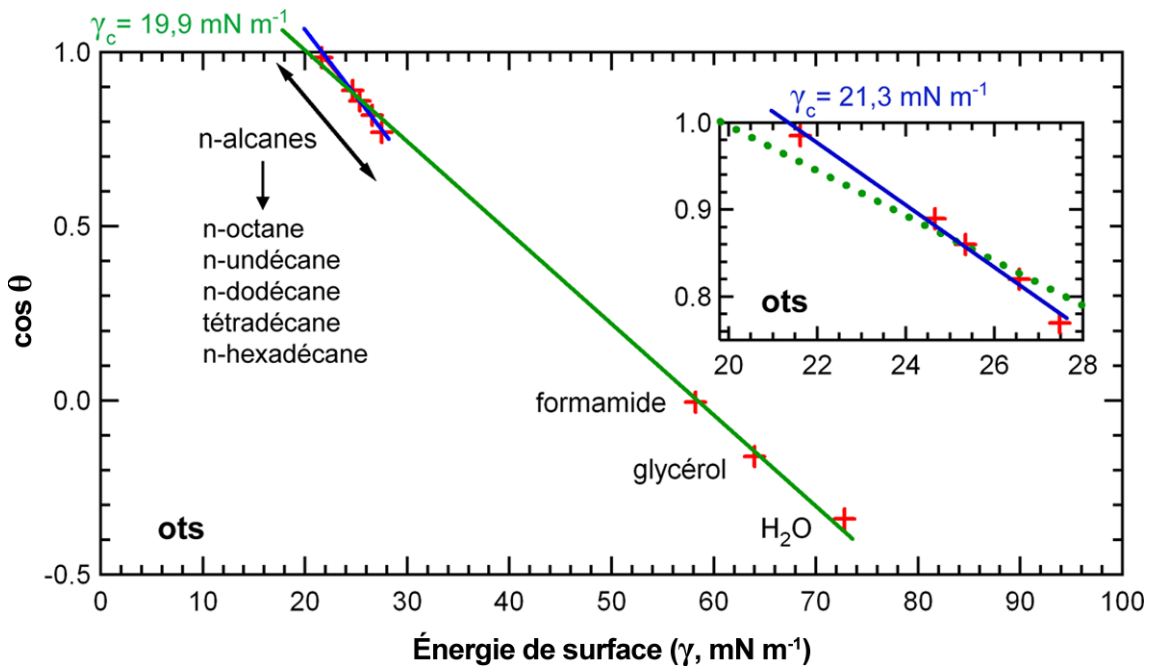


FIGURE 3.9: Exemple de Zisman plot pour le substrat ots, permettant la détermination de son énergie critique de surface. γ_c est lu à l'intersection des fits linéaires réalisés pour tous les points avec la droite d'équation $\cos \theta = 1$. Le graphique interne expose le fit réalisé uniquement sur les angles mesurés pour la série homologue d'alcane, et la ligne pointillée verte représente le fit pour tous les points.

Pour le substrat modèle ots, on obtient $\gamma_c = 19,9 \pm 1,3 \text{ mN m}^{-1}$ en utilisant comme liquides tests tous les n-alcanes ainsi que le formamide, le glycérol et l’eau. Cette valeur est similaire à celle déterminée par TILLMAN et coll. [75] ($\gamma_c = 20,2 \text{ mN m}^{-1}$) et à celle déterminée par KULKARNI et coll. [78] ($\gamma_c = 20,7 \text{ mN m}^{-1}$), pour le même substrat et en utilisant la même technique. Il existe un moyen d’affiner la précision obtenue sur la valeur du γ_c de l’ots, dont la rugosité et la contribution polaire à l’énergie de surface sont très faibles. Ces facteurs sont en effet susceptibles d’influencer les angles de contact mesurés [119, 120, 130]. Puisque les contributions polaires à la tension de surface des liquides appartenant à la série homologue des n-alcanes sont quasi-nulles (contrairement à l’eau, au glycérol ou au formamide ; cf. [tableau 3.2](#)), nous pouvons considérer qu’un fit linéaire des données excluant les liquides plus ou moins polaires sera plus approprié en vue de déterminer le γ_c de l’ots. Ce fit ne tenant compte que des angles de contact mesurés pour les alcanes est représenté dans le graphique inclus en haut à droite de la [figure 3.9](#). La valeur déterminée pour l’énergie critique du solide devient alors $\gamma_c = 21,3 \pm 0,5 \text{ mN m}^{-1}$, valeur probablement plus proche de la « réelle » tension de surface de l’ots. On remarque que cette valeur est assimilable à la valeur calculée précédemment pour γ_s^d ($\sim 21,2 \text{ mN m}^{-1}$). Cette similitude entre γ_c et γ_s^d est une généralité observée pour toutes les surfaces solides exhibant de faibles contributions polaires [51].

3.3 Microscopie à force atomique (AFM)

3.3.1 Principe

Nous utilisons l’AFM pour caractériser la rugosité et/ou la topographie des substrats. L’AFM étant un système très exploité, dans des applications variées [131–133], et donc très connu, nous nous contentons d’un bref rappel au sujet des principes de son fonctionnement.

Une pointe de dimensions nanométriques ($\varnothing \approx 15 \text{ nm}$) située à l’extrémité libre d’un microlevier est approchée pas à pas au voisinage d’une surface à l’aide d’un moteur qui assure des déplacements verticaux de quelques dizaines de microns ([figure 3.10](#)). Une fois la pointe « engagée » sur la surface, la formation d’une image est assurée par le déplacement de la pointe sur l’échantillon. La déflexion du levier, sous l’action des forces qui s’exercent entre la pointe et la surface, est mesurée par un système de détection optique constitué d’un faisceau laser et d’une photodiode à quatre quadrants. Le faisceau laser, centré sur l’extrémité supérieure du levier, est réfléchi vers la photodiode qui délivre une tension électrique proportionnelle aux déflexions. Les positions verticales de l’échantillon sont ajustées par un asservissement proportionnel, intégral et différentiel. La céramique piézoélectrique se déplace alors dans les trois directions de l’espace pendant la formation de l’image. Le contraste vertical est assuré par l’évolution de sa position verticale pendant le balayage (\vec{x}, \vec{y}) de façon à conserver le signal de déflexion constant et égal à un signal de référence fixé expérimentalement, appelé point de fonctionnement. L’avantage premier de l’asservissement du microlevier est de travailler en conservant la force constante entre la pointe et la surface.

3.3.2 Utilisation

Les deux modes principaux de l’AFM sont le « contact » et le « tapping ». En mode contact, la pointe est en permanence située à une distance très proche de la surface, dans la zone des interactions attractives de type van der Waals. En mode tapping, la céramique piézoélectrique vibre à une fréquence ajustée à la fréquence de vibration du microlevier, permettant théoriquement de minimiser l’altération des échantillons entraînée par les interactions avec la pointe de l’AFM.

L’appareil utilisé dans cette étude est un Bioscope™ (Digital Instruments/Veeco). Les paramètres généralement utilisés, que ce soit pour l’analyse des substrats ou des cellules, sont les suivants : dans la plupart des cas nous avons travaillé en mode tapping, en milieu ambiant ou liquide, la fréquence d’échantillonnage était d’environ 0,5 ligne par seconde, et chaque image est le produit de 512 points (ou pixels, par ligne) multipliés par 256 lignes. Une pointe RTESP (Veeco,

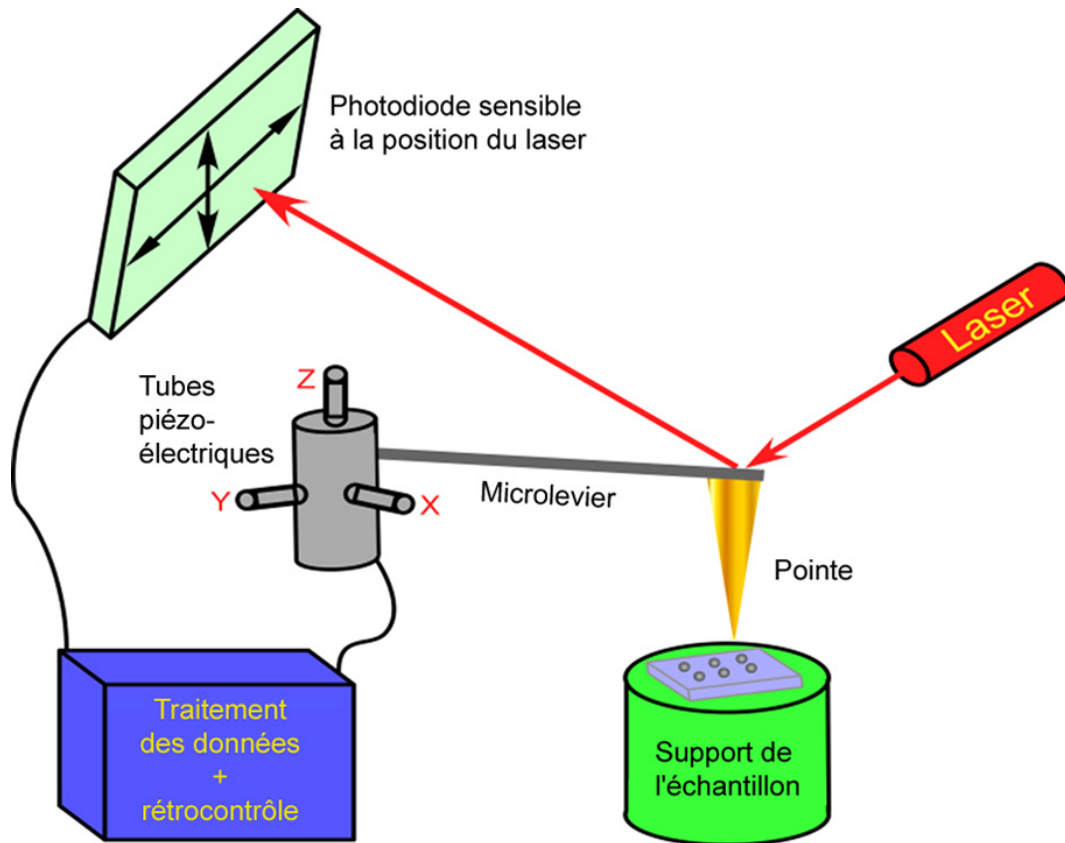


FIGURE 3.10: Schéma du principe de fonctionnement du microscope à force atomique (AFM).

constante de raideur du microlevier : 40 N m^{-1}) a été utilisée pour l'imagerie des surfaces à l'air libre. En milieu liquide, la céramique piézoélectrique était équipée de pointes MLCT (Veeco) dont les constantes de raideur des microleviers sont $0,01 \text{ N m}^{-1}$, $0,02 \text{ N m}^{-1}$ et $0,03 \text{ N m}^{-1}$. L'analyse des surfaces en milieu ambiant (air) a parfois été réalisée en mode contact. Dans ce cas, la pointe utilisée était une OTR8, dont les constantes de raideur des deux microleviers étaient respectivement de 150 et 570 mN m^{-1} .

L'analyse de la rugosité des surfaces est effectuée par le logiciel d'exploitation de l'AFM « Nanoscope » (Veeco) pour des surfaces comprises entre $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ et $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$. La rugosité est représentée par la valeur du rms (« root mean square », i.e. la taille quadratique des aspérités, autrement dit la racine carrée de la moyenne des carrés de toutes les valeurs de hauteurs mesurées pour chaque point dans la même image, soit pour 256×512 points ou pixels). Toutes les valeurs de rms présentées sont la moyenne de trois mesures indépendantes. Le rms apporte une information de nature purement quantitative sur la rugosité, qui possède également un caractère qualitatif dont le rms ne rend pas compte. À rms égal, la rugosité peut revêtir un caractère topographique différent selon le substrat. Par exemple, les aspérités sont parfois regroupées dans des régions spécifiques de ce dernier. L'analyse purement physique doit donc se coupler de la visualisation des surfaces imagées, et du recoupement éventuel des informations fournies pour ces deux types de caractérisation distincts : le rms et la topographie.

3.3.3 Conclusions

L'outil d'investigation employé pour analyser les substrats est le fruit d'une puissante combinaison de techniques spécifiques des surfaces aux apports divers et variés. L'IRTF fournit des informations quantitatives sur le matériel moléculaire adsorbé aux surfaces de verres, tandis que la SFG renseigne plus particulièrement sur la façon dont les terminaisons chimiques sont agencées les unes par rapport aux autres. La mesure des angles de contact, et son exploitation par le modèle

Owens–Wendt, permet en premier lieu de contrôler les résultats obtenus par l'IRTF et la SFG. En second lieu, elle établit la distribution des différentes composantes de l'énergie de surface, corrélée à la distribution relative des éléments chimiques présents à la surface. Les procédés de greffage en phase liquide conduisent *a priori* à une relative homogénéité des surfaces en termes d'énergie de surface totale ($\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$) à l'échelle d'une lamelle. Autrement dit, la distribution locale des énergies de surface est relativement identique quelle que soit la zone analysée d'une lamelle particulière.

Bien que les techniques de caractérisation employées opèrent à une échelle supérieure au micron (de l'ordre de $0,07 \text{ mm}^2$, soit la section d'un rayon laser, pour les spectroscopies, ou de l'ordre du mm^2 pour les expériences de mouillage), les informations fournies renseignent sur la nanostructure des surfaces, et donc sur la distribution locale des énergies d'adhésion. La mesure des hystérèses ($\theta_{AR} = \theta_A - \theta_R$), complétée par la mesure de la rugosité des lamelles à l'aide de l'AFM, fournit un contrôle supplémentaire sur les résultats du greffage en phase liquide. La mesure de l'hystérèse contrôle l'éventuelle rugosité et/ou le degré d'hétérogénéité chimique des substrats, tandis que l'imagerie des surfaces permet de s'assurer de l'homogénéité des substrats à l'échelle micrométrique, et de repérer d'éventuelles distinctions topographiques à l'échelle submicrométrique.

Chapitre 4

Analyse des surfaces dotées de terminaisons méthyle (CH_3)

L'analyse des monocouches méthylalkylsiloxanées utilise tous les moyens de caractérisation présentés au cours du chapitre précédent. Leurs propriétés sont aisément accessibles, dans la mesure où, premièrement, la zone du spectre correspondant aux vibrations d'élongation des groupes CH ($2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$) n'est pas susceptible d'être brouillée par le spectre de l'eau adsorbée en surface des substrats, et deuxièmement, le groupe apolaire CH_3 ne fournit qu'une contribution dispersive à l'énergie de surface, facilitant ainsi l'attribution des composantes énergétiques dispersives et polaires calculées aux groupes CH_3 ou OH de la surface.

En premier lieu, nous nous attacherons à caractériser les molécules adsorbées au verre d'un point de vue quantitatif. Pour cela, nous utiliserons l'IRTF, dont nous contrôlerons les résultats par AFM. Les analyses SFG présentées ensuite nous permettront de qualifier le degré d'organisation des groupes CH_3 au sein des monocouches. En dernier lieu, nous établirons les composantes polaires (γ^p) et dispersives (γ^d) de l'énergie de surface (γ_s) de chaque substrat. La détermination de leurs énergies critiques (γ_c) ainsi que la mesure des θ_{AR} nous permettra de contrôler la validité des résultats obtenus. Les résultats les plus pertinents du présent chapitre sont résumés dans un article récemment publié dans la revue *Biomaterials* [134] (cf. [annexe D](#)), contenant aussi l'analyse de l'évolution des cellules, en termes d'adhésion et de différenciation, sur les différents substrats analysés ici. Cette analyse sera abordée en détail au [chapitre 9](#) ([partie II](#) de cette thèse).

4.1 Analyse quantitative du matériel adsorbé sur le verre

4.1.1 Degré d'hydrophobicité en fonction de la quantité de matériel adsorbé

Comme nous l'avons déjà brièvement évoqué lors des [chapitres 2](#) et [3](#), une surface de verre propre, exposant essentiellement des groupes OH, aboutit à un angle de contact nul ($\theta = 0^\circ$) pour un liquide tel que l'eau. À l'inverse, un substrat parfaitement homogène composé de groupes CH_3 très ordonnés (cas de l'ots) voit l'eau former un angle voisin de 110° sur sa surface. Une surface de verre couverte de méthylalkylsiloxanes, dans une proportion comprise entre 0 et 100%, aura donc un angle de contact compris dans l'intervalle $[0^\circ, 110^\circ]$. Cet angle est sensé augmenter en fonction de la quantité de groupes CH adsorbés. C'est bien ce que nous observons pour des substrats composés d'ODMS lorsque nous faisons varier le temps de greffage ([figure 4.1](#), voir aussi le [tableau 2.2](#)).

Précisons que la [figure 4.1](#) fait intervenir des surfaces pour lesquelles la rugosité mesurée est très faible ($\text{rms} \approx 0,3\text{ nm}$, i.e. similaire à l'ots ou au verre propre). L'intensité des pics $\text{CH}_2\text{-sy}$ et $\text{CH}_2\text{-as}$ augmente avec le temps de greffage, en bon accord avec les valeurs relevées pour l'angle de contact de l'eau. L'intensité des pics CH_3 est ici trop faible pour faire l'objet d'une comparaison suivant les substrats. En outre, le maximum de molécules d'ODMS adsorbées est atteint pour

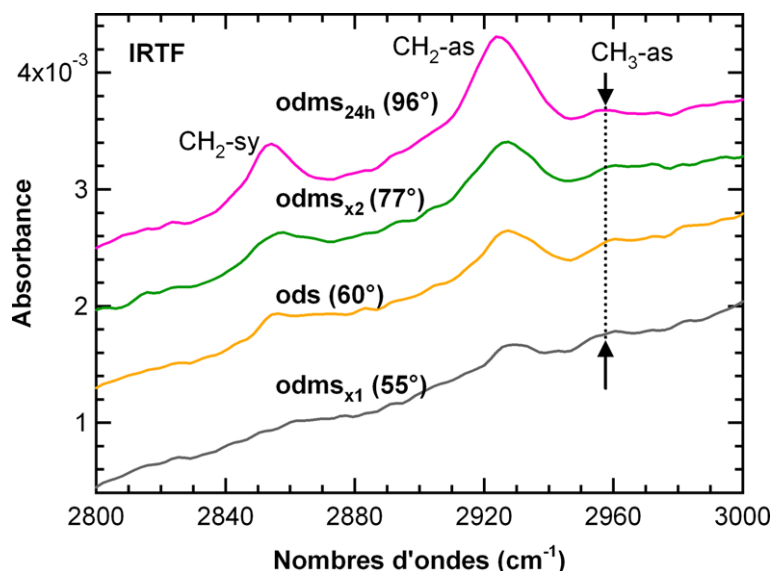


FIGURE 4.1: Spectres infrarouge des substrats composés d'ODMS et d'ODS. Les nombres entre parenthèses indiquent les angles de contact mesurés pour l'eau sur chaque substrat. L'intensité des pics est corrélée à l'augmentation des angles de contact mesurés. Les lignes de base des spectres sont décalées pour plus de clarté, comme pour la plupart des spectres que nous présenterons par la suite. Les couleurs employées pour chaque substrat correspondent à celles qui seront attribuées aux spectres SFG présentés à la [section 4.2](#).

le substrat $\text{odms}_{24\text{h}}$: il devient impossible d'augmenter l'intensité du pic ainsi que l'angle de contact en prolongeant la durée d'adsorption en solution au-delà de 24 h. À l'inverse, le substrat $\text{odms}_{\text{x}1}$ représente quasiment la limite de détection du spectromètre, ne faisant apparaître que des esquisses de pic pour chacune des bandes d'absorption.

4.1.2 Sensibilité du greffage aux conditions d'adsorption en solution

La sensibilité du greffage aux conditions d'adsorption peut engendrer la production d'artefacts susceptibles de perturber l'interprétation des résultats. Par exemple, nous avons remarqué la formation d'agrégats de molécules sur la plupart des surfaces composées d'alkoxysilanes greffés en présence d'une solution d'isomères d'hexanes ([figure 4.2](#)). La taille de ces agrégats semble être corrélée à la taille des molécules en solution, puisque le substrat odms , dont la rugosité ($\text{rms} \approx 4,5 \text{ nm}$) est plus importante que celle du substrat htms_{H} ($\text{rms} \approx 1,4 \text{ nm}$), est aussi formé à partir d'un silane (ODMS) dont la chaîne latérale comporte 17 groupes CH_2 , contre seulement 5 pour l'HTMS (cf. [figure 2.1](#)). Bien que ces agrégats soient *a priori* physisorbés à la monocouche chimisorbée au verre (et donc supposément liés par des interactions de faible énergie), les tentatives de nettoyage testées (sonication et rinçage énergétique à l'aide d'une pissette) n'ont pas abouti à des résultats très concluants, comme le montre la [figure 4.3](#).

Deux lamelles htms_{H} de rms initial $\sim 1,4 \text{ nm}$ ont été rincées avec des résultats variables ($\text{rms} \approx 0,9 \text{ nm}$ pour l'une, [figure 4.3a](#); $\text{rms} \approx 1,3 \text{ nm}$ pour l'autre, [figure 4.3b](#)) tandis que l'échantillon de lamelle odms présenté à la [figure 4.2](#) a été rincé puis soniqué pendant 30 min dans le chloroforme sans effet visible ([figure 4.3c](#)). Cette manipulation fournit néanmoins un indice sinon une confirmation que ce matériel n'est pas chimisorbé sur les surfaces, puisque dans le cas du HTMS, triméthoxysilane donc susceptible de polymériser, un décapage manuel au moins partiel est possible, même s'il se révèle peu efficace. Dans le cas de l'ODMS, monométhoxysilane, l'autocondensation accompagnée de la chimisorption sur le verre est impossible (cf. chapitre 2). De plus, le substrat $\text{odms}_{24\text{h}}$ présente un rms proche de $0,3 \text{ nm}$, indiquant que, suite au recouvrement optimal du verre par l'ODMS ($\theta_{\text{H}_2\text{O}} \approx 96^\circ$), les agrégats de molécules n'ont plus « prise » sur le substrat. Autrement dit, l'établissement de liaisons hydrogène entre les groupes CH_3 des agrégats et les groupes OH du verre devient de moins en moins probable.

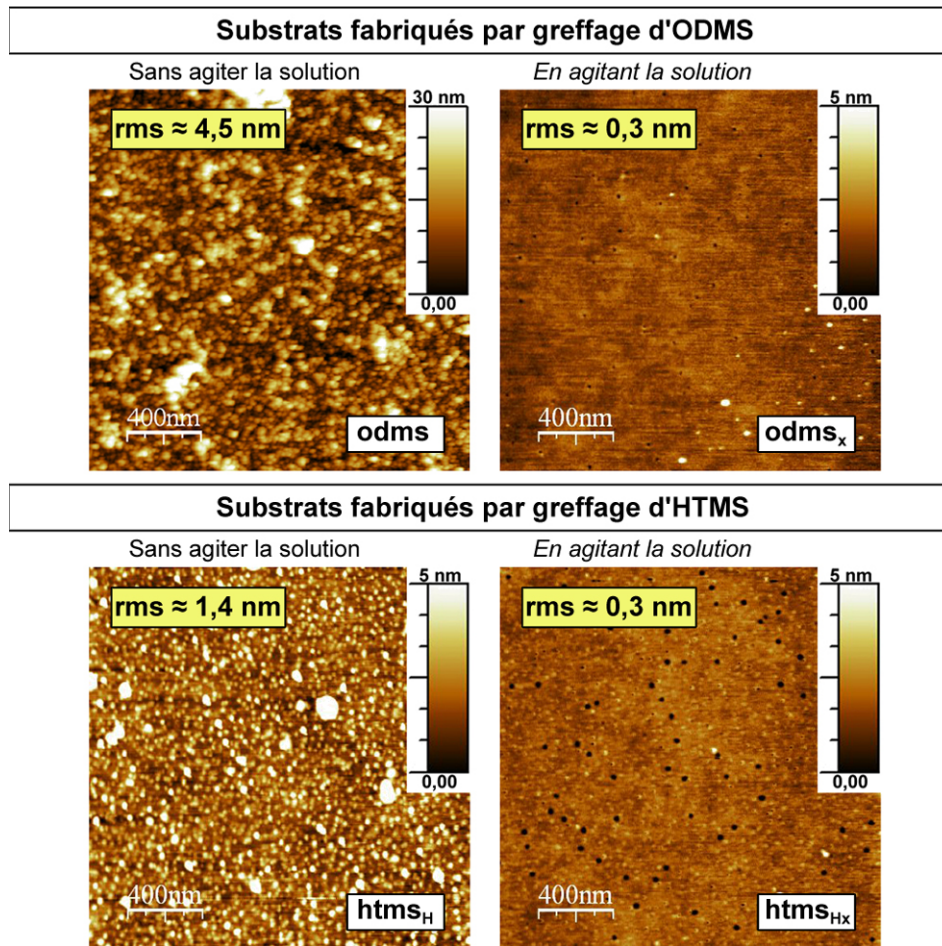


FIGURE 4.2: Influence de l'agitation de la solution de greffage sur la rugosité des substrats (images AFM). L'agitation des solutions permet d'éliminer la physisorption parasite de molécules sur les substrats.

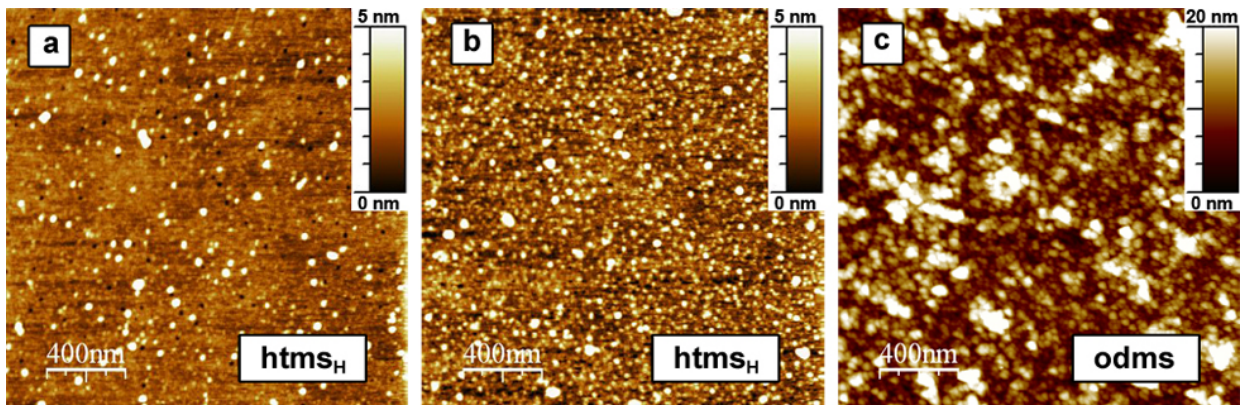


FIGURE 4.3: Tentative de nettoyage du matériel parasite physisorbé sur les surfaces (images AFM). Le nettoyage s'effectue manuellement par projection de solvant à l'aide d'une pissette. La lamelle d'odms (c) a été, en plus, sonicuée dans le chloroforme pendant 30 min. Les deux techniques se révèlent peu efficaces par rapport à l'agitation des solutions.

Ces quelques difficultés à obtenir un greffage homogène permettant la formation d'une monocouche « propre » nous ont conduit à adapter le protocole, concernant ces molécules dans ce solvant. La mise en solution d'un barreau aimanté (en téflon), préalablement nettoyé au piranha, a servi à agiter doucement les solutions. Ce procédé a visiblement contribué à bloquer l'adsorption des agrégats (figure 4.2), comme en témoigne la baisse du rms de l'odms ($\sim 4,5$ nm) à l'odms_x ($\sim 0,3$ nm), et de l'htms_H ($\sim 1,4$ nm) à l'htms_{Hx} ($\sim 0,3$ nm).

Par ailleurs, l'agitation des solutions a aussi provoqué un ralentissement de la cinétique de chimisorption. Pour un temps identique en solution (4 h), le substrat odms , fabriqué sans agitation, présente un angle de contact d'environ 77° , tandis que le substrat odms_{x1} , fabriqué avec agitation, présente un angle de contact compris entre 55° et 60° , significatif d'une quantité moindre de matériel chimisorbé. Il faut une dizaine d'heures dans ces conditions pour que l'ODMS sur du verre atteigne la valeur de 77° . Précision : dans ces considérations, nous ne prenons pas en compte le matériel physisorbé sur la surface. L'eau étant une molécule très petite, plus ou moins capable de diffuser à l'intérieur d'une monocouche dense d'alkylsiloxanes [128], elle est *a fortiori* capable de s'infiltrer à travers tous les éventuels agrégats de molécules, et l'angle de contact est donc ici un bon révélateur de la quantité de matériel en prise directe avec le verre, au contraire de l'infrarouge qui reflète la totalité des molécules présentes (figure 4.4). De même que pour l'ODMS, la vitesse d'adsorption de l'HTMS et de l'OTMS est influencée par l'agitation de la solution, bien que dans des proportions moins significatives. Ainsi, l'angle de contact passe de 104° pour l' htms_{H} à 98° pour l' htms_{Hx} , et de 105° pour l' otms à 100° pour l' otms_{x} .

Le spectre infrarouge de l' otms ($\text{rms} \approx 1,5 \text{ nm}$) fait apparaître une fois encore la « suradsorption » qui accompagne la création des monocouches d'alkylsiloxanes dans une solution d'hexanes non-agitée. Les pics de l' otms sont légèrement plus intenses que ceux de l' ots ($\text{rms} \approx 0,3 \text{ nm}$) bien que son angle de contact soit légèrement inférieur (105° pour l' otms contre 110° pour l' ots). Le spectre de l' otms_{x} expose quant à lui des pics moins intenses, ce qui apparaît logique compte-tenu d'une part de son angle de contact (100°), d'autre part, de son rms ($\sim 0,3 \text{ nm}$). Ces résultats confirment les hypothèses faites précédemment au sujet de la diffusion de l'eau, qui n'est sensible qu'à la monocouche chimiquement liée au verre et constitue donc une précieuse sonde pour analyser nos substrats. Comparer l'adsorption respective de l'OTMS et de l'OTS revient à comparer les alkoxy-silanes et les chlorosilanes. En effet, les deux molécules ont la même chaîne latérale, et ont chacune le potentiel de donner naissance à trois nouvelles liaisons chimiques au niveau de leurs atomes de silicium, et aboutissent donc après adsorption au même type de monocouche (classe 1). L'interprétation des résultats précédents permet de conclure que le produit de l'adsorption des chlorosilanes est plus stable que celui des alkoxy-silanes. Cette analyse s'explique par la réactivité des chlorosilanes, paradoxalement plus instables en soi, et dont l'hydrolyse des groupes liés au silicium s'effectue en conséquence plus rapidement. Cette hausse de la réactivité s'accompagne vraisemblablement d'une sensibilité accrue aux conditions de greffage (notamment la température et l'humidité relative). Ainsi, l'angle de contact de l'eau, mesuré pour un substrat d'ODS (*monochlorosilane*), varie entre environ 60° et 92° suivant les échantillons, pourtant tous élaborés dans des conditions similaires.

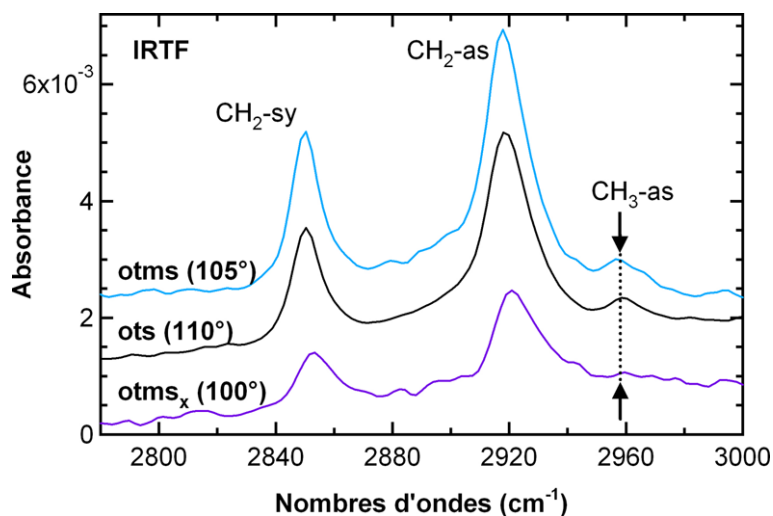


FIGURE 4.4: Spectres infrarouges des substrats élaborés à partir d'OTS et d'OTMS. Les nombres entre parenthèses indiquent les angles de contact mesurés pour l'eau.

4.1.3 Analyse comparative des spectres infrarouges des différents substrats

La figure 4.5 montre les spectres infrarouges des substrats pour lesquels la rugosité mesurée est similaire à celle du verre propre ($rms \approx 0,3$ nm), hormis pour l'htms_H ($rms \approx 1,4$ nm), cas particulier sur lequel nous nous sommes déjà attardés. Cette similarité permet une comparaison adéquate de la quantité totale de matériel adsorbé sur les surfaces de verre. Les pics les plus intenses sont, comme attendu, observés dans le spectre de l'ots, substrat modèle exhibant une monocouche quasi-parfaite d'alkylsiloxanes [41,42]. Les pics des substrats odms sont moins intenses que ceux de l'ots, bien que la longueur des chaînes alkyle au sein des monocouches soit identique (cf. figure 2.1). Cela indique que les substrats odms présentent un nombre moins important de molécules greffées par unité de surface, en bon accord avec nos prévisions résultants de la différence de structure de ces molécules (possibilité de « cross-linking » pour l'OTS, contrairement à l'ODMS).

L'intensité des pics pour le substrat htms_{M3} est quasi-nulle, suggérant que la quantité de molécules greffées est située en deçà de la limite de détection du spectromètre. Néanmoins, la présence d'une quantité non-négligeable de groupes CH à la surface de l'htms_{M3} est suggérée par l'angle de contact non-nul mesuré pour l'eau ($56^\circ \neq 0^\circ$), là où une surface de verre propre serait totalement mouillée ($\theta = 0^\circ$). L'allure de ce spectre est à mettre en rapport avec les observations faites pour le substrat odms_{x1}, possédant le même angle de contact ($\theta \approx 55^\circ$). Bien que l'odms_{x1} soit composé d'une molécule différente (l'ODMS), dont la chaîne carbonée est plus longue que celle de l'HTMS (17 groupes CH₂ contre 5 pour l'HTMS), aucun pic n'apparaît distinctement.

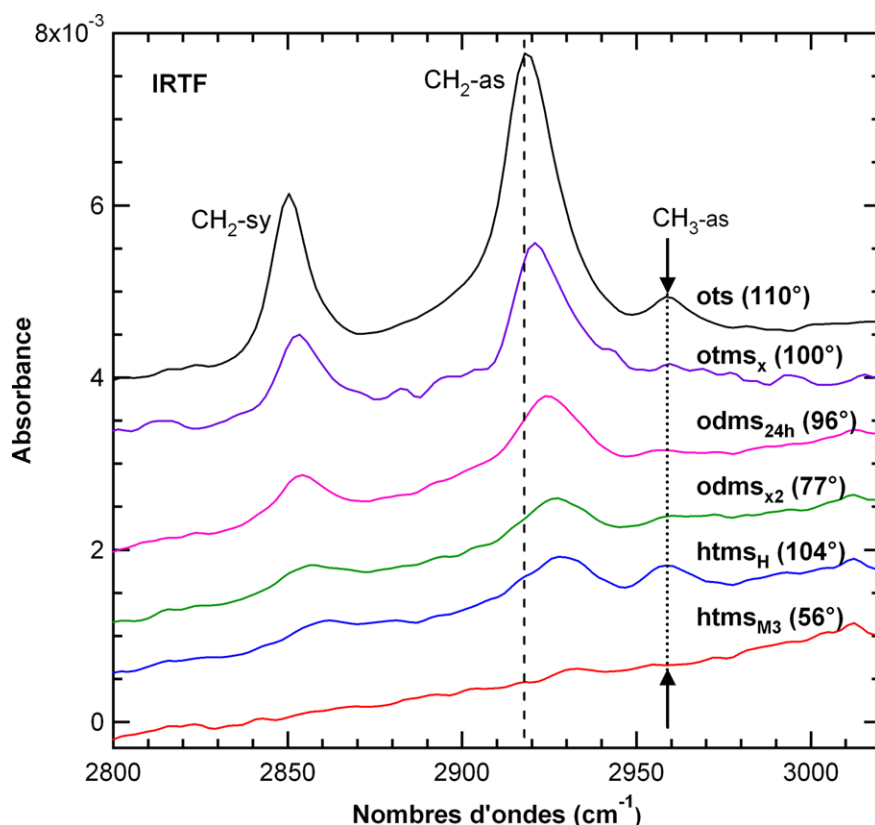


FIGURE 4.5: Analyse comparative des spectres infrarouges dans la région des vibrations d'élongation des groupes CH. Les nombres entre parenthèses indiquent les angles de contact mesurés pour l'eau.

Cette analogie disparaît pour des angles de contact plus importants : les substrats ots et htms_H, tous deux monocouches de classe 1, ont un angle de contact presque identique (ots : $\sim 110^\circ$, htms_H : $\sim 104^\circ$), mais des intensités respectives de pics CH₂ qui diffèrent en proportion de la longueur de la chaîne alkyle composant les deux monocouches. Inversement, l'intensité des pics CH₂ du substrat htms_H est similaire à celle des substrats odms (voir aussi la figure 4.1), bien que la longueur

de la chaîne alkyle diffère entre l'ODMS et l'HTMS. Cette ressemblance peut s'expliquer par la suradsorption que subit l'HTMS dans une solution d'hexanes, et/ou par la possibilité qu'ont les monomères d'HTMS de former des liaisons latérales entre eux, comme c'est le cas pour l'OTS et l'OTMS. Cette polymérisation latérale de l'HTMS doit permettre d'augmenter considérablement le nombre de molécules greffées par unité de surface. Le mécanisme effectif réside probablement dans une combinaison de ces deux processus, puisque d'une part, l'angle de contact atteint pour l' htms_H ($\sim 104^\circ$) est supérieur à l'angle maximum relevé pour les substrats odms (cas de l' $\text{odms}_{24\text{h}}$: $\theta \approx 96^\circ$), et d'autre part, l'intensité du pic CH_3 de l' htms_H est bien supérieure à celle de tous les autres substrats, ots compris.

Enfin, nous remarquons le décalage plus ou moins grand des pics représentant les bandes d'absorption des groupes $\text{CH}_2\text{-sy}$ et $\text{CH}_2\text{-as}$, par rapport à la référence fournie par une monocouche ordonnée d'octadécylsiloxanes (ligne pointillée à $\sim 2918 \text{ cm}^{-1}$). Afin de lever le voile sur l'organisation structurale des monomères au sein des monocouches, nous allons maintenant aborder les analyses qualitatives menées en spectroscopie non-linéaire. Celles-ci doivent nous permettre de confirmer — ou infirmer — les indices obtenus par les analyses en infrarouge, en AFM, et par les mesures d'angles de contact.

4.2 Analyse qualitative de l'organisation des groupes CH exposés en surface

La génération de somme de fréquences est produite par un système optique extrêmement sensible, si bien que l'intensité des pics et le rapport signal/bruit peuvent varier considérablement d'une série d'expériences à l'autre. En effet, les réglages du système sont constamment réajustés, et il devient donc plus difficile de comparer quantitativement l'intensité des signaux renvoyés par des substrats n'ayant pas été strictement analysés dans les mêmes conditions. C'est la raison pour laquelle les données que nous présentons ci-après sont scindées en deux parties, reflétant chacune les résultats obtenus au cours de deux séries d'expériences réalisées à des dates distinctes. Les résultats obtenus lors de la première série de manipulations nous ont permis d'optimiser les procédés de fabrication des substrats dans l'intervalle de temps la séparant de la série suivante (environ un an). C'est aussi pourquoi une partie des substrats évoqués dans la section précédente n'apparaissent pas au cours de la section qui suit.

4.2.1 Première série de manipulations

Expériences menées sur divers substrats fabriqués à partir d'OTMS

La [figure 4.6](#) expose les spectres SFG (dont les lignes de base sont plus ou moins décalées pour plus de clarté) de substrats qui ont tous été fabriqués à partir d'OTMS, dans deux solvants différents et sous différentes conditions d'adsorption. Ces substrats et ces conditions sont décrits dans le [tableau 4.1](#).

TABLEAU 4.1: Protocoles de modification par l'OTMS de substrats analysés par SFG. Les abréviations renvoient à celles définies dans le [tableau 2.1](#).

Substrat	Solution de greffage	Durée
otms	1% OTMS + 99% HX	4 h
otms*	1% OTMS + 99% HX	4 h
otms*†	1% OTMS + 99% HX	4 h
otms _{M0}	2% OTMS + 94% MET + 4% H ₂ O + 1mM AA	15 min
otms _{M1}	2% OTMS + 94% MET + 4% H ₂ O + 1mM AA	~16 h

* L'échantillon « otms* » est un autre échantillon du même substrat (otms).

† L'échantillon « otms*† » est l'échantillon otms* après sonication dans un bain de méthanol pendant 30 min.

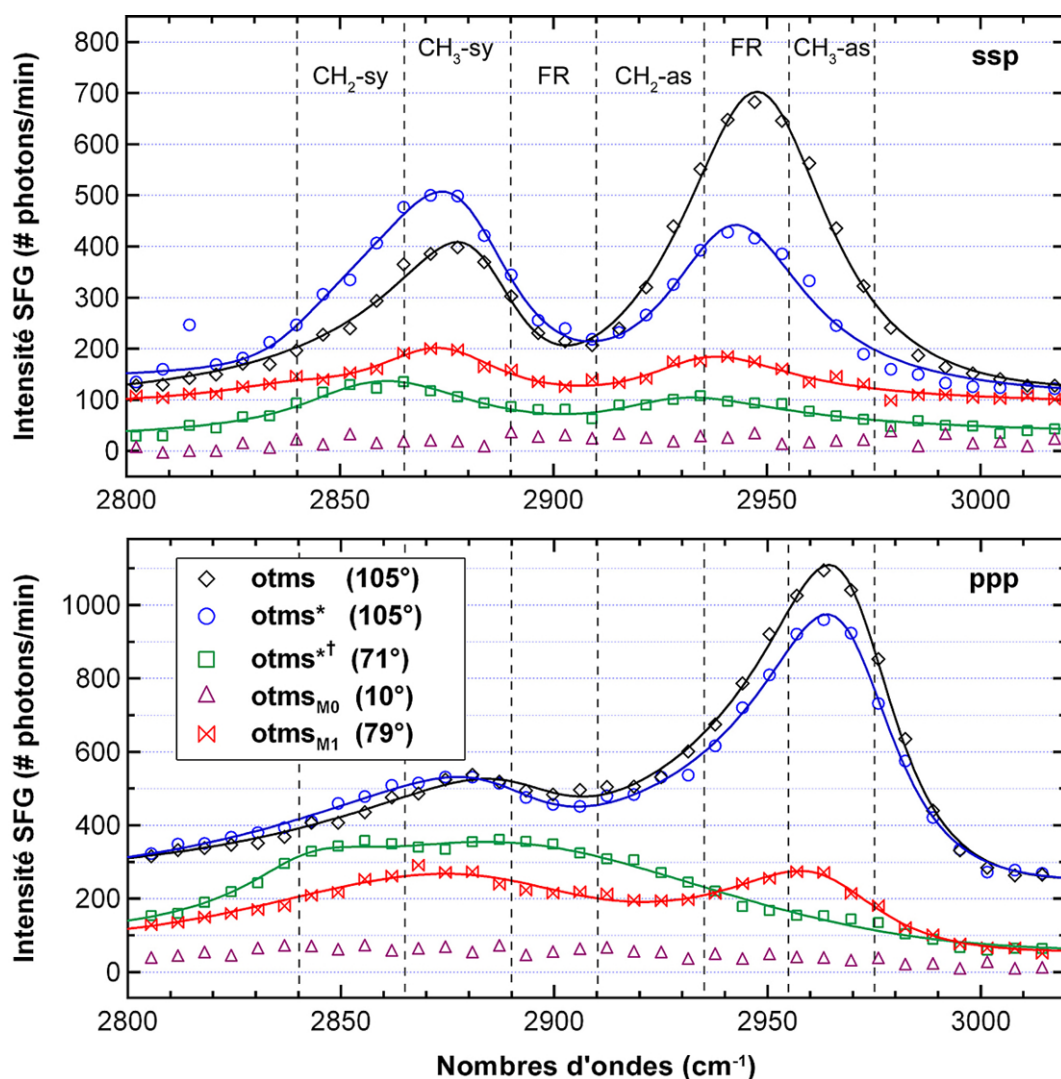


FIGURE 4.6: Spectres SFG des substrats élaborés par greffage d'OTMS, décrits dans le [tableau 4.1](#). Les nombres entre parenthèses indiquent les angles de contact mesurés pour l'eau. Les polarisations respectives des rayons lasers SFG, vis, IR, sont respectivement s,s,p (graphique du haut) et p,p,p (graphique du bas).

Les spectres SFG des substrats *otms* et *otms** indiquent que la monocouche d'alkylsiloxanes formée sur la surface de verre est très ordonnée dans les deux cas. Deux pics très bien définis dans les spectres ssp viennent supporter cette assertion. Il s'agit des pics situés à $\sim 2875 \text{ cm}^{-1}$ et $\sim 2845 \text{ cm}^{-1}$, respectivement assignés à la vibration $\text{CH}_3\text{-sy}$ et à la résonance de Fermi du groupe CH_3 [100, 101]. Dans les spectres relatifs à la combinaison de polarisations ppp (cf. [chapitre 3](#)), les pics situés vers 2880 cm^{-1} et vers 2865 cm^{-1} sont respectivement attribués à la vibration $\text{CH}_3\text{-sy}$ et à la vibration $\text{CH}_3\text{-as}$ [100, 101]. Leur intensité va de pair avec l'interprétation des spectres ssp, et de façon générale, avec la formation de monocouches auto-assemblées très ordonnées. Cependant, on peut remarquer que, si les deux spectres ppp des substrats *otms* et *otms** sont quasi-identiques, l'intensité des pics de leurs spectres ssp varie légèrement. Le spectre de *l'otms* expose une intensité de pic $\text{CH}_3\text{-sy}$ légèrement inférieure, et une intensité de pic $\text{CH}_3\text{-FR}$ plus importante, ainsi qu'un léger décalage des nombres d'ondes pour lesquels l'intensité des pics est maximale. Ces différences peuvent provenir d'une variation minimale des paramètres du dispositif d'analyse, comme le laisse penser la corrélation quasi-parfaite entre les spectres ppp des deux substrats. Néanmoins, l'intensité du pic $\text{CH}_3\text{-FR}$ de *l'otms**, plus faible que celle de *l'otms*, peut aussi signifier un ordonnancement moins optimal des groupes CH_3 , à l'origine de l'intensité du rayonnement SFG. Cette interprétation est renforcée par l'existence d'un léger pic $\text{CH}_2\text{-sy}$, vers

2860 cm^{-1} , qui déforme le pic CH_3 -sy situé vers 2875 cm^{-1} . Cette déformation (appelée « gauche defect » en anglais) provient de la non centro-symétrie locale du dernier groupe CH_2 situé à la fois en amont du groupe CH_3 terminal, et en aval de l'avant-dernier groupe CH_2 de la chaîne carbonée, et donc susceptible de produire un signal détectable en somme de fréquences.

Ce groupe CH_2 exposé en surface est le seul repérable au sein de la monocouche d'alkylsiloxanes produite par le substrat $\text{otms}^{*\dagger}$, équivalent au substrat otms^* mais passé par une étape de sonication avant d'être analysé. Cette étape était initialement destinée à se prémunir de la physisorption de monocouches additionnelles provenant de l'excès de polymères en solution [135]. La méthode est visiblement peu appropriée dans la réalisation d'une monocouche très ordonnée, puisque la sonication a, d'une part, retirée du matériel à la surface ($\theta \approx 71^\circ$), et d'autre part, désorganisée la monocouche. Cette lecture du spectre est appuyée par l'apparition des pics CH_2 , concomitante à la disparition des pics CH_3 aussi bien dans le spectre ssp que dans le spectre ppp.

Les flacons contenant les lames et les solutions de greffage à base de méthanol ont été très fortement agités manuellement, l'OTMS n'y étant pas soluble, avant de les laisser reposer le temps indiqué. Même si ce procédé de fabrication est peu susceptible de créer une surface reproductible d'une expérience à une autre, les spectres SFG générés par l' otms_{M1} se révèlent dignes d'intérêt d'un point de vue qualitatif. Signalons que l'adsorption de la molécule sur la surface de verre a relativement réussi, puisque l'angle de contact atteint une valeur de 79° pour l'échantillon analysé. Cette valeur est comparable à celle de l' $\text{otms}^{*\dagger}$ ($\theta \approx 71^\circ$), présentant lui aussi une monocouche incomplète d'alkylsiloxanes (par rapport à la valeur référence de 105° obtenue pour l' otms et l' otms^*). En revanche, contrairement à l' $\text{otms}^{*\dagger}$, les spectres ssp et ppp de l' otms_{M1} montrent que la monocouche formée est relativement bien ordonnée, comme l'indique la présence des pics CH_3 -sy et CH_3 -FR dans le spectre ssp, et dans le spectre ppp, les pics CH_3 -sy et CH_3 -as. L'intensité respective de ces pics est certes moindre que celle des pics de l' otms et de l' otms^* , ce qui est cohérent avec la mesure des angles de contact, puisque le signal SFG est à la fois fonction de la cohérence organisationnelle des terminaisons méthyle, et de leur quantité. Aucun pic n'apparaît sur les spectres ssp et ppp de l' otms_{M0} , ce qui est dû à une quasi-absence de matériel, indiquée par l'angle de contact très faible ($\theta \approx 10^\circ$).

Procédés de calibration et de normalisation des données

A présent que les quelques notions nécessaires à une bonne compréhension des spectres SFG, dans le cadre de nos expériences, ont été introduites, attardons-nous quelques instants sur les procédés de traitement des données permettant d'affiner l'analyse. Les spectres SFG présentés à la figure 4.6 ont été calibrés grâce aux spectres présentés à la figure 4.7. La calibration des spectres consiste à ajuster les nombres d'ondes des pics assignés aux différents modes de vibration des groupes CH en réalisant les opérations suivantes :

- i. Le spectre infrarouge d'un film de polystyrène (PS) permet d'obtenir une valeur de référence pour le nombre d'ondes auquel apparaît le pic de la vibration CH_2 -as (vers 2922 cm^{-1}).
- ii. Le film de polystyrène est ensuite placé en amont de l'arrivée du signal infrarouge utilisé pour produire la SFG d'une surface composée de galium et d'arsenic. Le film de polystyrène fait donc office de filtre. Le pic correspondant à la vibration CH_2 -as apparaît ainsi en négatif, à une fréquence donnée, sur le spectre gal/ars + PS (figure 4.7), puisque le polystyrène absorbe tout rayonnement émis à cette fréquence et aux fréquences avoisinantes, et ne peut donc exciter les molécules de la surface de galium et d'arsenic dans cette région du spectre.
- iii. Les nombres d'ondes des spectres SFG des échantillons sont par la suite réajustés en fonction de la différence observée entre les nombres d'ondes de sortie du pic CH_2 du PS en infrarouge, et les nombres d'ondes des pics de sortie correspondants en SFG/ssp ou SFG/ppp, comme indiqué sur l'exemple donné à la figure 4.7 (flèche). Dans ce graphique, la calibration correspond à un retrait de 10 cm^{-1} pour la combinaison de polarisations ssp, et à un retrait de 7 cm^{-1} pour la combinaison de polarisations ppp.

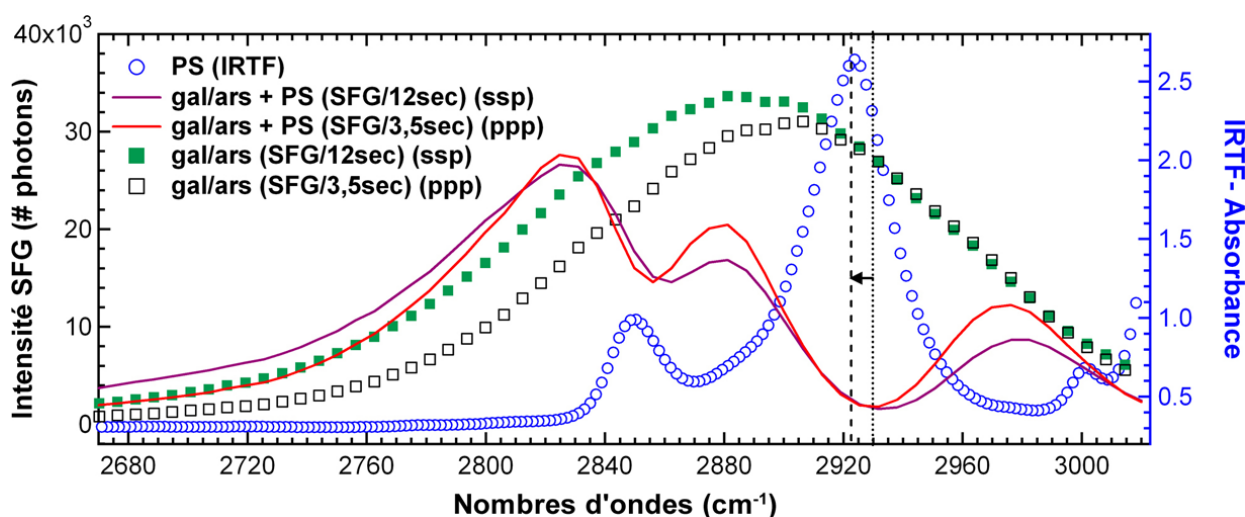


FIGURE 4.7: Spectres utilisés pour calibrer et normaliser les spectres SFG des substrats. PS est un film de polystyrène, gal/ars une surface de galium et d'arsenic. Le nombre de photons SFG collectés pour un temps donné est indiqué par (SFG/ x sec). La flèche située vers 2920 cm^{-1} indique le décalage des nombres d'ondes consécutif à la calibration des spectres.

La normalisation des spectres SFG consiste à diviser le nombre de photons SFG générés par chaque échantillon par le nombre de photons générés par une surface de galium/arsenic, pour chaque nombre d'ondes correspondant. La normalisation autorise le réajustement des nombres d'ondes auxquels apparaissent les intensités maximales des pics, et permet ainsi une précision accrue dans l'attribution des pics aux modes de vibration correspondants. De fait, certaines erreurs d'attribution pour les pics proches ou se chevauchant peuvent être évitées, facilitant en cela l'interprétation des spectres (figure 4.8).

Précisons enfin que pour chaque spectre, le tracé d'une courbe de tendance est obtenu par intégration des données expérimentales en fonction de l'équation mathématique correspondant à la génération de la fréquence somme (équation 3.3). L'obtention de cette courbe participe, au même titre que la normalisation et la calibration des spectres, au dévoilement de la position exacte des pics ainsi qu'à leur discrimination.

Données brutes et normalisées pour les substrats htms_H et odms

L'effet de la normalisation des spectres est particulièrement visible dans le spectre ssp de l'odms (figure 4.8). Le décalage que subit le pic situé aux alentours de 2955 cm^{-1} , après normalisation, permet d'attribuer sans ambiguïté ce pic à la résonance de Fermi du groupe CH₃, et non pas à la vibration d'élongation antisymétrique du groupe CH₂, bien que celle-ci soit également représentée dans le spectre. En effet, ce pic CH₂-as, apparaissant vers $2940\text{--}2945\text{ cm}^{-1}$, chevauche le pic CH₃-FR situé vers 2955 cm^{-1} , et signe l'existence d'une monocouche désordonnée pour ce substrat. La présence de groupes CH₂ exposés en surface est confirmée à la fois par le chevauchement des pics CH₂-sy et CH₃-sy dans le spectre ssp ($\sigma \approx 2870\text{ cm}^{-1}$) et par la présence de pics vers 2860 cm^{-1} et 2920 cm^{-1} dans le spectre ppp, respectivement attribués aux modes de vibration CH₂-sy et CH₂-as.

Les spectres SFG de l'htms_H sont quant à eux très similaires aux spectres de l'otms présentés à la figure 4.6, tant pour le spectre ssp que pour le spectre ppp. Ils reflètent la formation d'une monocouche très ordonnée d'alkylsiloxanes sur la surface de verre. La normalisation des spectres a dans ce cas peu d'effet sur les nombres d'ondes de sortie des pics, même si un « tassement » plus ou moins important des pics CH₃-sy est apparent, aussi bien dans le spectre ssp que dans le spectre ppp. De même que pour le substrat otms*, on remarque la déformation « gauche » ($\sigma \approx 2850\text{ cm}^{-1}$) des pics CH₃-sy du spectre ssp, vraisemblablement due à la présence, même minime, de groupes CH₂ exposés en surface.

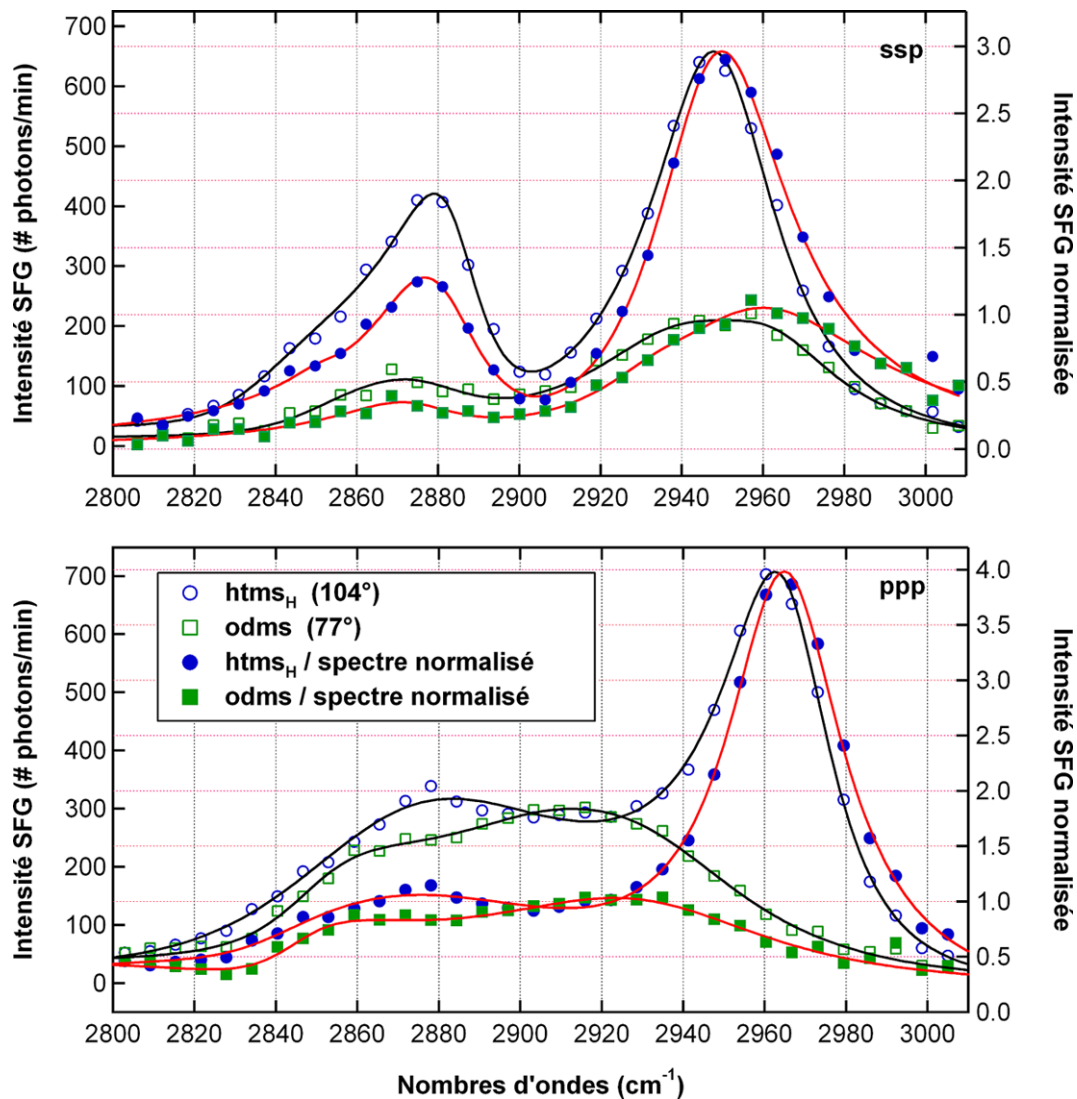


FIGURE 4.8: Spectres SFG bruts et normalisés des substrats htms_H et odms. Les nombres entre parenthèses indiquent les angles de contact mesurés pour l'eau.

Comparaison des substrats et réintroduction des classes d'organisation

La figure 4.9 reprend les spectres SFG normalisés des substrats htms_H et odms, et montre ces derniers aux côtés des spectres de l'htms_{M1}, du verre propre, et de l'otms (normalisé cette fois-ci). Ces différents spectres ont servi à établir la classification des substrats en fonction de la nature et de l'ordre relatif des terminaisons chimiques exposées en surface :

- i. Les spectres des surfaces auto-assemblées de classe 1 exposent des pics très intenses représentant les différents modes de vibration du groupement méthyle CH_3 . Sur les quatre pics possibles le concernant, trois d'entre eux sont particulièrement marqués : deux dans le spectre ssp (CH_3 -sy et CH_3 -FR) et un dans le spectre ppp (CH_3 -as). Seul le pic CH_3 -sy du spectre ppp apparaît relativement peu intense. On peut l'interpréter comme provenant, non pas de l'absence de la vibration, visible dans le spectre ssp, mais plutôt d'un effet secondaire dû à la normalisation des spectres.
- ii. Les spectres de l'odms, surface auto-assemblée de classe 2, montrent des pics dont l'origine provient des groupes CH_2 exposés en surface, comme le montre le spectre ppp du substrat, exposant de façon très nette les pics CH_2 -sy et CH_2 -as, corrélativement à l'absence de pic CH_3 -as. Le spectre ssp montre des pics CH_3 (CH_3 -sy et CH_3 -FR) globalement moins intenses, et ayant tendance à chevaucher les pics CH_2 . La densité surfacique des groupes siloxanes adsorbés, au sein de l'odms, est moindre par rapport aux monocouches de classe 1, comme

les mesures d'angles de contact l'indiquent. Cela ne suffit cependant pas à expliquer l'absence du pic $\text{CH}_3\text{-as}$ dans le spectre ppp de l'odms. La surface otms_{M1} , bien que dotée d'une quantité semblable de matériel adsorbé ($\theta \approx 79^\circ$ contre $\theta \approx 77^\circ$ pour l'odms) est en mesure de produire des spectres qualitativement semblables aux substrats de classe 1, mais dont les pics sont moins intenses (figure 4.6). En comparaison, le caractère « désordonné » des groupes CH présents en surface du substrat odms apparaît clairement.

- iii. *A contrario*, aucun pic n'est visible sur les spectres de l' htms_{M1} , surface auto-assemblée de classe 3. Les spectres ssp et ppp de ce substrat sont en cela similaires aux spectres du verre propre, utilisé comme contrôle négatif. Cette absence de pic peut signifier que les « rares » groupes méthyle présents en surface ($\theta \approx 38^\circ$) sont totalement désordonnés, et donc que l'adsorption du HTMS ne peut conduire à la formation d'une monocouche ordonnée de classe 1 ou 2 dans les conditions de solvant propres à ce substrat. Néanmoins, il reste à vérifier que cette absence de pic, y compris des pics CH_2 , n'est pas simplement la conséquence de la faible quantité de molécules d'HTMS adsorbées. Il est en effet possible d'augmenter cette quantité en allongeant la durée d'adsorption dans les mêmes conditions, comme c'est le cas pour l' htms_{M3} ($\theta \approx 56^\circ$).

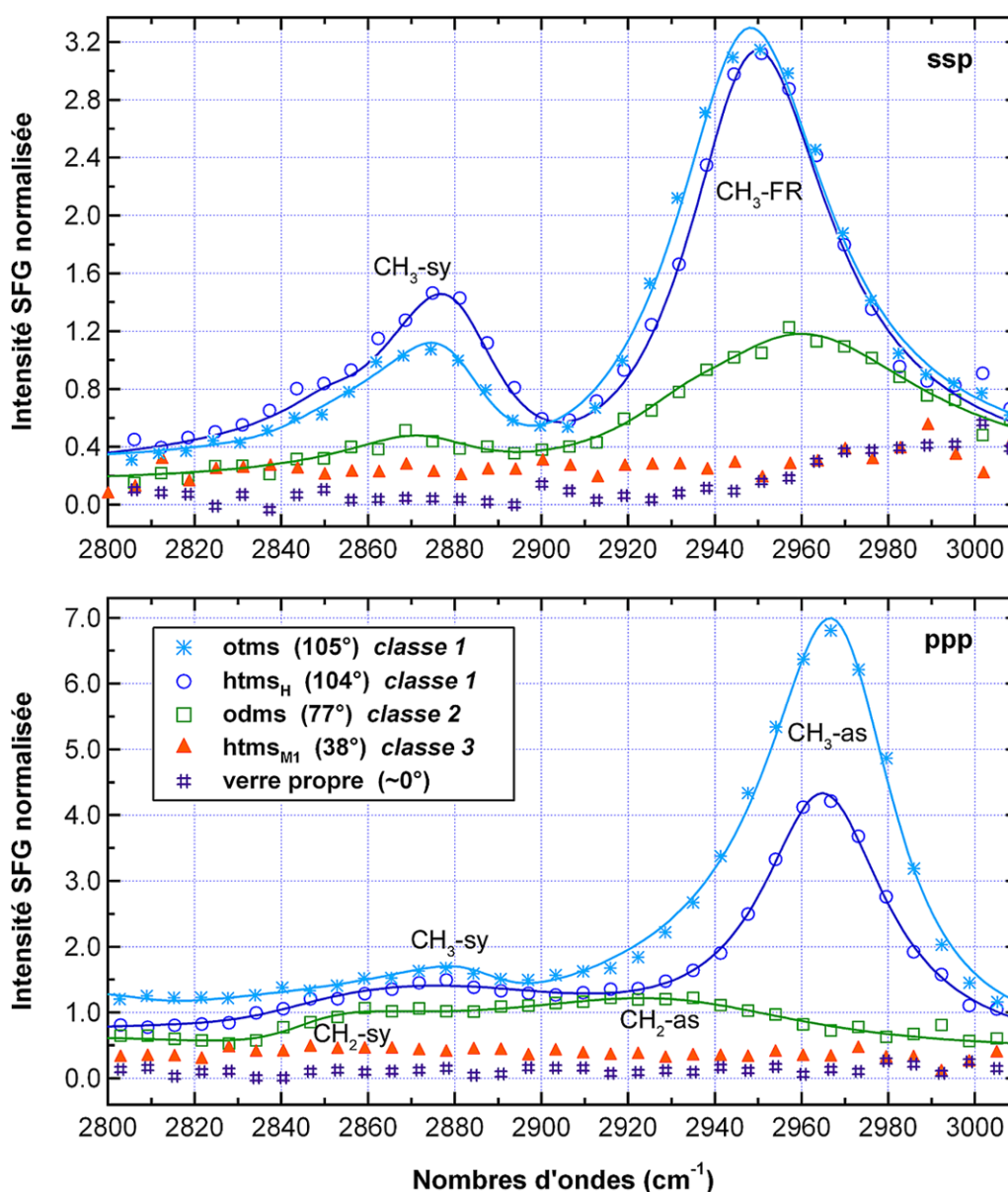


FIGURE 4.9: Ensemble des spectres SFG d'intérêt pour la première série d'expériences. Les nombres entre parenthèses indiquent les angles de contact mesurés pour l'eau.

4.2.2 Deuxième série de manipulations

La première série d’analyses SFG nous a permis d’assigner une partie des substrats élaborés aux diverses classes définies au chapitre 2. Les résultats obtenus nous ont aussi conduits à développer plus avant les méthodes de fabrication des surfaces auto-assemblées. Les substrats additionnels conçus suite à ces résultats, mais aussi suite aux diverses expériences de mouillage et d’AFM, ont fait l’objet de la deuxième série d’analyses SFG. Il en est ainsi de l’htms_{M3}, dont le cas vient juste d’être évoqué. De manière analogue à ce dernier, nous souhaitons évaluer dans quelle mesure un monométhoxysilane (ODMS) était susceptible de présenter un ordre surfacique assimilable à une surface d’une classe différente (en l’occurrence de classe 1), si d’aventures la concentration surfacique d’ODMS se voyait augmenter en proportion de l’allongement de la durée d’adsorption (cas de l’odms_{24h} pour lequel $\theta \approx 96^\circ$, contre $\sim 77^\circ$ pour l’odms).

La cohérence organisationnelle des groupes exposés en surface de l’otms_x, qui forme une monocouche « incomplète » ($\theta \approx 100^\circ$, contre $\sim 105^\circ$ pour la monocouche « complète » de l’otms), est également au cœur de cette deuxième série d’analyse. Il s’agira de déterminer si cette monocouche incomplète peut être rangée dans la classe 1 ou pas. En guise de contrôle et afin de tester la reproductibilité des résultats, certains substrats déjà analysés au cours de la première série de manipulations sont repris au cours de la deuxième. Enfin, nous exposons les spectres SFG de l’ots qui, en tant que substrat modèle, ne pouvait échapper à l’analyse comparative vis-à-vis des autres substrats.

Cas de l’ots et de l’htms_H (classe 1)

Les spectres SFG de l’ots (figure 4.10) sont en tous points assimilables aux résultats obtenus précédemment pour les substrats otms et htms_H (figure 4.9). L’ots forme comme prévu une monocouche très ordonnée dont les groupes méthyle sont en conformation « *all-trans* », caractéristique d’une surface auto-assemblée de classe 1. La spécificité de la SFG vis-à-vis de la non-centrosymétrie permet aux spectres de souligner les groupes CH_3 , à l’opposé des groupes CH_2 présents à l’état « *all-trans* » dans un environnement centro-symétrique. Par conséquent, les spectres SFG de l’ots et de l’htms_H sont similaires, alors que leurs spectres IR diffèrent considérablement (figure 4.10). On retrouve pour les deux substrats les pics à $\sim 2875 \text{ cm}^{-1}$ et $\sim 2955 \text{ cm}^{-1}$ dans les spectres ssp, respectivement assignés aux modes de vibration $\text{CH}_3\text{-sy}$ et $\text{CH}_3\text{-FR}$ [100, 101]. On retrouve également le pic à 2965 cm^{-1} dans le spectre ppp, assigné au mode $\text{CH}_3\text{-as}$ [100, 101]. Seul le pic à $\sim 2875 \text{ cm}^{-1}$ correspondant au mode $\text{CH}_3\text{-sy}$ dans le spectre ppp disparaît complètement par rapport à la première série d’expériences, vraisemblablement des suites de l’opération de normalisation, mais aussi d’une baisse du rapport signal/bruit enregistré au cours de cette deuxième série de manipulations.

Cas des autres substrats (ods, odms_{x1}, odms_{x2}, odms_{24h}, otms_x et htms_{M3})

Les spectres des substrats odms_{x1}, odms_{x2}, odms_{24h}, ods, otms_x, et htms_{M3} indiquent que les surfaces auto-assemblées qu’ils forment sont bien moins ordonnées (figures 4.10 et 4.11), comparées aux surfaces de classe 1 discutées ci-dessus. Cela est démontré dans les spectres ppp par l’absence ou la très faible intensité des pics à $\sim 2965 \text{ cm}^{-1}$ ($\text{CH}_3\text{-as}$), éventuellement chevauchés par les pics situés à $\sim 2940 \text{ cm}^{-1}$ ($\text{CH}_2\text{-as}$). Les spectres ssp de ces six substrats confirment la désorganisation des monomères au sein des monocouches. En premier lieu, les pics à $\sim 2875 \text{ cm}^{-1}$ ($\text{CH}_3\text{-sy}$) sont plus larges et/ou moins intenses que ceux des substrats ots et htms_H. En second lieu, les pics $\text{CH}_3\text{-FR}$ (vers 2955 cm^{-1}) chevauchent les pics $\text{CH}_2\text{-as}$ présents vers $2920\text{--}2930 \text{ cm}^{-1}$. L’intensité de ces derniers reflète la déformation gauche des pics $\text{CH}_3\text{-FR}$, signature des groupes CH_2 exposés en surface.

Les spectres SFG de l’odms_{x2} sont qualitativement identiques aux spectres SFG de l’odms (présentés aux figures 4.8 et 4.9). Ce résultat est conforme aux prévisions dans la mesure où les

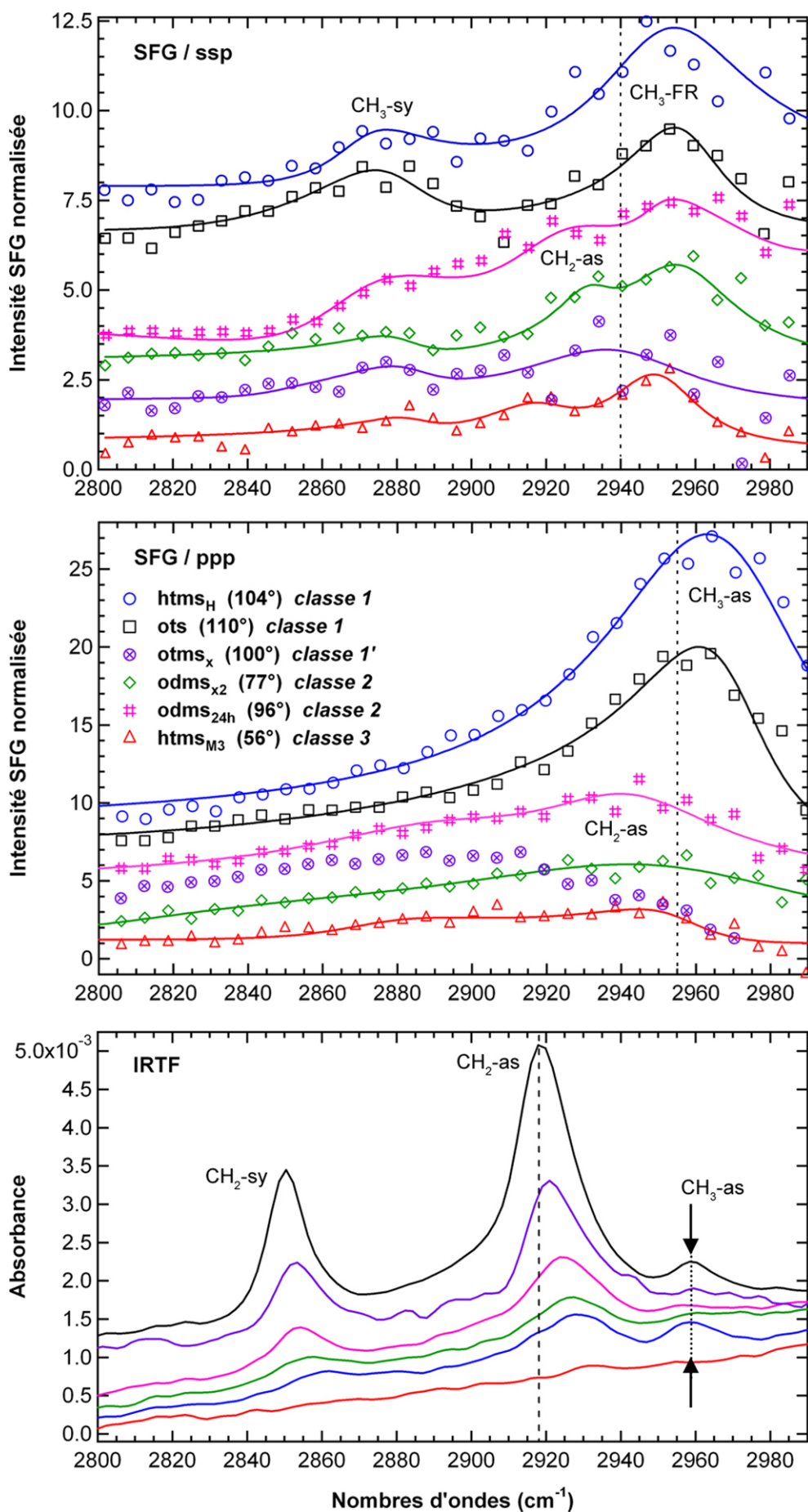


FIGURE 4.10: Spectres SFG obtenus au cours de la deuxième série d'expériences (1). Les spectres IR des substrats correspondants sont réindiqués ici. La correspondance s'effectue au niveau des couleurs employées. Si un doute subsiste, se référer à la figure 4.5.

deux substrats ne diffèrent que par la présence sur l'odms de polymères (présents en excès dans la solution de greffage) physisorbés sur la monocouche de monomères chimisorbés au verre (cf. [figure 4.2](#)). De même que l'angle de contact, la SFG n'est pas sensible à cet excès de molécules complètement désordonnées. Ces dernières peuvent ainsi être assimilées à un milieu doté d'une symétrie centrale, puisque toutes les contributions potentielles provenant de ces molécules s'annulent entre elles. C'est donc la monocouche de monomères d'ODMS chimisorbée au verre qui représente l'interface « véritable » de ce substrat avec l'environnement extérieur, et génère le rayonnement SFG visible sur les spectres. Cette monocouche est, comme on l'a vu, relativement désordonnée.

Il en va de même pour la monocouche générée par l'odms_{24h}, qui ne peut en aucun cas être assimilée à une surface de classe 1, bien que l'angle de contact généré ($\sim 96^\circ$) reflète une concentration surfacique de monomères approchant celle d'une telle surface ($\theta \approx 105^\circ$ pour l'otms). Cette augmentation de la quantité de matériel adsorbé, par rapport à l'odms_{x2} ($\theta \approx 77^\circ$), s'accompagne d'une intensité plus grande du pic $\text{CH}_3\text{-sy}$, qui reflète une légère hausse de l'organisation surfacique des monomères. Cela peut, corrélativement aux spectres IR, indiquer que l'odms_{24h} exhibe quelques groupes CH_3 organisés de façon cohérente au sein de la monocouche, qui n'apparaît malgré tout pas aussi organisée que les surfaces de classe 1. C'est aussi le cas de l'otms_x, qui bien que formant à l'origine une monocouche au sein de laquelle les monomères ont la possibilité de former des liaisons latérales (cas des surfaces de classe 1), apparaît aussi désordonnée que les monocouches de classe 2. L'incomplétude de cette monocouche ($\theta \approx 100^\circ$ pour l'otms_x contre $\theta \approx 105^\circ$ pour l'otms) est probablement à l'origine de ce résultat.

Nous profitons de cette occasion pour introduire une nouvelle classe de surface auto-assemblée, que nous nommons « classe 1' », et qui correspond au substrat otms_x. Cette monocouche s'apparente dans les faits à une surface de classe 2, dont elle partage les propriétés relevant de l'état organisationnel de la surface. Seul le protocole d'élaboration permet donc de distinguer les surfaces de classe 1' des surfaces de classe 2.

Parmi tous les substrats exposés à la [figure 4.10](#), l'htms_{M3} expose des pics très peu intenses, ressemblant en cela aux spectres SFG de l'htms_{M1} présentés au cours de la section précédente ([figure 4.9](#)). Cela pourrait refléter, une fois encore, la faible quantité de groupes méthyle adsorbés au verre, comme indiqué à la fois par le spectre IR et l'angle de contact ($\theta \approx 56^\circ$, contre 77° et 96° pour l'odms_{x2} et l'odms_{24h} respectivement), bien que ce dernier soit optimal dans les conditions de solvant utilisées pour la fabrication de ce substrat. Cette interprétation est cautionnée par la comparaison faite avec les spectres de l'htms_{M1} ($\theta \approx 38^\circ$), qui ne présentaient aucun pic visible, alors que le spectre ssp de l'htms_{M3} expose des pics $\text{CH}_3\text{-sy}$, $\text{CH}_2\text{-as}$ et $\text{CH}_3\text{-FR}$. L'augmentation de la quantité de matériel permettrait alors à ces pics d'apparaître. Toutefois, leurs faibles intensités ainsi que leurs nombres d'ondes d'apparition ne suggèrent pas que la monocouche formée ($\text{rms} \approx 0,3 \text{ nm}$) soit plus ordonnée que celle des monocouches de classe 2 discutées précédemment. Elles ne permettent pas non plus de conclure au sujet de l'éventuelle formation d'une monocouche plus désordonnée à l'échelle locale, bien qu'un substrat d'ods (classe 2) à l'angle de contact approchant ($\theta \approx 60^\circ$ contre $\theta \approx 56^\circ$ pour l'htms_{M3}) soit susceptible de générer des pics $\text{CH}_2\text{-as}$ et $\text{CH}_3\text{-FR}$ plus intenses ([figure 4.11](#), spectre ssp), montrant en cela qu'une quantité moindre de matériel adsorbé n'est pas forcément l'unique responsable de la présence ou de l'absence d'éventuels pics, ainsi que de leurs intensités relatives.

Le même raisonnement peut être appliqué aux substrats odms_{x1} et odms_{x2}, dont les spectres ssp et ppp sont qualitativement et quantitativement très similaires ([figure 4.11](#)), bien que la quantité de matériel adsorbée au verre soit plus importante pour l'odms_{x2} ($\theta \approx 77^\circ$) que pour l'odms_{x1} ($\theta \approx 55^\circ$). Le spectre ppp de ce dernier est d'ailleurs remarquablement semblable au spectre ppp de l'htms_{M3}, pour lequel des pics apparaissent assez clairement vers 2885 cm^{-1} ($\text{CH}_3\text{-sy}$) et vers 2945 cm^{-1} ($\text{CH}_2\text{-as}$). Les similitudes entre spectres SFG, spectres IR, et mesures d'angles de contact pour l'htms_{M3} et l'odms_{x1}, laissent à penser que ce dernier peut s'apparenter à une surface de classe 3, nonobstant les différences ayant trait aux procédés de fabrication des deux substrats. Ce point fera l'objet de vérifications dans la partie suivante dédiée aux expériences de mouillage.

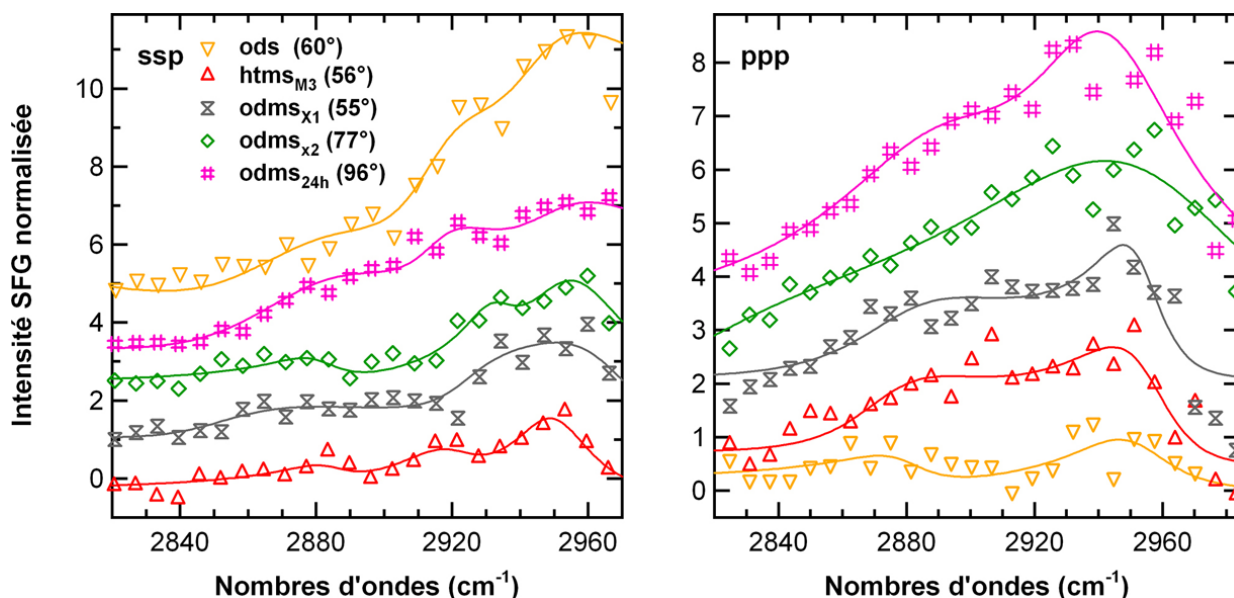


FIGURE 4.11: Spectres SFG obtenus au cours de la deuxième série d'expériences (2). Les nombres entre parenthèses indiquent les angles de contact mesurés pour l'eau. Les spectres de l' $odms_{x2}$, de $odms_{24h}$, et de $htms_{M3}$ sont les mêmes que ceux représentés à la figure 4.10.

En attendant, de la même manière que pour l' $otms_x$ (classe 1') vis-à-vis de l' $otms$ (classe 1), introduisons la classe 2', dont le procédé de fabrication est celui d'une surface de classe 2, mais dont les propriétés d'état de surface semblent devoir s'apparenter à celles d'une surface de classe 3. Les résultats obtenus en termes de mesures d'angle de contact de l'eau et des spectres IR et SFG nous conduisent à ranger l' $odms_{x1}$ et l'échantillon d' ods analysé dans la classe 2'.

Précisons enfin que le substrat $htms_{Hx}$ ($\theta \approx 98^\circ$) n'a été analysé ni par IR ni par SFG. Nous pouvons cependant émettre l'hypothèse que les conclusions quant à l'organisation des terminaisons exposées en surface de ce substrat sont identiques à celles s'appliquant aux spectres ssp et ppp de l' $otms_x$ ($\theta \approx 100^\circ$). Ces substrats sont structurellement proches, puisque la seule différence existant entre les deux monomères dont ces substrats sont issus (l'HTMS et l'OTMS) se situe dans la longueur de leur chaîne latérale (respectivement composée de 5 et 17 groupes CH_2). Nous avons en outre pu observer au cours de la première série d'expériences que l'ordre surfacique de la monocouche chimisorbée au verre était similaire d'un substrat à l'autre pour des monocouches complètes ($otms$ et $htms_H$), élaborées à partir de ces deux monomères et préparées de la même manière. Par extension, nous pouvons donc supposer que le gain entropique constaté de l' $otms$ à l' $otms_x$ est similaire de l' $htms_H$ à l' $htms_{Hx}$. Au final, l'état de surface qui caractérise l' $htms_{Hx}$ est probablement le même que celui qualifiant l' $otms_x$, à savoir une monocouche incomplète de classe 1', comme nous l'avons définie précédemment.

Pour conclure ces analyses, admettons que les spectres SFG, s'ils sont en mesure de discriminer de façon très précise les surfaces de classe 1 (ots , $otms$, $htms_H$) des autres classes de surfaces, ne fournissent pas d'éléments suffisamment pertinents pour distinguer clairement les surfaces de classe 2 ($odms$, $odms_{x1}$, $odms_{24h}$) ou 1' ($otms_x$, $htms_{Hx}$) des surfaces de classe 3 ($htms_{M1}$, $htms_{M3}$) ou 2' ($odms_{x1}$, ods). Afin d'opérer ce distinguo, nous avons eu recours à l'analyse des énergies de surface, déterminées par des expériences de mouillage.

4.3 Détermination des énergies libres des surfaces

En préambule à cette section, réindiquons que les surfaces ayant fait l'objet des expériences de mouillage proviennent d'échantillons différents que ceux utilisés pour les analyses spectroscopiques. En effet, ces dernières ont été effectuées à partir de lames rectangulaires d'environ 1 mm d'épaisseur (cf. chapitre 2), alors que les expériences de mouillage ont été réalisées sur les lamelles rondes

d'épaisseur 100 μm , ayant également servi à la culture cellulaire. Cette différence de substrat-support des différents greffages n'est pas critique, puisque le verre formant les lames et les lamelles est identique. L'important est ici de souligner que les mesures d'angles de contact indiquées, pour chaque lame ayant subi les analyses IR et SFG dans la partie précédente, ont été réalisées indépendamment des expériences que nous présentons ci-dessous. Cela explique que pour certains substrats, ces mesures d'angles diffèrent entre les analyses spectroscopiques et les analyses de mouillage.

Toutefois, les mesures sont identiques pour la majorité des substrats présentés. Seul les substrats par nature hétérogènes, et/ou dont le mécanisme d'adsorption au verre est particulièrement instable, ont vu leur angle de contact de l'eau varier plus ou moins d'un échantillon à l'autre. C'est le cas de l'odms_{x1}, pour lequel l'angle de contact de l'eau passe de 55° à 59° de la lame aux lamelles. C'est aussi, mais dans des proportions plus importantes, le cas de l'ods, dont l'unique échantillon, analysé en IR et SFG, voyait l'eau former un angle d'environ 60° sur sa surface, tandis que l'angle moyen formé sur les échantillons ayant servi aux expériences de mouillage était d'environ 82°. Cet angle a d'ailleurs été observé (dans nos expériences) comme pouvant monter jusqu'aux environs de 92°, ce qui reflète bien l'instabilité corrélative à la chimisorption de l'ODS. Le substrat ods, précédemment rangé dans les surfaces de classe 2', est donc susceptible de revenir prendre sa place au sein des surfaces de classe 2, en compagnie de l'odms_{x2}, dont la mouillabilité lui est proche ($\theta_{\text{H}_2\text{O}} \approx 77^\circ$).

Toutes les données obtenues pour tous les substrats concernant les mesures de rugosité, les mesures des angles de contact pour tous les liquides, ainsi que l'extraction des énergies libres *via* Zisman et Owens–Wendt, sont récapitulées au sein du [tableau 4.2](#). Signalons au passage que la mesure de la rugosité de la lamelle otms a donné lieu à une valeur de rms d'environ 0,3 nm, contrairement à la mesure effectuée sur la lame analysée en IR et SFG, qui indiquait une valeur d'environ 1,5 nm. Cette disparité renforce l'idée, développée au début de ce chapitre, que des amas de polymères, en excès dans la solution de greffage, sont parfois susceptibles de venir se physisorber par-dessus la monocouche auto-assemblée au verre. L'origine de la disparition de ces amas de molécules sur la lamelle peut être imputée à la sensibilité des processus de greffage ou à la qualité du rinçage effectué.

TABLEAU 4.2: Données collectées par AFM et par mesures d'angles de contact pour les surfaces CH_3 . Les angles de contact sont mesurés pour les liquides suivants : eau (H_2O), glycérol (GL), formamide (FA), hexadécane (HD), tétradécane (TD), dodécane (DD), undécane (UD) et octane (OC). γ_s^d et γ_s^p sont les composantes respectivement dispersives et polaires de l'énergie de surface totale ($\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$). γ_c est l'énergie critique de surface, θ_{AR} la différence entre les angles d'avancée et de recul. La rugosité est indiquée par la valeur du rms mesuré (en \vec{z}) pour des surfaces de 1 μm^2 (en \vec{x}, \vec{y}).

Substrat (classe)		ots (1)	ods (2)	otms (1)	htms _H (1)	htms _{Hx} (1')	htms _{M1} (3)	htms _{M3} (3)	odms _{x1} (2')	odms _{x2} (2)	odms _{24h} (2)
$\theta_{\text{H}_2\text{O}}$	<i>deg</i>	110	82	105	104	98	38	56	59	77	96
θ_{GL}	<i>deg</i>	99	77	92	91	87	34	51	51	68	81
θ_{FA}	<i>deg</i>	90	68	89	83	83	31	45	45	58	75
θ_{HD}	<i>deg</i>	40	31	29	34	21	6	11	12	13	24
θ_{TD}	<i>deg</i>	35	7	15	26	12	-	-	-	-	7
θ_{DD}	<i>deg</i>	31	-	-	16	-	-	-	-	-	-
θ_{UD}	<i>deg</i>	27	-	-	12	-	-	-	-	-	-
θ_{OC}	<i>deg</i>	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ_c	mNm^{-1}	19,9	23,0	23,7	22,7	24,9	26,5	25,7	26,8	26,7	24,0
γ_s^d	mNm^{-1}	21,5	23,7	24,2	23,1	25,8	27,3	27,0	26,8	26,8	25,2
γ_s^p	mNm^{-1}	0,1	6,9	0,3	0,6	1,2	32,6	20,9	18,5	8,2	1,6
γ_s	mNm^{-1}	21,6	30,6	24,5	23,6	26,9	59,9	47,9	45,3	35,0	26,8
rms	<i>nm</i>	0,3	0,3	0,3	1,4	0,4	0,9	0,3	0,3	0,3	0,3
θ_{AR}	<i>deg</i>	12	17	12	30	12	32	22	25	14	11

4.3.1 Composantes polaire (γ_s^p) et dispersive (γ_s^d) de l'énergie de surface du solide (γ_s , avec $\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$)

Cas des substrats ots, otms et htms_H (classe 1)

La tension de surface totale γ_s des surfaces ots, otms et htms_H (classe 1), pour lesquelles les spectres SFG sont similaires (figures 4.9 et 4.10), est très majoritairement composée de la composante dispersive γ^d , la composante polaire γ^p étant voisine de zéro (figure 4.12). Partant de la considération que cette composante γ^p n'est nullement générée par les groupes méthyle (CH₃), cela indique que très peu de groupes hydroxyle (OH) sont exposés. Ce résultat supporte le concept d'un arrangement « serré » des monomères et son corollaire : le recouvrement complet de la surface de verre.

Cas des substrats ods, odms_{x2}, odms_{24h} (classe 2) et htms_{Hx} (classe 1')

Comme attendu, les surfaces ods et odms_{x2} (classe 2) exposent une composante polaire γ^p plus intense que les surfaces de classe 1. Ce résultat suggère la présence de groupes OH exposés en surface, en bon accord avec l'existence de chaînes alkyle désorganisées, la faible intensité des pics enregistrés en infrarouge, et la valeur moindre des angles de contact en comparaison des surfaces de classe 1.

Rappelons que l'htms_{Hx} (classe 1') est élaboré en agitant la solution de greffage, de façon à prévenir la suradsorption de polymères en excès au sein de la solution ($r_{ms} \approx 0,3$ nm pour l'htms_{Hx} contre $\sim 1,4$ nm pour l'htms_H). Cette agitation a pour effet la diminution de la cinétique d'adsorption, résultant dans la formation d'une monocouche incomplète ($\gamma_{H_2O} \approx 98^\circ$ contre $\sim 104^\circ$ pour la monocouche complète). L'incomplétude de cette monocouche est reflétée par une légère augmentation du γ^p entre l'htms_H ($0,6$ mN m⁻¹) et l'htms_{Hx} ($1,2$ mN m⁻¹). Cependant, cette valeur du γ^p peut sembler trop faible pour permettre la distinction des classes 1 et 1'. C'est ici que nous faisons réintervenir la SFG, dont les spectres ssp et ppp de l'otms_x ($\gamma_{H_2O} \approx 100^\circ$), lui aussi monocouche incomplète de classe 1', montraient clairement la désorganisation des monomères, par rapport à l'otms ($\gamma_{H_2O} \approx 105^\circ$).

L'odms_{24h} représente l'adsorption pour laquelle la durée de présence en solution des monomères est suffisamment longue pour que l'ODMS recouvre le verre de façon optimale dans ces conditions ($\gamma_{H_2O} \approx 96^\circ$). L'odms_{24h} concentre plus de molécules en surface que l'odms_{x1} ou l'odms_{x2}, comme indiqué à la fois par les spectres IR et par les mesures d'angles de contact. Les composantes de sa tension de surface γ_s ressemblent à celles des surfaces de classe 1, pour lesquelles γ^p est proche de zéro. Toutefois, le γ^p de l'odms_{24h} ($\sim 1,6$ mN m⁻¹) reste supérieur à celui des surfaces de classe 1 ($\leq 0,6$ mN m⁻¹). En outre, et pareillement aux surfaces de classe 1', les spectres SFG ont montré l'état désorganisé de la monocouche composant le substrat odms_{24h}. Ce dernier ne peut donc partager les propriétés locales des énergies de surfaces propres aux surfaces de classe 1, bien que la distribution de ses composantes polaire et dispersive leur soit très semblable au niveau macroscopique (figure 4.12).

La tension de surface totale d'un substrat CH₃ parfaitement homogène ou presque nous est donnée par le γ_s du substrat ots ($\sim 21,6$ mN m⁻¹), proche de l'énergie critique γ_c du même substrat obtenue par un « Zisman plot » ($\sim 19,9$ mN m⁻¹, ou plutôt $\sim 21,3$ mN m⁻¹ comme on a pu le voir au cours du chapitre 3, cf. figure 3.9). Pour une surface de verre propre, les estimations varient de 150 à 300 mN m⁻¹ [50, 98] (la valeur de 300 mN m⁻¹ correspondant environ à la tension de surface du verre fondu). La remarque suivante revêt donc une importance capitale : bien que la contribution polaire γ^p ajoutée à la tension dispersive γ^d soit relativement faible pour les surfaces de classe 2 ou assimilées (classe 1'), avec des variations suivant les substrats oscillant suivant $1,2$ mN m⁻¹ $\leq \gamma^p \leq 8,2$ mN m⁻¹, les variations locales des énergies de surface, autrement dit les gradients locaux d'énergie d'adhésion, peuvent atteindre des valeurs beaucoup plus importantes (20 mN m⁻¹ $\leq \gamma_c \leq 150$ mN m⁻¹).

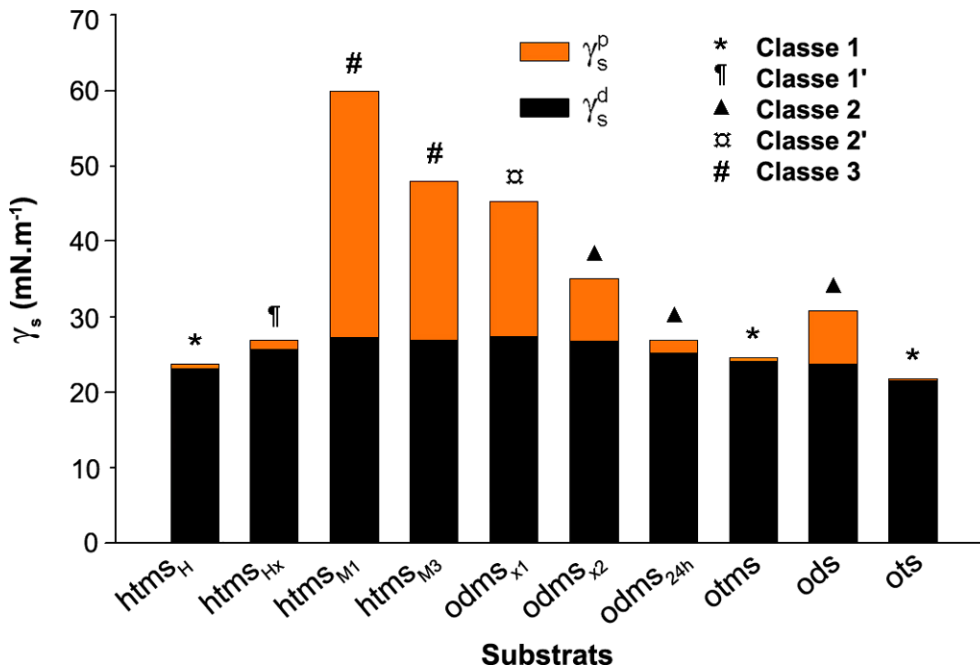


FIGURE 4.12: Distribution des composantes dispersives (γ_s^d) et polaires (γ_s^p) de l'énergie de surface des substrats de verre modifiés par auto-assemblage d'alkylsiloxanes à terminaison CH_3 .

Cas des substrats htms_{M1}, htms_{M3} (classe 3) et odms_{x1} (classe 2')

Les surfaces htms_{M1} et htms_{M3} (classe 3) exposent des contributions polaires γ^p ($\geq 20,9 \text{ mN m}^{-1}$) à la fois supérieures à celles des surfaces de classe 1 ($\leq 0,6 \text{ mN m}^{-1}$), des surfaces de classe 1' ($\leq 1,2 \text{ mN m}^{-1}$) ainsi que des surfaces de classe 2 ($\leq 8,2 \text{ mN m}^{-1}$). La contribution polaire γ^p de l'htms_{M3} ($\sim 20,9 \text{ mN m}^{-1}$), moindre que celle de l'htms_{M1} ($\sim 32,6 \text{ mN m}^{-1}$) indique qu'une quantité plus importante de molécules d'HTMS est adsorbée au verre dans le cas de l'htms_{M3}. Ce résultat paraît logique compte-tenu de l'augmentation de la durée d'adsorption de l'HTMS, de l'htms_{M1} ($\sim 16 \text{ h}$) à l'htms_{M3} ($> 72 \text{ h}$). La valeur de la rugosité mesurée pour l'htms_{M1} ($\text{rms} \approx 0,9 \text{ nm}$) peut s'interpréter de deux façons distinctes : soit cette hausse de la rugosité (par rapport à celle du verre propre ou d'une monocouche d'alkylsiloxanes, pour lesquels le rms avoisine les $0,3 \text{ nm}$) est significative d'un excès de molécules physisorbées, comme observé précédemment pour des substrats tels que l'odms ou l'htms_H. Soit elle reflète la polymérisation verticale de l'HTMS dans les conditions de solvant utilisées pour l'élaboration de ce substrat. Elle signe dans ce cas la présence de plusieurs couches de polymères à la fois superposées et liées entre elles par des liaisons chimiques (cf. chapitre 2, page 51). La bonne reproductibilité de ce résultat d'un échantillon à l'autre fait pencher la balance en faveur de cette hypothèse. En outre, et contrairement à des substrats tels que l'odms ou l'htms_H, il n'a pas été possible de réduire, même de façon minimale, le rms de l'htms_{M1} en pratiquant de multiples rinçages ou procédures de sonication. Enfin, l'interprétation de la topographie de l'htms_{M1} évaluée par AFM (figure 4.13) va dans le même sens. Là où un substrat d'htms_H partiellement nettoyé des polymères physisorbés laisse apparaître sa monocouche primordiale, l'hypothétique monocouche de l'htms_{M1} ne se révèle pas aussi clairement. Les deux substrats partagent pourtant la même valeur de rms ($\sim 0,9 \text{ nm}$).

L'htms_{M3} expose quant à lui un rms voisin de celui du verre ou d'une monocouche homogène (i.e., $\sim 0,3 \text{ nm}$). Il apparaît ainsi que les molécules d'HTMS ont pu se lier chimiquement à la majorité des sites silanol disponibles en surface. De plus, l'angle de contact de l'eau n'a pu être augmenté en allongeant la durée d'adsorption de l'HTMS dans la solution de greffage à base de méthanol et d'eau à 4%. Ce résultat suggère, comme indiqué au cours de la section précédente, l'adsorption optimale du HTMS dans ces conditions. Néanmoins, la quantité totale d'HTMS adsorbé reste relativement faible, ainsi que le montrent les spectres IR et la mesure de l'angle de

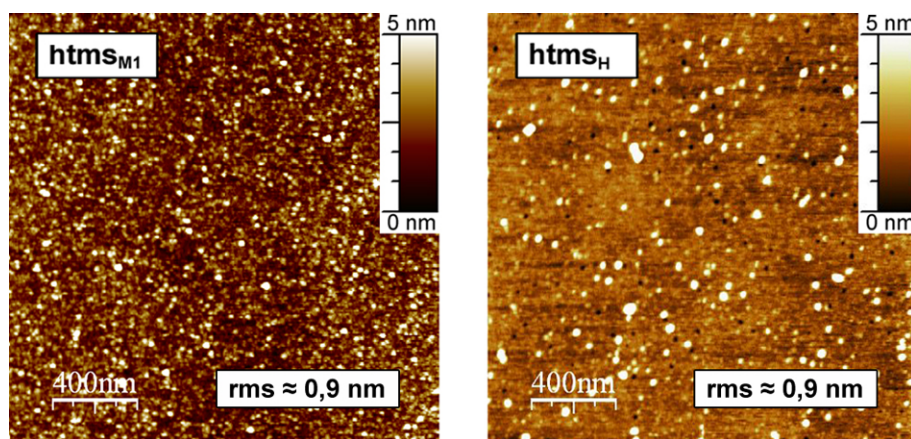


FIGURE 4.13: Tentative de mise en évidence de la polymérisation verticale subi par l'htms_{M1} (images AFM). La rugosité, bien qu'identique en valeur mesurée pour le rms des surfaces de l'htms_H et de l'htms_{M1}, semble due à des processus d'altération de la surface différents d'un substrat à l'autre.

contact de l'htms_{M3} ($\theta_{\text{H}_2\text{O}} \approx 56^\circ$). Par conséquent, la plupart des contributions dispersives γ^d à l'énergie de surface γ_s de l'htms_{M3} est fournie par les groupes OH présents en surface. En effet, la valeur du γ^d des surfaces de classe 3 (htms_{M1} et htms_{M3}) est supérieure à celle des substrats de classe 1, composés quasi-uniquement de terminaisons CH₃, c'est donc la seule explication possible.

En définitive, les substrats htms_M présentent une composition chimique qui peut se concevoir comme étant similaire à celle du verre propre, où de nombreux groupes OH sont exposés, à la différence notable que ces groupes silanol sont accompagnés d'une distribution hétérogène de groupes CH₃. Inversement, les surfaces de classe 2 ou 1' exposent majoritairement des groupes CH₃, accompagnés de plus (ods et odms_{x2}) ou moins (odms_{24h}, htms_{Hx}) de groupes OH dispersés en surface. L'odms_{x1} représente un cas particulier, dans la mesure où, d'une part, la formation de sa monocouche s'apparente à celle d'une surface de classe 2, et d'autre part, l'ordonnement de ses groupes CH (figure 4.11) et la distribution relative des composantes polaire et dispersive de sa tension de surface (figure 4.12) s'apparentent en tout point à ceux de l'htms_{M3}, surface de classe 3. En outre, l'odms_{x1} et l'htms_{M3} partageant les mêmes valeurs de rugosité ($\sim 0,3$ nm), il est impossible ici d'établir une quelconque différence de nature quant à la qualité finale des surfaces présentées, bien que leurs modes d'adsorption diffèrent.

4.3.2 Énergie critique de surface (γ_c)

Les valeurs de γ_c déterminées pour tous les substrats par des Zisman plots (figure 4.14), sont en accord avec les résultats présentés plus haut. L'énergie critique de surface γ_c peut être assimilée au γ_s^d de surfaces solides présentant un γ^p relativement peu élevé [51], ce qui est le cas de nos substrats à terminaison CH₃. Cette équivalence se retrouve dans nos résultats puisque la différence constatée entre γ_c et γ_s^d n'excède jamais $1,6 \text{ mN m}^{-1}$ (tableau 4.2). Par ailleurs, γ_c croît toujours d'un substrat « désordonné » à un substrat plus ordonné élaboré à partir de la même molécule. Ainsi nous obtenons les relations suivantes :

$$\gamma_c(\text{ots}) < \gamma_c(\text{ods}), \quad (4.1)$$

$$\gamma_c(\text{otms}) < \gamma_c(\text{odms}_{24h}) < \gamma_c(\text{odms}_{x2}) < \gamma_c(\text{odms}_{x1}), \quad (4.2)$$

$$\gamma_c(\text{htms}_H) < \gamma_c(\text{htms}_{Hx}) < \gamma_c(\text{htms}_{M3}) < \gamma_c(\text{htms}_{M1}). \quad (4.3)$$

Globalement, les valeurs de γ_c se situent toutes dans un intervalle assez réduit ($19,9 \text{ mN m}^{-1} < \gamma_c < 26,8 \text{ mN m}^{-1}$), supportant l'idée que tous ces substrats sont plus comparables en termes

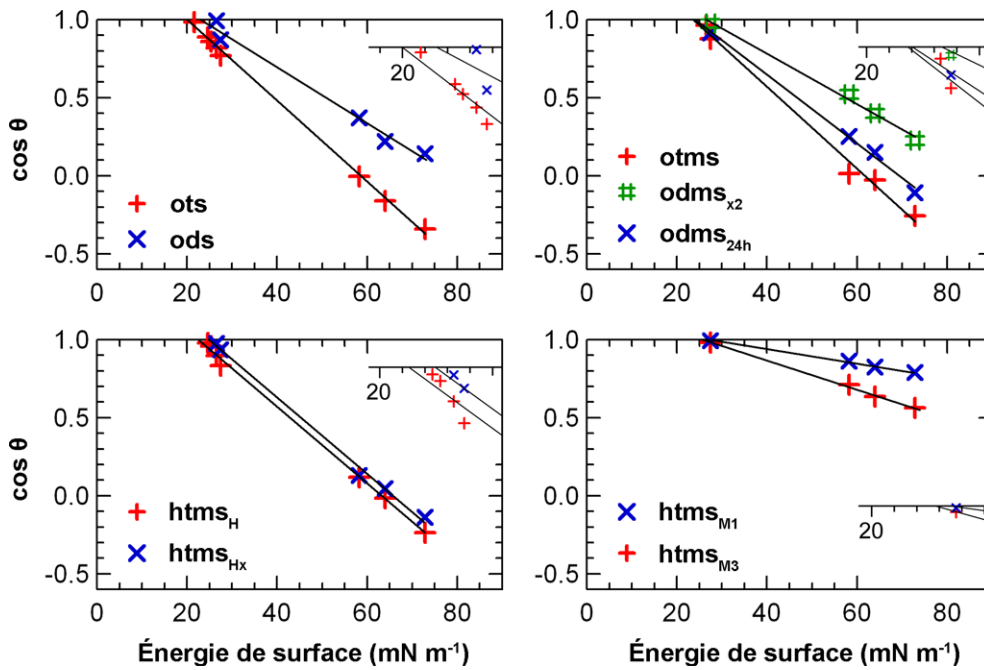


FIGURE 4.14: Détermination des énergies critiques de surface γ_c des substrats par le tracé des Zisman plots. γ_c est obtenu à l'intersection des fits linéaires réalisés pour tous les points avec la droite d'équation $\cos \theta = 1$. Bien que les Zisman plots soient différents d'un substrat à l'autre, ils se rejoignent tous aux environs de leurs γ_c respectifs, qui sont donc du même ordre de grandeur. Le fit linéaire déterminant le γ_c de l' odms_{x1} est quasi-équivalent à celui tracé pour l' htms_{M3} . Il n'est pas représenté pour plus de clarté.

de distribution d'énergie de surface à l'échelle nanométrique qu'en termes de tension de surface totale. Seule une surface telle que le verre propre ($\gamma_c \geq 150 \text{ mN m}^{-1}$) pourrait *a priori* être exclue de toute comparaison à ce sujet. Le rappel de cette valeur peut néanmoins permettre d'établir une nuance à la considération faite précédemment au sujet des surfaces htms_M ou de l' odms_{x1} , à savoir qu'elles sont des surfaces conceptualisées comme du verre « agrémenté » de terminaisons méthyle éparses. Bien que la quantité de groupes CH_3 adsorbés sur ces surfaces soit plutôt faible, ainsi que les spectres IR le soulignent (figures 4.1 et 4.5), la valeur du γ_c tombe d'un minimum de $\sim 150 \text{ mN m}^{-1}$ (verre propre) à $\sim 27 \text{ mN m}^{-1}$ (htms_M et odms_{x1}).

Deux appréciations distinctes sont envisageables. Ou bien le γ_c se révèle extrêmement sensible à la moindre modification d'une surface de verre propre. On peut ainsi établir une hypothèse sur l'influence de la densité surfacique des groupes CH_3 . Dans ce cas, on imagine que son seuil critique, au-delà duquel ces groupes entraînent une modification profonde des propriétés macroscopiques de la surface du verre, est atteint très rapidement. Ou bien la quantité de groupes CH_3 , bien que difficilement détectable par spectroscopie infrarouge, est relativement élevée, comme le laissent supposer les angles de contact relevés, en particulier pour des substrats tels que l' htms_{M3} et l' odms_{x1} . Une façon de vérifier cette hypothèse consisterait à faire de la spectroscopie IR sur du verre en poudre modifié [89], ce qui permettrait de démultiplier la surface soumise au rayonnement, et donc d'augmenter la sensibilité du signal vis-à-vis de ces surfaces. Toutefois l'angle de contact fournit un indicateur fiable que nous considérons suffisant dans le cadre de nos expériences, ainsi que nous l'avons plusieurs fois démontré. Nous pouvons donc raisonnablement pencher vers la seconde hypothèse pour expliquer nos résultats.

4.3.3 Contrôle de l'état de surface par la mesure de θ_{AR}

Les valeurs relevées pour l'écart entre l'angle d'avancée et de recul θ_{AR} sont en bon accord avec la rugosité et la distribution des composantes des énergies de surfaces exposées ci-dessus. Parmi les substrats pour lesquels une rugosité très faible de 0,3 nm est mesurée, ceux qui génèrent les

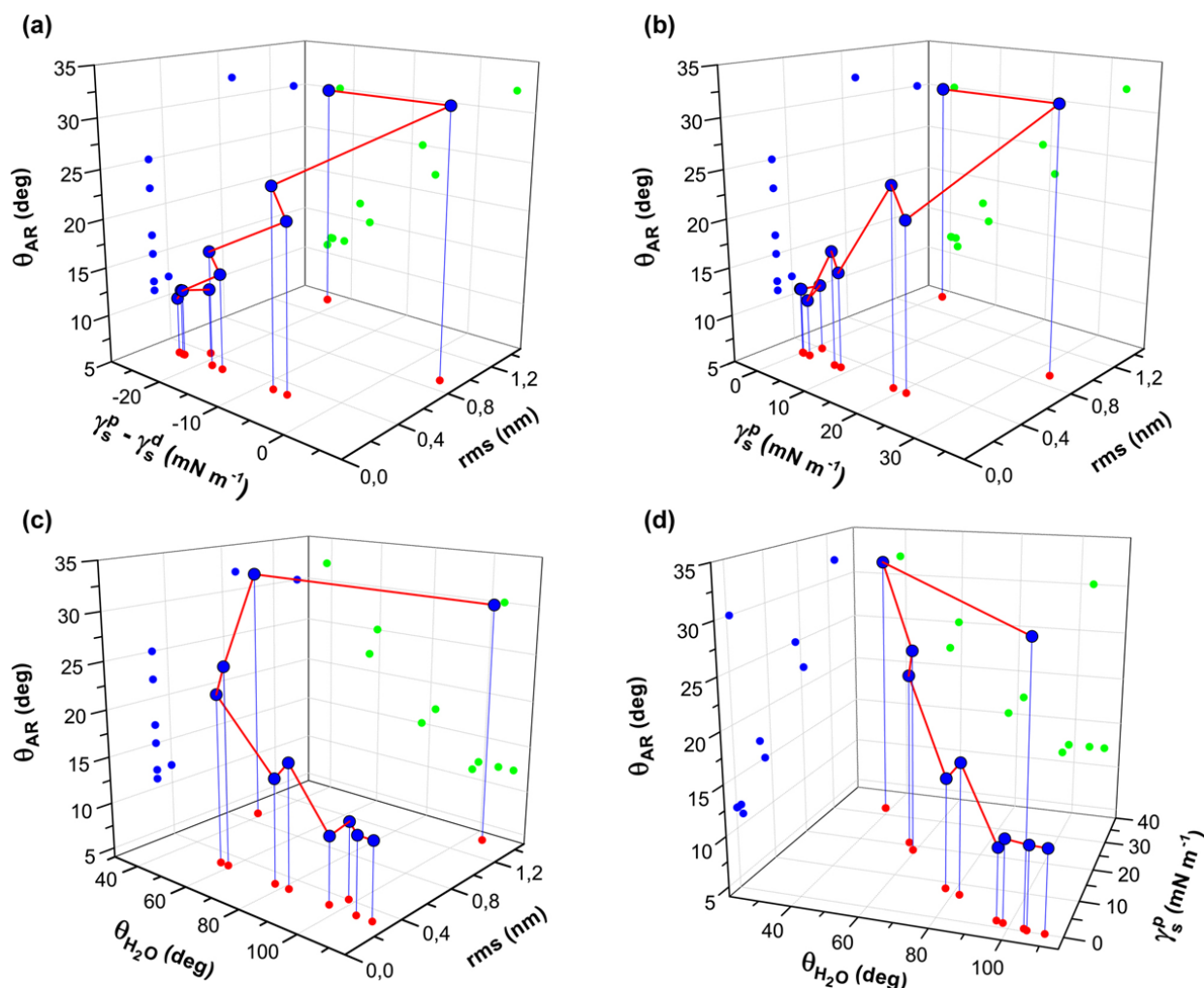


FIGURE 4.15: Graphiques représentant θ_{AR} en fonction de γ_s^p , $(\gamma_s^p - \gamma_s^d)$, γ_{H_2O} , et de la nanorugosité des surfaces (représentée par la valeur du rms).

contributions polaires γ^p les plus faibles génèrent aussi les plus faibles valeurs de θ_{AR} (tableau 4.2). Pour l'ods et l'odms_{x2}, dont les contributions polaires sont supérieures à celles des substrats ots, otms, odms_{24h}, htms_H et htms_{Hx} (figure 4.12 et tableau 4.2), θ_{AR} est aussi supérieur ($\sim 14\text{--}17^\circ$ contre $\sim 12^\circ$). θ_{AR} est encore plus élevé pour l'htms_{M3} ($\sim 22^\circ$) et pour l'odms_{x1} ($\sim 25^\circ$) dont les tensions de surface sont localement plus hétérogènes. Enfin, les valeurs les plus hautes ($\sim 30^\circ$) sont atteintes pour les surfaces exhibant la rugosité la plus élevée : htms_{M1} (rms $\approx 0,9$ nm) et htms_H (rms $\approx 1,4$ nm). L'obtention d'une monocouche très organisée de classe 1 mais « polluée » par un excès de polymères physisorbés (sur l'htms_H) permettra d'évaluer, en comparaison de surfaces de classe 1 « propres » telles que l'ots et l'otms, l'effet éventuel de cet excès de polymères, et de la nanorugosité conséquente, sur le comportement des cellules.

La variation de θ_{AR} en fonction de la rugosité et de l'hétérogénéité chimique des surfaces est représentée par divers graphiques à la figure 4.15. On remarque premièrement que θ_{AR} varie de la même manière en fonction de $\gamma_s^p - \gamma_s^d$ (figure 4.15a) qu'en fonction de γ_s^p (figure 4.15b), ce qui est somme toute logique puisque les contributions dispersives γ_s^d des substrats sont toutes relativement identiques. L'hétérogénéité chimique de nos surfaces dépend donc principalement de la valeur des contributions γ_s^p . Même si ce résultat semble trivial, il apparaît nécessaire de le souligner. Les contributions polaires des surfaces, agissant à courte portée par rapport aux contributions dispersives, sont *a priori* sensées exercer une influence moindre sur d'éventuels objets, comme des cellules, se trouvant au voisinage de la surface. On voit cependant que c'est leur variation qui se révèle critique sur l'appréciation du degré d'homogénéité des surfaces analysées. En appliquant le même raisonnement, il apparaît aussi logique que l'hétérogénéité chimique soit corrélée à l'angle

de contact de l'eau (figure 4.15c). Dans la combinaison des liquides employés pour déterminer les composantes γ_s^d et γ_s^p des surfaces (H_2O , n-hexadécane), seule l'eau possède une composante γ_L^p dans sa tension de surface. Seule l'eau est donc capable de jouer le rôle de sonde pour les énergies d'origine polaire des surfaces méthyle. Cette relation est clairement illustrée par la variation quasi-linéaire reliant à la fois θ_{AR} à γ_s^p et $\gamma_{\text{H}_2\text{O}}$ (figure 4.15d).

Plus généralement, on observe deux tendances de variation de θ_{AR} en fonction de l'hétérogénéité chimique et de la rugosité des surfaces. Si θ_{AR} semble varier linéairement en fonction du niveau d'hétérogénéité chimique, que celui-ci soit représenté par γ_s^p , $(\gamma_s^p - \gamma_s^d)$ ou $\gamma_{\text{H}_2\text{O}}$ (figure 4.15 ; voir les projections de θ_{AR} suivant tous ces paramètres), θ_{AR} semble augmenter brutalement en fonction de la rugosité, passé un certain seuil dont le rms se situerait entre 0,3 et 0,9 nm. Toutefois, il est impossible de conclure dans la mesure où nous ne disposons pas de point situé entre les deux extrémités mesurées ($\text{rms}_{\text{min}} \approx 0,3$ nm et $\text{rms}_{\text{max}} \approx 1,4$ nm) permettant de vérifier cette hypothèse. Le point situé vers $\sim 0,9$ nm (htms_{M1}) n'est en l'occurrence pas un indicateur valable, puisque la valeur de θ_{AR} qui lui correspond peut très bien n'être due qu'à l'hétérogénéité chimique constatée pour le substrat htms_{M1} .

4.3.4 Conclusions

L'analyse par spectroscopie infrarouge, SFG et expériences de mouillage, dont la combinaison harmonieuse s'est révélée au fur et à mesure des expériences, a permis une caractérisation fine des substrats élaborés. Ces derniers ont chacun été rangés dans des classes spécifiques, dont les propriétés en termes d'ordre surfacique, et donc de distribution des énergies de surface, à l'échelle nanométrique, ont été précisément décrites. La SFG a permis de distinguer sans conteste les surfaces parfaitement ordonnées de classe 1 des autres classes de surfaces. La distinction entre les surfaces de classe 2 et 3 est rendue possible par la mesure des angles de contact, le modèle Owens-Wendt fournissant un bon support d'analyse. Ces deux classes mettent toutes deux en jeu des surfaces relativement désordonnées, mais qui diffèrent cependant sur un point majeur : le niveau d'hétérogénéité chimique constaté, plus important pour les surfaces de classe 3.

L'analyse a par ailleurs révélée l'existence de « ponts » entre ces différentes classes, représentés par les surfaces otms_x , htms_{Hx} (classe 1', i.e. équivalente à la classe 2, mais élaborée comme une surface de classe 1) et odms_{x1} (classe 2', i.e. équivalente à la classe 3, mais élaborée comme une surface de classe 2). Parmi toutes les molécules utilisées, l'HTMS semble de loin la plus intéressante. Même si les substrats générés par l'HTMS apparaissent difficilement caractérisables par spectroscopie infrarouge, c'est la seule molécule qui, dans nos expériences, nous permet d'obtenir des surfaces pouvant chacune être rangées dans les 3 grandes classes de substrats définis : classe 1 (htms_{H}), classe 2 (htms_{Hx} , relevant plus exactement de la classe 1') et classe 3 (htms_{M}). Les mesures de rugosité effectuées par AFM ont levé le voile sur les quelques difficultés rencontrées au cours des processus de fabrication, et du même mouvement permis de contrôler la résolution de ces problèmes, mais surtout l'identification des facteurs qui leur avaient donnés naissance.

Finalement, la caractérisation poussée des substrats doit nous permettre l'identification du ou des paramètres critiques (concentration surfacique des terminaisons, mouillabilité, degré d'hétérogénéités chimiques, rugosité) engagés dans les processus influant l'adhésion et la différenciation des cellules PC12. Les expériences mettant ces cellules aux prises avec les surfaces méthyle, décrites dans ce chapitre, seront abordées au cours de la [partie II](#) (cf. [chapitre 9](#)). Avant cela, essayons de faire fructifier le savoir acquis au sujet des surfaces CH_3/OH afin de caractériser la distribution des énergies d'adhésion des surfaces NH_2/OH , dont l'analyse se révèle ardue sur bien des points.

Chapitre 5

Analyse des surfaces dotées de terminaisons amine (NH_2 ou NH_3^+)

Comme exposé au [chapitre 1](#), la réactivité des groupes amine complique les processus d'adsorption par rapport aux surfaces modifiées par des méthylalkylsiloxanes (cf. [page 40](#)). De plus, la spectroscopie vibrationnelle, IR ou SFG, se révèle peu adaptée en ce qui concerne la caractérisation des groupes NH_2 . En effet, là où la région des spectres correspondant aux vibrations CH ($\sim 2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$) est vierge de tout bruit de fond potentiel, la région des spectres correspondant à la vibration d'élongation NH ($\sim 3100\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$) est systématiquement brouillée par la vibration d'élongation OH, générée par la fine couche d'eau adsorbée sur les substrats. Pour noircir un peu plus le tableau, le groupe NH_2 produit une contribution polaire (non-dispersive) à la tension de surface totale, là où le groupe CH_3 ne générerait qu'une contribution dispersive (apolaire). De ce fait, la mise en œuvre du calcul des composantes énergétiques est compliquée, tout comme l'interprétation des résultats qui en découlent.

Afin de simplifier ce qui peut l'être, nous avons choisi une approche distincte des surfaces CH_3 , où le choix du solvant utilisé dans la fabrication impliquait parfois des différences considérables dans la nature des surfaces produites. Les surfaces NH_2 dont la préparation est basée sur l'utilisation d'aminosilanes (ADMS, APTMS, EDA, PEDDA, DETA ; cf. [figure 2.2](#)) ont donc toutes été fabriquées à partir du même solvant (cf. [tableau 2.2](#)). Par conséquent, seules les distinctions propres à la nature des molécules (longueur de la chaîne, nombre de groupes amine, présence ou absence d'un groupe phényle additionnel) sont susceptibles d'entraîner des différences dans les propriétés respectives quant à l'état de surface.

Une fois ces substrats analysés — *via* Zisman, Owens–Wendt et AFM — nous examinerons une surface de verre couverte de poly-L-lysine. Nous comparerons ses propriétés avec celles des surfaces NH_2 évoquées ci-dessus. L'influence de la durée d'adsorption sur les propriétés des surfaces modifiées par greffage d'EDA sera également abordée au cours de ce chapitre.

5.1 Surfaces de verre modifiées par chimisorption d'aminosilanes

5.1.1 Nanostructures potentielles des surfaces aminosilanisées

La nanostructure générée par la chimisorption du *monométhoxysilane* ADMS ([figure 5.1](#)) est *a priori* similaire à celle décrite pour les substrats de classe 2 analysés au chapitre précédent. La surface présentée par le substrat adms doit donc être une surface lisse présentant une distribution relativement homogène de terminaisons NH_2 . Celles-ci ne peuvent cependant pas être parfaitement ordonnées entre elles, car comme pour l'ODMS, l'absence de liaison siloxane latérale entre monomères (orientées « parallèlement » à la surface), implique que les chaînes carbonées ne soient pas stabilisées de façon optimale (c'est-à-dire, orientées « perpendiculairement » à la surface). Seul un temps de greffage prolongé, ce qui est le cas ici, peut néanmoins conduire à la formation d'une

monocouche au sein de laquelle la concentration surfacique de monomères reste relativement élevée, de façon comparable à l'odms_{24h}. Par conséquent, la surface de l'adms doit en théorie exposer une majorité de groupes NH_2 , accompagnés de quelques fonctions OH éparses.

Le cas des substrats générés par les triméthoxysilanes APTMS, EDA, PEDA et DETA, est plus épineux. Ces molécules sont susceptibles de polymériser, et donc théoriquement capables de marcher dans les pas de l'HTMS, puisque cette polymérisation peut se traduire soit par la formation d'une monocouche très ordonnée (type htms_H) ou bien très désordonnée (type htms_M). L'utilisation, pour tous les aminosilanes, de la solution de greffage à base de méthanol et d'eau à 4%, laisse supposer que les substrats générés seront plutôt désordonnés (figure 5.2). Cependant, sans preuve analytique, nous ne pouvons exclure la possibilité qu'ont ces molécules de former des monocouches très homogènes (figures 5.1 et 5.2). En effet, il est envisageable que, pour chaque molécule considérée, le greffage s'effectue en combinant deux processus distincts : l'un favorisant l'auto-assemblage de monomères venant s'accoler à ceux déjà chimisorbés en surface (figure 1.4), l'autre favorisant la polymérisation des molécules préalablement à l'adsorption au verre (figure 1.6). En outre, la polymérisation préalable peut se dérouler de façon tout aussi bien « horizontale » que « verticale », et aboutir ainsi à une surface ordonnée ou désordonnée. L'état de surface résultant est donc vraisemblablement une combinaison, particulière pour chaque molécule, des deux possibilités de conformation des oligomères chimisorbés au verre.

Il nous faut donc déterminer, pour chaque substrat, hormis l'adms qui constitue une référence sur laquelle nous pourrions éventuellement nous appuyer, vers quelle conformation, ordonnée ou désordonnée, vont préférentiellement pencher les oligomères constitués d'EDA, de PEDA, de DETA, ou d'APTMS. Ces molécules ne se distinguent que vis-à-vis de la longueur de leur chaîne latérale carbonée. Il est donc vraisemblable que d'éventuelles distinctions des états de surface des substrats seront la conséquence directe des différences de longueur de cette chaîne. Concernant son rôle clé dans le processus de polymérisation, nous pouvons émettre les hypothèses suivantes :

- i. Plus elle augmente, plus le nombre de fonctions amine qu'elle contient augmente en parallèle. Ce nombre passe ainsi de 1 (APTMS) à 3 (DETA) en passant par 2 (EDA et PEDA). Dans la configuration « monocouche ordonnée », il est possible que s'établisse un effet stabilisateur induit par la formation éventuelle de liaisons hydrogène entre groupes NH de monomères accolés [102]. Il faut donc s'attendre à ce que cet effet augmente avec la longueur de la chaîne. De même, les interactions attractives de type van der Waals entre monomères accolés seraient d'autant plus importantes que la chaîne est longue.
- ii. *A priori*, et de manière purement intuitive, l'encombrement stérique induit par la présence d'une longue chaîne latérale ne favorise pas le processus de polymérisation verticale préalable à l'adsorption. Cet éventualité va dans le même sens que l'argument précédent, et implique de concert que plus longue sera la chaîne (cas du DETA), plus la balance penchera vers l'établissement d'une monocouche ordonnée plutôt que désordonnée.

Enfin, nous pouvons établir un parallèle entre les surfaces amine et les surfaces méthyle déjà étudiées au chapitre 4, toujours concernant la longueur de la chaîne latérale. Nous avons vu que l'HTMS, plongé dans une solution de greffage identique à celle employée pour les aminosilanes, formait une surface très hétérogène. L'EDA ayant une chaîne latérale de longueur similaire à celle de l'HTMS (figure 5.3), il est donc vraisemblable que son greffage résulte également dans la formation d'une monocouche désordonnée, où le degré de polymérisation verticale est élevé par rapport au degré de polymérisation horizontale subie par la molécule. Par ailleurs, bien que la nature des terminaisons chimiques soit différente entre l'EDA (NH_2) et l'HTMS (CH_3), cette différence ne peut être considérée comme critique étant donné la solution de solvants dans laquelle le greffage a lieu. En effet, pour cette solution, la large quantité d'eau ainsi que la présence d'acide acétique garantissent l'hydrolyse rapide des groupes méthoxy liés au silicium. Ce faisant, le groupe NH_2 , potentiellement réactif, exerce une influence négligeable sur les processus de greffage par rapport aux groupes silanol néoformés de la molécule.

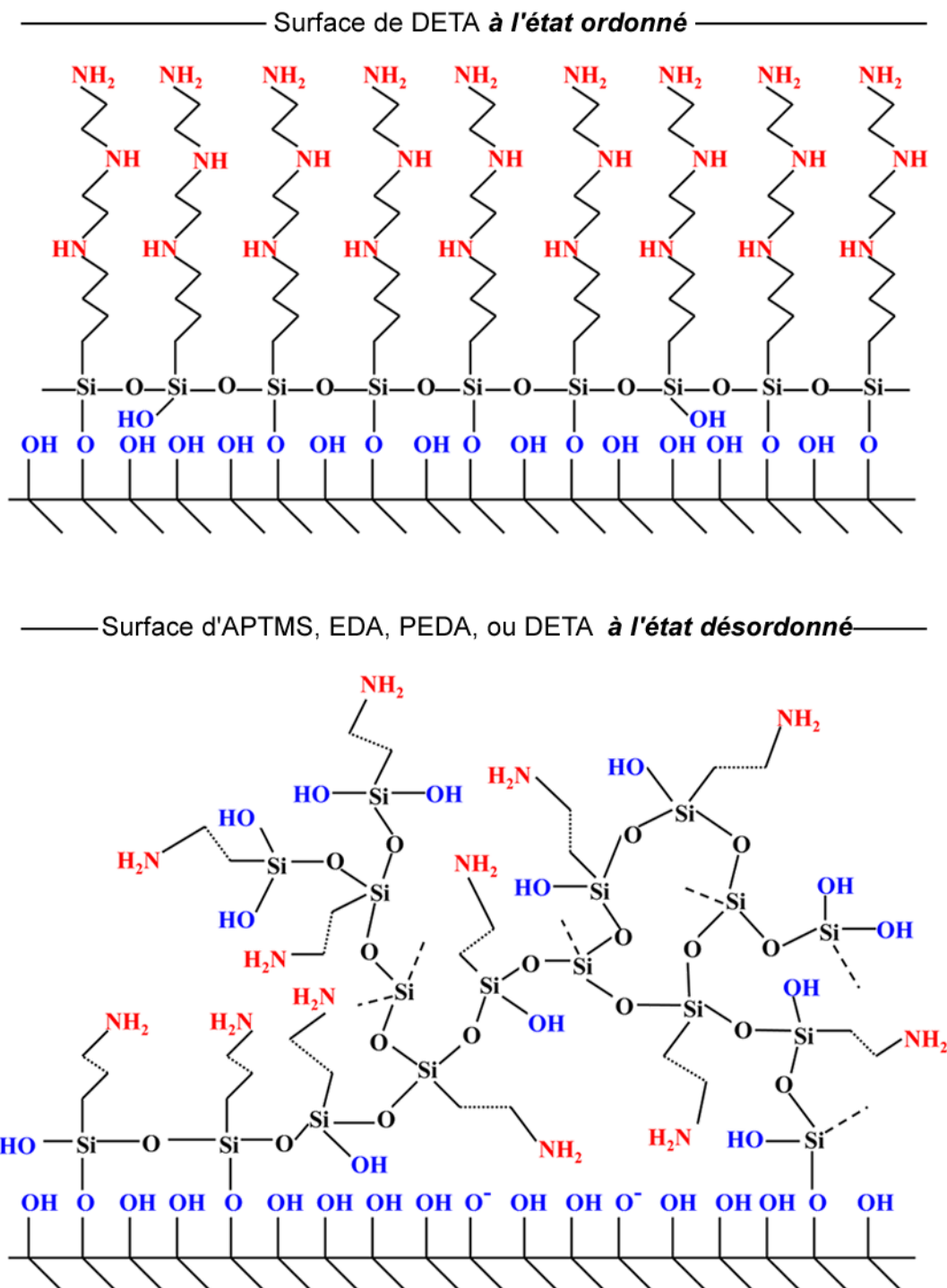


FIGURE 5.2: Illustration schématique décrivant les configurations possibles des surfaces aminosilanisées (2). La surface formée de DETA est ici représentée dans le cas théorique où la monocouche formée est très ordonnée. L'illustration située en bas de la figure 5.2 indique la configuration théorique où les monomères d'APTMS, d'EDA, de PEDA, ou de DETA s'organisent de façon très désordonnée à la surface du verre.

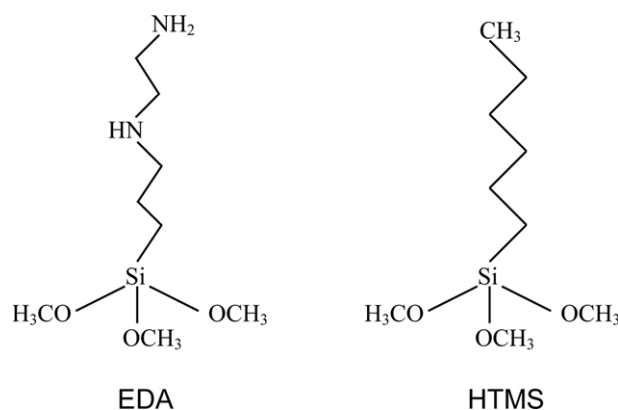


FIGURE 5.3: Illustrations schématiques de l'EDA et de l'HTMS. Cette figure est destinée à illustrer la similarité de longueur des chaînes latérales des deux molécules. On retrouve cette ressemblance dans la faculté des deux molécules à générer des surfaces de classe 3.

Les hypothèses précédentes nous conduisent donc à en formuler une nouvelle à propos de l'état de surface généré pour chacun des substrats aminosilanisés : hétérogène pour l'eda, plus homogène pour le deta, mais plus hétérogène pour l'aptms. Le PEDA génère quant à lui une surface dont l'ordre (ou le désordre) est supposé similaire à celui généré par l'EDA, dans la mesure où les deux molécules ne diffèrent que par l'existence d'un groupe phényle hydrophobe dans la chaîne latérale du PEDA. Tâchons maintenant d'évaluer la pertinence des prédictions venant d'être faites.

5.1.2 Analyse croisée des tensions critiques (γ_c), dispersives (γ_s^d) et polaires (γ_s^p)

Zisman plots des surfaces et analyse des γ_c déterminés

Le choix des liquides tests (figure 5.4) s'est fait au regard des composantes respectives de leurs tensions superficielles (cf. tableau 3.2), des concordances chimiques entre surfaces et liquides, puis des Zisman plots obtenus (figure 5.5). Les liquides retenus en premier lieu sont l'eau et le formamide. Le formamide possède une terminaison amine, faisant de lui un liquide pour sonder des surfaces NH_2 aussi approprié que les alcanes l'étaient pour sonder des surfaces CH_3 . En second lieu, le diiodométhane et l' α -bromonaphtalène paraissent adaptés aux surfaces, puisque les points des Zisman plots qui correspondent à ces liquides se situent dans le prolongement linéaire des points obtenus avec l'eau et le formamide (figure 5.5). Seul le deta semble échapper à ce constat, le point obtenu pour le formamide étant légèrement décalé par rapport au fit linéaire. Nous y reviendrons.

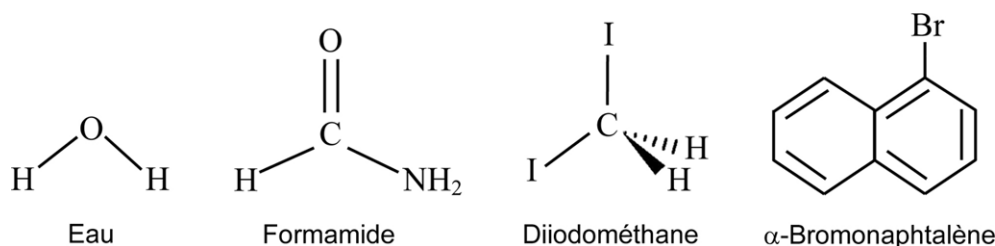


FIGURE 5.4: Formules semi-développées des liquides tests utilisés pour sonder les surfaces NH_2 . Les tensions de surface de ces liquides sont indiquées dans le tableau 3.2 et représentent les abscisses des points du graphique présenté à la figure 5.5 (ci-dessous).

Les données collectées grâce à l'AFM et aux mesures d'angles de contact sont réunies dans le tableau 5.1. Les incertitudes sur les valeurs de γ_c ont été estimées à partir des paramètres des fits linéaires réalisés sur chacune des séries de valeurs. Trois groupes de surfaces semblent émerger des valeurs déterminées pour l'énergie critique γ_c . D'un côté, se trouvent les surfaces adms et

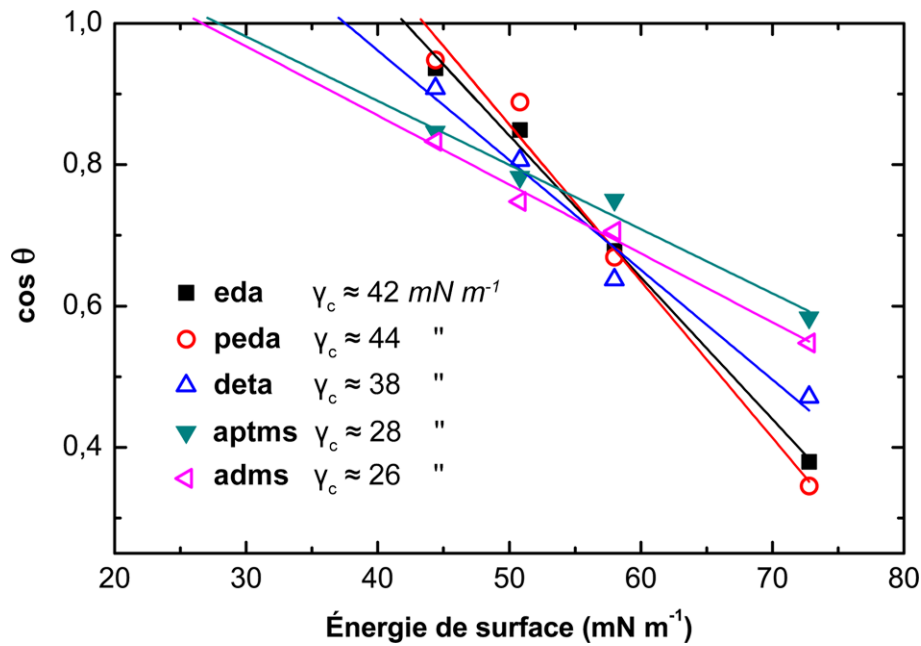


FIGURE 5.5: Zisman plots permettant la détermination du γ_c des surfaces NH_2 . γ_c est obtenu à l'intersection des fits linéaires avec la droite d'équation $\cos \theta = 1$.

aptms, dont le γ_c est relativement faible (respectivement ~ 26 et $\sim 28 \text{ mN m}^{-1}$). De l'autre côté, les surfaces eda et peda se distinguent par un γ_c beaucoup plus élevé (respectivement ~ 42 et $\sim 44 \text{ mN m}^{-1}$). Le γ_c du deta se situe entre ces deux extrémités ($\sim 38 \text{ mN m}^{-1}$). Au vu des prédictions réalisées quant à la nanostructure des surfaces, ces valeurs de γ_c appellent plusieurs remarques.

La mouillabilité, et par conséquent la structure de l'aptms, se révèlent très proches de celles de l'adms. D'une part, cela signifie que la prédiction concernant la structure très désordonnée de l'aptms se révèle fautive, à la condition, bien sûr, de considérer que l'adms possède une nanostructure *relativement* ordonnée, ce que nous considérons acquis au vu des résultats du chapitre 4. D'autre part, la faible valeur des γ_c calculés semble indiquer que ces substrats exposent une faible quantité de groupes OH en surface, ce qui confirmerait la nature *relativement* ordonnée des monocouches. En effet, plus la quantité de groupes OH est importante, plus le γ_c de la surface est sensé se rapprocher de celui du verre propre ($\geq 150 \text{ mN m}^{-1}$). Or, des valeurs telles que 26 et 28 mN m^{-1} sont du même ordre de grandeur que celles relevées pour les surfaces CH_3 (pour lesquelles $19,9 \text{ mN m}^{-1} < \gamma_c < 26,8 \text{ mN m}^{-1}$), bien que certaines de ces surfaces méthyle exposent un nombre relativement élevé de groupes OH, et que la combinaison des liquides tests est différente de celle utilisée ici. Indirectement, cela signifie qu'une surface très ordonnée de groupes NH_2 possède un γ_c peu élevé, d'une valeur de l'ordre d'environ 25 mN m^{-1} .

Les substrats adms et aptms sont donc assimilables à des surfaces de classe 2, c'est-à-dire globalement homogènes aux échelles micrométriques, de faible énergie, mais autorisant l'existence de forts gradients locaux dans les énergies d'adhésion, cette fois-ci aux échelles nanométriques. La valeur de θ_{AR} ($\sim 15^\circ$) mesurée pour l'adms semble confirmer cette hypothèse. En outre, cette valeur plutôt faible est comparable à celle obtenue pour une des surfaces méthyle de classe 2 dont la concentration surfacique des groupes CH_3 est élevée (odms_{x2} : $\theta_{\text{AR}} \approx 14^\circ$). La valeur relevée pour l'aptms ($\theta_{\text{AR}} \approx 54^\circ$) ne peut être considérée comme significative, dans la mesure où sa surface présente une nanorugosité importante ($\text{rms} \approx 1,4 \text{ nm}$ contre $\sim 0,3 \text{ nm}$ pour les autres substrats). Cette rugosité, observée pour des surfaces suffisamment grandes (figure 5.6) est vraisemblablement due à la physisorption de polymères en excès dans la solution, comme vu au cours du chapitre 4. Enfin, la valeur du γ_c de l'aptms ($\sim 28 \text{ mN m}^{-1}$), légèrement plus élevée que celle de l'adms ($\sim 26 \text{ mN m}^{-1}$) semble indiquer malgré tout qu'il existe un degré, même minime, de polymérisation verticale durant le processus de formation du substrat.

TABEAU 5.1: Données collectées par AFM et par mesures d'angles de contact pour les surfaces NH_2 . Les angles de contact sont mesurés pour les liquides suivants : eau (H_2O), formamide (FA), diiodométhane (MI), et α -bromonaphtalène (BN). γ_c est l'énergie critique de surface, θ_{AR} la différence entre les angles d'avancée et de recul. La rugosité est mesurée (en \bar{z}) pour des surfaces de $1 \mu\text{m}^2$ et de $4 \mu\text{m}^2$ (en \bar{x} , \bar{y}).

			adms	aptms	deta	peda	eda
$\theta_{\text{H}_2\text{O}}$	deg		57	54	62	70	68
θ_{FA}	deg		45	41	51	48	47
θ_{MI}	deg		42	39	36	27	32
θ_{BN}	deg		34	32	25	18	21
γ_c	mNm^{-1}		$26,4 \pm 1,2$	$28,0 \pm 1,6$	$37,6 \pm 2,3$	$43,6 \pm 2,2$	$42,1 \pm 1,1$
rms	nm	$1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
rms	nm	$2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$	0,3	1,4	0,3	0,3	0,3
θ_{AR}	deg		15	54	32	40	42

Nous ne pouvons émettre qu'une seule hypothèse pour expliquer la structure adoptée par l'aptms et ce (supposé faible) degré de polymérisation verticale : même si l'APTMS polymérise de façon chaotique préalablement à l'adsorption, il est possible que les oligomères formés restent suffisamment flexibles, du fait des petites dimensions de la molécule concernée. Ainsi, ces oligomères, une fois en contact avec la surface de verre, auraient toujours la possibilité de s'étendre suffisamment de façon à former une monocouche relativement homogène, exposant au final une proportion très réduite de groupes OH.

Les valeurs élevées des γ_c de l'eda ($\sim 42 \text{ mN m}^{-1}$) et du peda ($\sim 44 \text{ mN m}^{-1}$) tendent, au contraire de l'adms et de l'aptms, à montrer que la proportion de groupes OH exposés en surface est beaucoup plus importante. Les prédictions concernant la structure hautement désordonnée de ces substrats se révéleraient cette fois-ci beaucoup plus justes. L'addition du groupe phényle au sein de la chaîne latérale du PEDA ne semble pas avoir une influence critique, excepté le caractère très légèrement plus hydrophobe de la surface ($\gamma_{\text{H}_2\text{O}} \approx 70^\circ$ contre $\gamma_{\text{H}_2\text{O}} \approx 68^\circ$ pour l'eda).

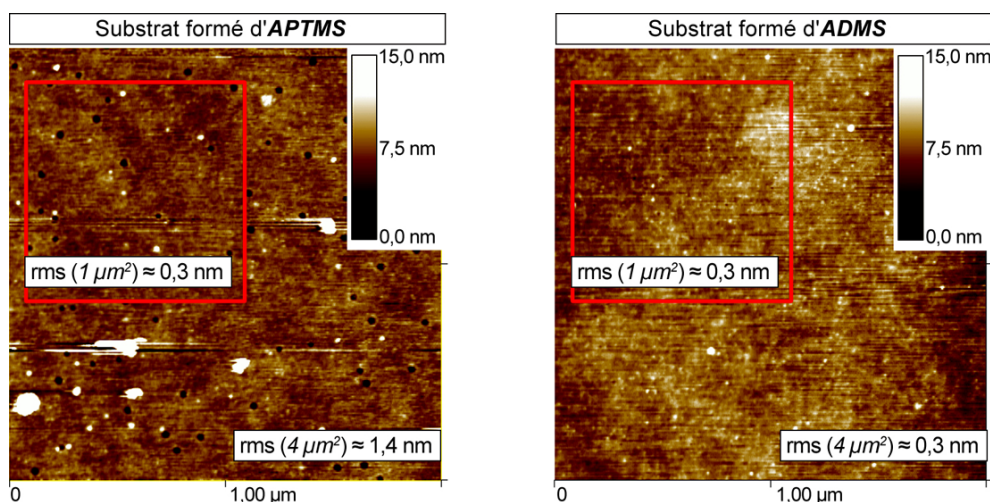


FIGURE 5.6: Imagerie AFM et rugosités comparées des substrats adms et aptms. Les chiffres entre parenthèses signifient la surface pour laquelle le rms est calculé par le logiciel d'exploitation de l'AFM (Veeco Nanoscope).

La surface du deta ($\gamma_c \approx 38 \text{ mN m}^{-1}$) semble se conformer au modèle développé plus haut qui prévoit une meilleure stabilisation de l'état « ordonné » du polymère chimisorbé pour les chaînes latérales les plus longues. Cette vision est cohérente avec un γ_c inférieur à celui des surfaces de l'eda et du peda, et donc avec une exposition inférieure des groupes OH, corrélative à un degré de polymérisation verticale plus faible. La valeur relevée pour θ_{AR} ($\sim 32^\circ$) semble confirmer cette

analyse, puisqu'elle est significative d'une surface hétérogène chimiquement parlant, mais dans des proportions toutefois moindres que les surfaces de l'eda ($\theta_{\text{AR}} \approx 42^\circ$) et du peda ($\theta_{\text{AR}} \approx 40^\circ$). En outre, il est possible que la déviation constatée du point relevé pour le formamide (figure 5.5) ne soit due ni au hasard, ni à une erreur expérimentale. Dans ce cas, le prolongement du Zisman plot, en excluant les valeurs relevées pour le diiodométhane et pour l' α -bromonaphtalène, aboutirait à une valeur de γ_c beaucoup plus proche de celles obtenues pour l'adms et l'aptms.

Il est à noter que ces valeurs de θ_{AR} semblent globalement très élevées, même si DE GENNES et coll. indiquent que θ_{AR} est susceptible d'atteindre des valeurs de 50° [130]. Il est possible qu'un défaut inhérent au système de mesure amplifie artificiellement la valeur réelle des angles d'avancée et de recul, dans un sens comme dans l'autre (valeurs plus élevées pour les angles d'avancée, plus faible pour les angles de recul). C'est peut-être ce qui explique qu'une valeur aussi élevée ($\theta_{\text{AR}} \approx 12^\circ$) soit mesurée pour l'ots ou l'otms, dont les monocouches très compactes sont quasi-parfaitement homogènes, et pour lesquelles θ_{AR} devrait être voisin de 0° .

Une autre raison possible, outre l'infiltration de l'eau à travers les chaînes alkyle [126], est la préexistence de micro-aspérités à la surface du verre (cf. annexe A, figure A.1). Ces aspérités, même peu nombreuses et dispersées sont responsables d'une rugosité « parasite » dont la cause n'est *a priori* pas imputable aux traitements chimiques employés pour modifier le verre. Même si les valeurs absolues de θ_{AR} sont partiellement faussées, elles présentent un intérêt non-négligeable car rien ne nous empêche de comparer les différentes valeurs obtenues pour chaque substrat. Considérons donc que si erreur il y a, celle-ci est reproduite d'un substrat à l'autre, et au final, puisque les différences mesurées sont plus sensibles, l'amplification des valeurs mesurées pour θ_{AR} constitue un avantage plutôt qu'un inconvénient.

Particularités du modèle Owens–Wendt appliqué aux surfaces NH_2

L'utilisation du modèle Owens–Wendt implique le choix de deux liquides tests, parmi ceux utilisés pour tracer les Zisman plots permettant la détermination des énergies critiques empiriques γ_c . Les valeurs retenues pour les calculs de γ_s^p et γ_s^d sur chaque substrat sont simplement les valeurs données par les fits produits lors du tracé des Zisman plots (tableau 5.2).

La combinaison des liquides (H_2O , formamide) fournit des résultats qui permettent de distinguer clairement les substrats (figure 5.7), mais semble présenter un défaut majeur. En effet, nous avons déjà évoqué au chapitre 4 (page 85) une propriété caractéristique des surfaces relativement homogènes : la similitude entre γ_c et γ_s^d [51]. Or, quelle que soit la surface considérée, les γ_s^d calculés ici sont tous très inférieurs aux γ_c . En outre, même si les substrats eda et peda sont relativement hétérogènes d'un point de vue chimique (surfaces NH_2/OH), cela ne suffit à expliquer le fait que le γ_c mesuré soit pour ces deux substrats légèrement supérieur à γ_s . Ce résultat est difficilement acceptable du point de vue de la physique, même si les incertitudes calculées pour γ_c et γ_s réservent la possibilité d'un γ_s supérieur à γ_c . Précisons que les incertitudes pour toutes les valeurs de γ_s^d , γ_s^p et γ_s (tableaux 5.3 et 5.4) ont été calculées en attribuant une incertitude de $\pm 2^\circ$ sur les mesures d'angles, et en tenant compte de toutes les conditions aux limites.

TABLEAU 5.2: Valeurs des angles : originales mesurées (θ_m) et d'après le fit des données (θ_f).

Les angles de contact sont mesurés pour l'eau (H_2O), le formamide (FA), le diiodométhane (MI), et l' α -bromonaphtalène (BN).

		adms		aptms		deta		peda		eda	
		θ_m	θ_f	θ_m	θ_f	θ_m	θ_f	θ_m	θ_f	θ_m	θ_f
$\theta_{\text{H}_2\text{O}}$	deg	56,8	56,7	54,3	53,7	61,9	63,1	69,8	69,4	67,7	67,5
θ_{FA}	deg	45,1	46,1	41,4	43,4	50,4	47,0	48,0	47,2	47,3	47,1
θ_{MI}	deg	41,6	40,2	38,5	37,6	36,3	37,4	27,3	32,9	31,9	34,4
θ_{BN}	deg	33,6	34,3	32,2	31,7	24,8	26,7	18,5	11,1	20,5	17,5

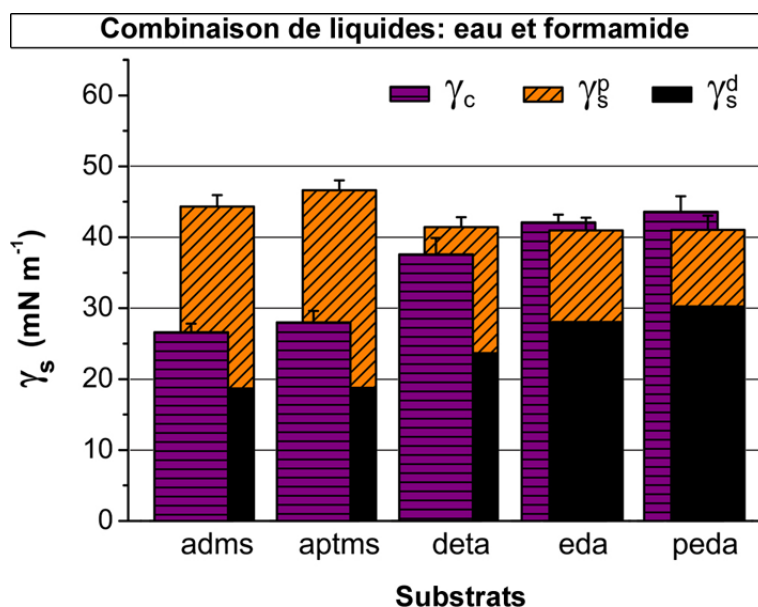


FIGURE 5.7: Distribution des composantes γ_s^d et γ_s^p de l'énergie et énergie critique γ_c des surfaces NH_2 (1).

Afin de remédier à ce problème, nous avons eu recours à tous les autres couples de liquides possibles : (H_2O , MI), (H_2O , BN), (FA, MI) et (FA, BN). Les résultats obtenus (figure 5.8) semblent plus réalistes vis-à-vis des conditions énoncées plus haut. Pour toutes les combinaisons, les valeurs des γ_s de l'eda et du peda sont supérieures aux valeurs de γ_c . De plus, pour les autres substrats (deta, adms et aptms), les γ_c sont maintenant inférieurs aux γ_s^d . Enfin, les disparités en matière de distribution des composantes γ_s^d et γ_s^p sont conservées par rapport au couple (H_2O , FA), même si cela semble moins évident concernant les couples (FA, BN) et (FA, MI).

Les couples de liquides offrant le plus de garanties sur la fiabilité des résultats sont donc les couples (H_2O , MI) et (H_2O , α -BN). En outre, le couple (H_2O , BN) semble légèrement plus sensible que le couple (H_2O , MI), laissant apparaître des différences plus marquées en ce qui concerne les valeurs des γ_s^d : $37,0 \text{ mN m}^{-1} \leq \gamma_s^d \leq 42,4 \text{ mN m}^{-1}$ pour le couple (H_2O , BN), contre $39,5 \text{ mN m}^{-1} \leq \gamma_s^d \leq 42,3 \text{ mN m}^{-1}$ pour le couple (H_2O , MI). Nous nous référerons donc aux valeurs obtenues pour le couple (H_2O , BN) au cours des explications futures, si tant est qu'aucun couple de liquides n'est précisé dès lors que nous présenterons des valeurs pour γ_s^d et pour γ_s^p .

TABLEAU 5.3: Valeurs des γ_s^d , γ_s^p et γ_s des surfaces NH_2 selon différentes combinaisons de liquides. Voir les tableaux 5.1 et 5.2 pour les abréviations.

γ (mNm^{-1})		adms	aptms	deta	peda	eda
(H ₂ O, FA)	γ_s^d	$18,7 \pm 3,7$	$18,8 \pm 3,5$	$23,6 \pm 4,2$	$30,2 \pm 4,9$	$28,1 \pm 4,8$
	γ_s^p	$25,7 \pm 4,3$	$27,9 \pm 4,3$	$17,9 \pm 3,9$	$10,9 \pm 3,2$	$12,9 \pm 3,3$
	γ_s	$44,4 \pm 1,6$	$46,7 \pm 1,6$	$41,5 \pm 1,4$	$41,1 \pm 2,2$	$41,0 \pm 1,7$
(H ₂ O, MI)	γ_s^d	$39,5 \pm 1,1$	$40,8 \pm 1,0$	$40,9 \pm 1,0$	$43,0 \pm 0,9$	$42,3 \pm 1,0$
	γ_s^p	$14,4 \pm 1,7$	$15,5 \pm 1,7$	$10,4 \pm 1,6$	$6,8 \pm 1,2$	$7,8 \pm 1,2$
	γ_s	$53,9 \pm 1,8$	$56,3 \pm 1,8$	$51,3 \pm 1,6$	$49,8 \pm 1,6$	$50,1 \pm 1,6$
(H ₂ O, BN)	γ_s^d	$37,0 \pm 0,8$	$38,0 \pm 0,8$	$39,8 \pm 0,6$	$43,6 \pm 0,2$	$42,4 \pm 0,2$
	γ_s^p	$15,4 \pm 1,6$	$16,7 \pm 1,6$	$10,7 \pm 1,3$	$6,6 \pm 1,0$	$7,8 \pm 1,0$
	γ_s	$52,4 \pm 1,6$	$54,7 \pm 1,6$	$50,5 \pm 1,5$	$50,2 \pm 1,0$	$50,2 \pm 1,2$
(FA, BN)	γ_s^d	$37,0 \pm 0,8$	$38,0 \pm 0,9$	$39,8 \pm 0,6$	$43,6 \pm 0,3$	$42,4 \pm 0,4$
	γ_s^p	$6,5 \pm 1,5$	$7,1 \pm 1,3$	$4,6 \pm 1,0$	$3,0 \pm 0,8$	$3,4 \pm 0,8$
	γ_s	$43,5 \pm 1,3$	$45,1 \pm 1,3$	$44,4 \pm 1,0$	$46,5 \pm 0,9$	$45,8 \pm 0,8$
(FA, MI)	γ_s^d	$39,5 \pm 1,0$	$40,8 \pm 1,0$	$40,9 \pm 1,0$	$43,0 \pm 0,8$	$42,3 \pm 1,0$
	γ_s^p	$5,1 \pm 1,4$	$5,5 \pm 1,2$	$4,1 \pm 1,2$	$3,2 \pm 1,0$	$3,5 \pm 1,0$
	γ_s	$44,6 \pm 1,2$	$46,3 \pm 1,2$	$45,0 \pm 1,2$	$46,2 \pm 1,2$	$45,8 \pm 1,2$

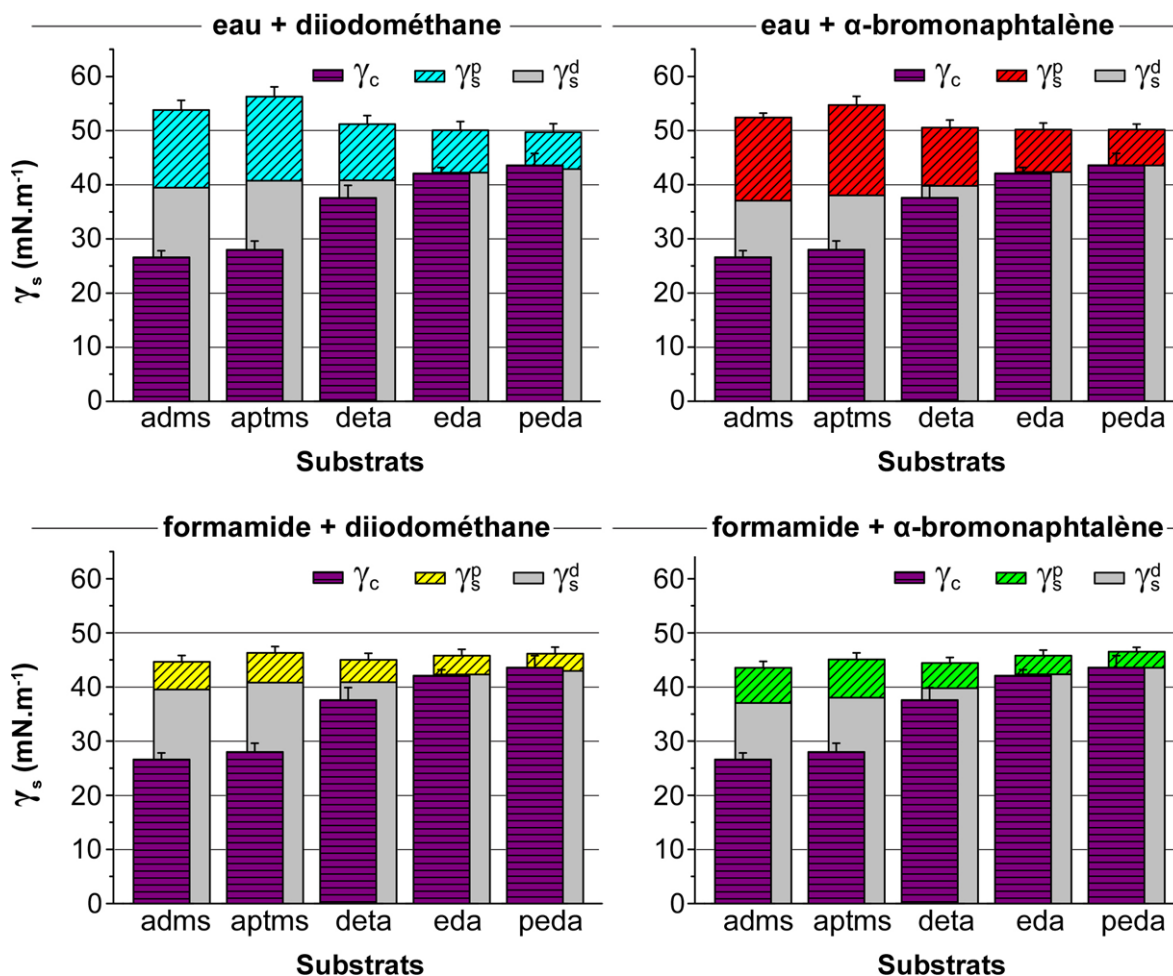


FIGURE 5.8: Distribution des composantes γ_s^d et γ_s^p de l'énergie et énergie critique γ_c des surfaces NH_2 (2). Suivant le couple de liquides utilisé pour le calcul, la distribution des énergies varie, de même que l'énergie de surface totale γ_s .

A titre indicatif, nous indiquons les valeurs de γ_s^d et γ_s^p obtenues en calculant les moyennes effectuées sur tous les résultats pour tous les couples de liquides (figure 5.9 et tableau 5.4). Ces moyennes comportent des marges d'erreur suffisamment grandes pour nous permettre d'estimer que les valeurs réelles des composantes énergétiques sont comprises dans les intervalles définis.

D'emblée, nous remarquons que les tensions de surface totales (γ_s) des substrats NH_2 sont à la fois similaires entre elles, et du même ordre de grandeur (quelques dizaines de $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) que celles des surfaces CH_3 . Cela nous autorisera par la suite à comparer surfaces NH_2 et CH_3 en termes d'effets produits sur l'adhésion et la différenciation des cellules PC12.

Mise en relation de la nanostructure supposée des substrats avec γ_s^d , γ_s^p et γ_c

Comme indiqué en préambule du chapitre, l'analyse des contributions énergétiques polaires et dispersives des surfaces amine est délicate, principalement dû au fait que les groupes NH_2 et OH composant les monocouches fournissent tous deux des contributions à la fois polaires et dispersives à l'énergie de surface. La comparaison de l'eau et du formamide, en termes de structure (figure 5.4) et des composantes respectives de leur tension de surface (tableau 3.2), nous conduit à l'estimation suivante : le groupe NH_2 fournit une contribution dispersive (apolaire) plus élevée que le groupe OH , dont l'influence est plutôt polaire. Les substrats plutôt « ordonnés » (adms et aptms), et exposant donc une quantité supposée plus élevée de terminaisons NH_2 , devraient par conséquent avoir un γ_s^d plus élevé, et un γ_s^p plus faible que les surfaces « désordonnées » (eda, peda, et dans une moindre mesure, le deta). Or, c'est très exactement le contraire que l'on observe (figures 5.8 et 5.9). Ces résultats contradictoires peuvent susciter divers types d'explications potentielles :

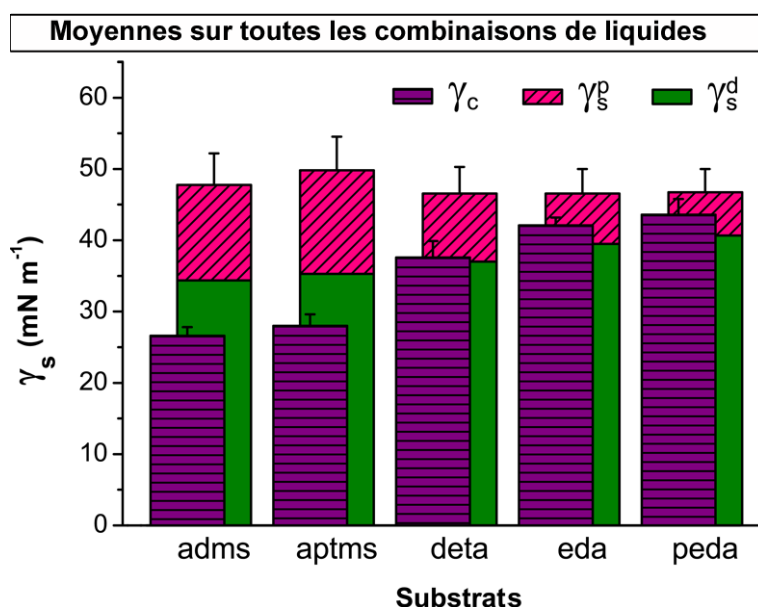


FIGURE 5.9: Distribution des composantes γ_s^d et γ_s^p de l'énergie et énergie critique γ_c des surfaces NH_2 (3).

TABLEAU 5.4: Valeurs des γ_s^d , γ_s^p et γ_s moyennés sur toutes les combinaisons de liquides.

		adms	aptms	deta	peda	eda
γ_s^d	mNm^{-1}	$34,4 \pm 7,9$	$35,3 \pm 8,4$	$37,0 \pm 6,7$	$40,7 \pm 5,2$	$39,5 \pm 5,7$
γ_s^p	mNm^{-1}	$13,4 \pm 7,4$	$14,5 \pm 8,0$	$9,5 \pm 5,0$	$6,1 \pm 2,9$	$7,1 \pm 3,5$
γ_s	mNm^{-1}	$47,8 \pm 4,4$	$49,8 \pm 4,7$	$46,5 \pm 3,8$	$46,7 \pm 3,3$	$46,6 \pm 3,4$

- i. Les hypothèses faites concernant la nature nanostructurale des substrats sont fausses.
- ii. Le modèle Owens–Wendt éprouve ses limites pour ce type de surfaces. Notamment, les liquides choisis pour sonder les surfaces sont peu appropriés.
- iii. Les hypothèses sur l'état « ordonné » ou « désordonné » des surfaces sont pertinentes, les liquides tests sont appropriés, mais la structure complexe des substrats indique une distribution des composantes polaires et dispersives qui n'est qu'apparemment contradictoire.

Explorons la dernière possibilité et émettons quelques hypothèses qui permettraient d'expliquer ces résultats :

- i. D'après les résultats du chapitre précédent (cf. figure 4.5), le nombre de monomères contenus dans les monocouches de substrats désordonnés de classe 3 est inférieur au nombre de monomères contenus dans une monocouche de classe 1 ou 2. Cependant, les molécules d'EDA, de PEDA et de DETA contiennent une ou deux fonctions amine supplémentaires par rapport à l'ADMS et à l'APTMS (cf. figure 2.2). La perte supposée de contributions dispersives due à une baisse de la quantité de molécules greffées est donc susceptible d'être compensée par l'augmentation du nombre de groupements amine au sein de chaque molécule.
- ii. Les surfaces eda et peda exposent en surface un nombre de groupes OH que l'on suppose relativement élevé par rapport à l'adms et à l'aptms. Il est donc possible que les contributions dispersives de ces groupes OH viennent s'ajouter aux contributions dispersives produites par les groupes NH_2 , et qu'au final γ_s^d devienne supérieur pour les surfaces désordonnées. C'est d'ailleurs ce que nous observons pour les surfaces CH_3 , où par exemple, nous avons $\gamma_s^d(\text{htms}_M) > \gamma_s^d(\text{htms}_H)$, bien que le nombre de molécules d'HTMS adsorbées, et donc le nombre de groupes CH_3 exposés, soit nettement inférieur pour le premier (figure 4.5).

iii. Le diiodométhane ou l' α -bromonaphtalène sont des molécules dont les dimensions sont suffisamment grandes pour que nous les imaginions incapables de s'infiltrer à travers les monocouches formées sur les surfaces de verre. Ce n'est pas le cas de l'eau, petite molécule en comparaison. Il est donc envisageable que, si le diiodométhane et l' α -bromonaphtalène, dont les tensions superficielles sont de nature strictement apolaire (tableau 3.2), sondent exclusivement les groupes chimiques exposés directement à la surface, et donc la nature dispersive des groupes exposés, l'eau est, elle, susceptible de sonder la nature polaire, non seulement de ces groupes exposés, mais également celle des groupes plus enfouis au sein des monocouches. Les groupes silanol libres des surfaces de verre, c'est-à-dire non liés chimiquement (figures 5.1 et 5.2), deviendraient donc accessibles dans une certaine mesure, et ce, d'autant plus facilement que les molécules qui les recouvrent sont petites (cas de l'ADMS et de l'APTMS). Cela expliquerait que les contributions polaires (γ^p) calculées pour l'adms ($\sim 15 \text{ mN m}^{-1}$) et l'aptms ($\sim 17 \text{ mN m}^{-1}$) soient supérieures à celles calculées pour l'eda ($\sim 8 \text{ mN m}^{-1}$), le peda ($\sim 7 \text{ mN m}^{-1}$) et le deta ($\sim 11 \text{ mN m}^{-1}$). En outre, un élément supplémentaire semble renforcer cette hypothèse : le formamide, molécule plus « grosse » que l'eau (figure 5.4), et donc moins à même de s'infiltrer à travers les monocouches, devrait générer des différences également moins importantes en ce qui concerne les γ_s^p des substrats. C'est effectivement ce qui est observé pour les couples de liquides (FA, BN) et (FA, MI) (figure 5.8). Le rapport $\gamma_s^p(\text{eda})/\gamma_s^p(\text{adms})$ passe ainsi de 0,54 pour le couple (H_2O , MI) à 0,69 pour le couple (FA, MI). Malgré tout, la baisse de cet écart peut aussi être attribuée à la faible sensibilité polaire du formamide (tableau 3.2), et quoiqu'il en soit, la tension polaire γ_s^p de l'adms et de l'aptms reste supérieure à celle des autres surfaces. Le formamide, qui bien que plus « gros » que l'eau, reste néanmoins bien plus « petit » que le diiodométhane et l' α -bromonaphtalène, est en fin de compte peut-être bien capable de s'infiltrer lui aussi à travers les monomères composant les monocouches.

Les valeurs déterminées pour les γ_s sont compris dans des intervalles plutôt minces d'un substrat à l'autre, et ce quels que soient les couples de liquides utilisés pour le calcul : $50,2 \text{ mN m}^{-1} \leq \gamma_s \leq 52,4 \text{ mN m}^{-1}$ pour le couple (H_2O , BN), et $41,0 \text{ mN m}^{-1} \leq \gamma_s \leq 44,4 \text{ mN m}^{-1}$ pour le couple (H_2O , FA). La distinction des substrats se fait donc à travers les valeurs de γ_c et des distributions γ_s^d/γ_s^p qui diffèrent clairement d'un groupe de substrat (eda, peda) à l'autre (adms, aptms), le deta se trouvant dans une position intermédiaire. Quelle que soit l'origine de ces différences, il semble acquis qu'elles trouvent leur origine dans la nature nanostructurale propre à chaque substrat, présentant chacun un mélange particulier de groupes NH_2/OH . Il sera donc intéressant d'évaluer dans quelle mesure ces distinctions opèrent lorsque les substrats sont utilisés à fin de culture cellulaire. Nous aborderons ce point au chapitre 9. En attendant, intéressons nous à d'autres particularités des surfaces NH_2 , ayant trait à l'influence qu'exerce le temps de greffage sur la nanostructure de l'eda, et notamment sur son aspect topographique.

5.2 Étude comparée des substrats eda (temps de greffage : $\sim 24 \text{ h}$) et eda' ($\sim 16 \text{ h}$)

5.2.1 Mouillabilité des substrats eda et eda'

La diminution du temps de greffage de l'EDA entraîne un angle de contact inférieur de l'eda' ($\gamma_{\text{H}_2\text{O}} \approx 48^\circ$) par rapport à l'eda ($\gamma_{\text{H}_2\text{O}} \approx 68^\circ$), vraisemblable conséquence d'une quantité moindre de molécules chimisorbées au verre. Corrélativement, la proportion plus importante de groupes OH exposés se traduit par une augmentation du γ_s^p , qui passe de $\sim 7 \text{ mN m}^{-1}$ (eda) à $\sim 16 \text{ mN m}^{-1}$ (eda'), tandis que γ_s^d ne varie quasiment pas d'un substrat à l'autre ($\sim 39 \text{ mN m}^{-1}$). Ces résultats s'apparentent à ceux obtenus pour les surfaces CH_3 pour lesquelles nous faisons varier le même paramètre. Les différences entre eda' et eda sont ainsi du même ordre que celles existant entre htms_{M1} et htms_{M3}, ou entre odms_{x1} et odms_{x2} (figure 4.12). Vis-à-vis des résultats de la section

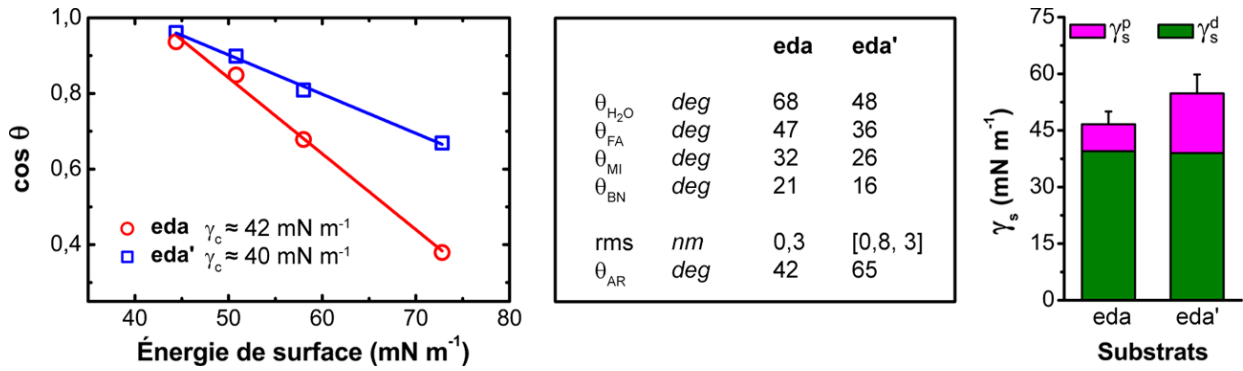


FIGURE 5.10: Évaluation de l'influence du temps de greffage de l'EDA : cas des substrats eda (24 h) eda' (16 h). Les surfaces se distinguent tant sur le plan mouillabilité que sur le plan rugosité, analysée par AFM.

précédente, l'allure des Zisman plots de l'eda et de l'eda' (figure 5.10) et la similitude des valeurs du γ_c indiquent que la distinction qui s'opère entre les nanostructures des deux surfaces tient plus à une différence de degré que de nature. La valeur élevée mesurée pour le θ_{AR} ($\sim 65^\circ$) de l'eda' par rapport à celui de l'eda ($\sim 42^\circ$) confirme les résultats précédents, de même que l'hétérogénéité accrue de la surface eda', tant du point de vue chimique que du point de vue de la rugosité mesurée ($0,8 \leq \text{rms} \leq 3$ nm contre $\sim 0,3$ nm pour l'eda).

5.2.2 Rugosité et topographie des substrats eda et eda'

De manière analogue aux surfaces htms_M qui voient leur nanorugosité augmenter entre l'htms_{M3} (rms $\approx 0,3$ nm) et l'htms_{M1} (rms $\approx 0,9$ nm), la nanorugosité de l'eda' est supérieure à celle de l'eda (figure 5.11). Cependant, deux différences sont à noter par rapport aux surfaces htms_M : premièrement, les proportions dans lesquelles cette nanorugosité augmente peuvent être multipliées par un facteur 3 (échantillon eda' (1), figure 5.11). La topographie obtenue rappelle dans ce cas celle de l'htms_{M1} (cf. figure 4.13) et appelle le même type de commentaires : soit cette rugosité est une fois encore due à la physisorption de polymères présents en excès dans la solution de greffage, soit elle résulte de la formation d'une multicouche d'oligomères chimisorbés après un processus de polymérisation chaotique essentiellement verticale [99]. Deuxièmement, nous observons sur certains échantillons la formation d'agrégats donnant à la surface un caractère topographique particulier (échantillon eda' (2), figure 5.11).

Signalons toutefois que la présence de ces agrégats n'est pas une règle générale, puisqu'ils n'ont pas été observés sur tous les substrats analysés : le type de topographie visible sur l'échantillon eda' (1) revenait plus souvent dans nos expériences. Il est possible que la topographie de l'eda' (2) résulte de conditions de greffage particulières dans la mesure où les réactions de condensation des trialkoxysilanes sur du verre sont très sensibles à des paramètres tels que l'humidité [76, 87]. Un séchage peu efficace de la lamelle de verre propre, préalablement à sa mise en solution, pourrait se concevoir comme facteur précipitant. Dans un cas comme celui-ci, des volumes non négligeables d'eau, regroupés à intervalles plus ou moins réguliers, et physisorbés sur la surface, pourraient induire l'agrégation de nombreuses molécules d'EDA à leur niveau et enclencher ainsi la formation des amas observés. L'observation des premiers pas de la réaction d'adsorption de l'OTS sur du verre (cf. figure 1.5) et la disposition à intervalles réguliers de noyaux de condensation, tend à montrer que cette hypothèse n'est pas à exclure. De plus, la dimension des intervalles semble comparable entre les noyaux de coalescence de l'OTS ou les agrégats d'EDA observés ici. Pour l'OTS, la période entre les centres des amas est comprise entre ~ 200 nm et ~ 800 nm. Pour l'EDA, les intervalles sont de dimensions comparables, et la taille des agrégats avoisine les 200 nm ($\sim 212 \pm 40$ nm, $N = 48$; mesurés sur trois échantillons différents).

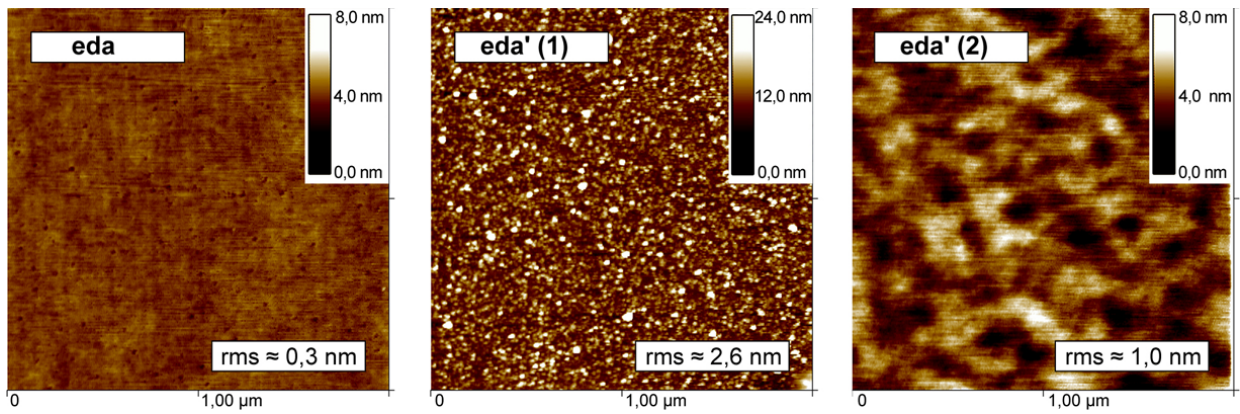


FIGURE 5.11: Comparaison par AFM de la rugosité et de la topographie de l'eda et de deux échantillons d'eda' : eda' (1) et eda' (2). Tandis que l'eda fait montre d'une surface très lisse, l'eda' expose une surface présentant des aspérités de morphologie variable.

Il va de soi que la formation des agrégats résulte également d'un processus de polymérisation chaotique à la fois verticale et horizontale. Il faut donc s'attendre à ce que leur composition chimique soit similaire à celle que le substrat d'eda présente de façon plus homogène : un mélange de fonctions OH et NH_2 de monomères liés chimiquement à la surface de verre. Nous supposons cette dernière représentée par les zones sombres repérables sur les images AFM des surfaces d'eda' (figure 5.11 : eda' (2) ; figure 5.12a).

L'existence des agrégats d'EDA offre la possibilité d'effectuer des calculs impliquant les fractions de surface exposées, par l'intermédiaire de la relation de Cassie–Baxter [136]. Cette relation nous permettra d'effectuer notre propre estimation de l'énergie nécessaire à la création des interfaces solide-liquide verre propre-eau et EDA/OH-eau, apportant ainsi un éclairage quantitatif sur la valeur des gradients locaux existant sur ce type de surface composite. La relation de Cassie–Baxter permet tout d'abord d'estimer la valeur de l'angle de contact de l'eau existant sur les domaines d'EDA, pris indépendamment de la surface de verre :

$$\cos \theta^* = \phi_1 \cos \theta_1 + \phi_2 \cos \theta_2, \quad (5.1)$$

où $\theta^* = 48^\circ$ est l'angle apparent, ϕ_1 et ϕ_2 sont, respectivement, la fraction de surface du verre et des agrégats d'EDA, et $\theta_1 = 0^\circ$ et θ_2 sont, respectivement, l'angle de contact de l'eau sur du verre propre, et sur les domaines d'EDA pris indépendamment du verre. Afin d'estimer la fraction de surface $\phi_1 = 1 - \phi_2$, nous utilisons les dimensions du rectangle modélisant la distance entre les agrégats d'EDA (figure 5.12b). À l'intérieur du rectangle, nous obtenons un cercle dont la surface est πr^2 . L'aire du rectangle est égale à $6r^2$. La fraction de surface des agrégats d'EDA est donc estimée à :

$$\phi_2 = \frac{\pi r^2}{2r \times 3r} = \frac{\pi}{6}. \quad (5.2)$$

Cette valeur nous permet de calculer l'angle obtenu pour les agrégats d'EDA seuls :

$$\frac{\cos \theta^* - 1}{\phi_2} + 1 = \cos \theta_2 \implies \theta_2 \approx 68^\circ. \quad (5.3)$$

Nous retrouvons la valeur mesurée pour le substrat *eda* (figure 5.10 et tableau 5.1), pour lequel le greffage de la molécule dans les mêmes conditions de solvant (méthanol + eau à 4%) peut être considéré comme optimal, puisque l'angle de contact n'est pas modifié suite à l'allongement du temps de greffage. Ce résultat, obtenu indépendamment des mesures effectuées pour l'eda, tend à valider non seulement les mesures d'angle effectuées, mais aussi les paramètres de modélisation choisis et, dans une certaine mesure, les hypothèses faites sur la nanostructure des substrats.

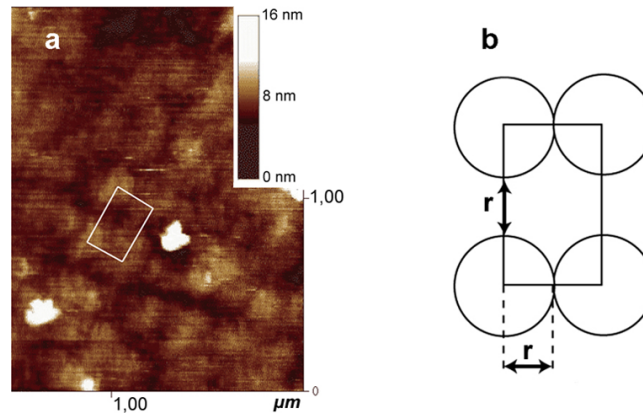


FIGURE 5.12: Topographie de la surface eda' : imagerie par AFM (a) et illustration schématique (b) des paramètres choisis pour calculer les énergies de surface.

Précisons que dans l'article publié dans la revue *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* où nous présentions ces calculs pour la première fois [137] (cf. annexe B), l'angle apparent mesuré pour la surface d'eda était de 55° . En conséquence, nous obtenions une valeur proche de 80° pour θ_2 . Cette surestimation que nous corrigeons ici provient du fait que nous n'exercions pas un contrôle suffisamment précis sur le temps de greffage ($16 \text{ h} \leq t \leq 24 \text{ h}$, l'article indiquant une durée de 24 h). En outre, le θ_{AR} que nous mesurions était de 22° et non de 65° comme indiqué ici. Cette différence peut provenir des conditions dans lesquelles les mesures ont été réalisées, par deux expérimentateurs différents, et à l'aide d'un montage différent du système de mesure décrit au chapitre 3 (figure 3.6), bien que similaire dans son principe.

Ces résultats nous conduisent à estimer les énergies interfaciales solide-liquide en jeu au sein de ce système. Ces énergies correspondent aux énergies d'adhésion de l'eau en contact, d'une part, avec les agrégats d'EDA :

$$W_{\text{eda}/\text{H}_2\text{O}} = \gamma_{\text{H}_2\text{O}}(1 + \cos \theta_2) = 100,1 \text{ mJ m}^{-2} (\iff 100,1 \text{ mN m}^{-1}), \quad (5.4)$$

et d'autre part, avec le verre propre :

$$W_{\text{verre}/\text{H}_2\text{O}} = \gamma_{\text{H}_2\text{O}}(1 + \cos \theta_1) = 145,6 \text{ mJ m}^{-2} (\iff 145,6 \text{ mN m}^{-1}). \quad (5.5)$$

La différence entre les énergies d'adhésion par unité de surface des agrégats d'EDA et du verre propre est donc estimée à :

$$\Delta W = |W_{\text{verre}} - W_{\text{eda}}| \approx 45,5 \text{ mJ m}^{-2}. \quad (5.6)$$

Cette valeur vaut uniquement pour le cas où les gradients considérés naissent de la formation d'agrégats, et portent donc sur des échelles de l'ordre de la centaine de nanomètres. Les résultats précédemment obtenus, tant pour les surfaces CH_3 que NH_2 , laissent à penser que les gradients existent aussi de façon beaucoup plus localisée (i.e. au sein des agrégats), étant donné la nature très hétérogène de la polycondensation subie par les molécules plongées dans la solution à base de méthanol. Ces gradients apparaissent dès lors qu'un nombre suffisamment élevé de groupes OH apparaissent : soit au sein d'un continuum de terminaisons CH_3 (cas des surfaces htms_{HX} , otms_{x} , $\text{odms}_{24\text{h}}$) ou NH_2 (cas des surfaces adms et aptms), soit à proximité de groupes CH_3 (htms_{M}) ou NH_2 (eda, peda) plus épars. La valeur du γ_c du verre propre ($\geq 150 \text{ mN m}^{-1}$) et celle obtenue pour une surface *relativement* homogène de terminaison amine (adms , $\gamma_c \approx 26 \text{ mN m}^{-1}$) permet d'estimer la variation locale des énergies de surface au sein des amas d'EDA suivant :

$$26 \text{ mN m}^{-1} \leq \gamma_c \leq 150 \text{ mN m}^{-1}. \quad (5.7)$$

5.3 Propriétés des surfaces modifiées par la poly-L-lysine

5.3.1 Poly-L-lysine physisorbée sur une lamelle de verre

Distribution de l'énergie de surface

La structure prévue pour une monocouche de PLL est caractérisée par un arrangement ordonné des terminaisons amine (cf. chapitre 2). Cet arrangement est supposé responsable d'une distribution très homogène de l'énergie de surface, notamment par rapport aux substrats très désordonnés formés d'aminosilanes (eda, eda', peda, peda' ; figure 5.13). Plusieurs éléments viennent à l'appui de cette hypothèse :

- i. L'épaisseur de la monocouche, mesurée par ellipsométrie [27], est très fine ($\sim 1,5$ nm).
- ii. L'angle de contact mesuré pour l'eau est inférieur à 5° , en accord avec un arrangement serré des amines hydrophiles, tel que représenté sur la figure 5.13.
- iii. Les images AFM (figures 5.14 et 5.15) de la surface de verre/PLL témoignent d'une surface lisse, dont le rms est généralement situé aux alentours de 0,5 nm. Même quand le rms atteint une valeur de $\sim 0,7$ nm, proche de celle de l'eda' ($\sim 0,9$ nm), sa surface lui est toujours plus homogène en comparaison (figure 5.14), pour des raisons topographiques.
- iv. La surface de verre/PLL est la seule surface, parmi toutes les surfaces amine étudiées ici, qui présente des pics détectables en infrarouge dans la région des vibrations d'élongation CH (figure 5.16). Clairement, le spectre exhibe des pics $\text{CH}_2\text{-sy}$ (~ 2850 cm^{-1}) et $\text{CH}_2\text{-as}$ (~ 2918 cm^{-1}). L'intensité des pics est comparable à celle des pics obtenus pour l'htms_H, pour lequel nous avons vu, au chapitre 4, que les monomères d'HTMS sont suffisamment ordonnés pour produire des rayonnements SFG similaires à ceux de l'ots. La longueur de la chaîne latérale de la PLL (4 groupes CH_2) est comparable à celle de l'HTMS (5 groupes CH_2). Nous pouvons donc en déduire indirectement que la disposition très ordonnée des chaînes carbonées de la PLL leur permet d'atteindre une concentration surfacique suffisamment élevée pour être détectable en spectroscopie infrarouge. Enfin, nous remarquons l'absence de décalage du pic $\text{CH}_2\text{-as}$ par rapport à la référence fournit par une monocouche ordonnée d'octadécylsiloxanes (ligne pointillée à ~ 2918 cm^{-1} ; cf. figure 4.5).

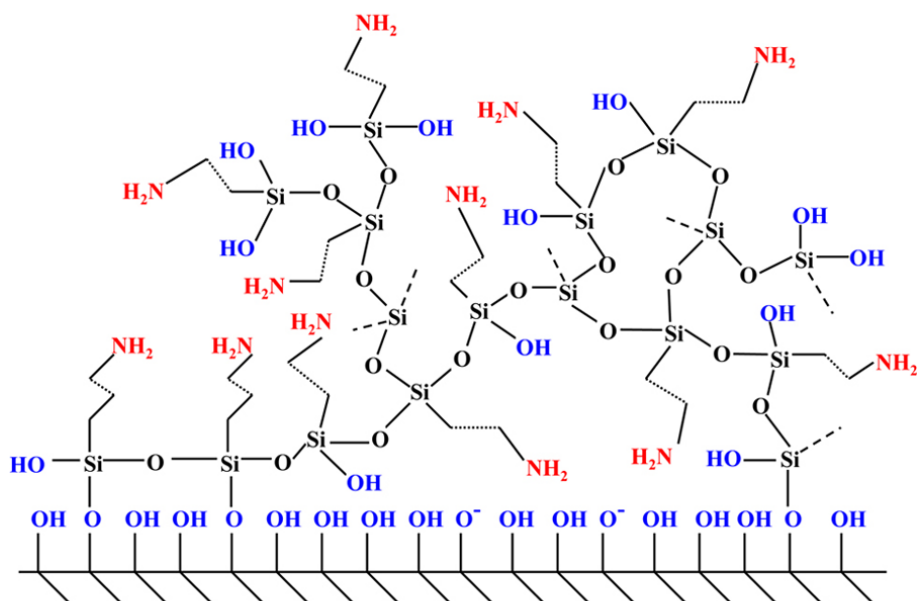
Ces résultats nous conduisent à considérer le substrat de verre/PLL comme une surface de classe 1 dotée de terminaisons amine, là où l'adms et l'aptms, surfaces aminosilanisées *relativement* ordonnées, seraient plutôt des surfaces de classe 2. À ce sujet, considérons l'aptms comme une surface de classe 3', que nous pouvons définir, de façon analogue aux classes 1' et 2', comme une surface dont le processus de formation est celui d'une classe 3, mais dont les propriétés finales sont celles d'une classe 2.

Pour conclure, ajoutons que la présence de PLL sur le verre, déjà confirmée par spectroscopie infrarouge, semble aussi confirmée indirectement par l'expérience AFM illustrée à la figure 5.15. L'image de droite ($S = 100$ μm^2) montre que les premiers passages de la pointe sur une surface plus petite ($S = 4$ μm^2) ont contribué à « soulever » du matériel de la surface. Cette expérience met en lumière la nature des interactions entre le verre et la PLL, même s'il est possible que ce résultat s'explique aussi par le dépôt d'un matériel quelconque provenant de la pointe de l'AFM.

Influence de la charge contenue par les terminaisons amine de la PLL

Les chaînes latérales des unités d'acide aminé de lysine dont est composée la PLL sont fortement basiques. Leur pKa est de 10,53 [138]. Cette valeur représente le pH auquel la moitié des groupes amine est protonée. Pour un acide aminé, ce pKa est inhabituellement élevé et signifie que la PLL conserve sa charge dans un milieu modérément alcalin, ce qui est le cas des milieux de culture dont nous nous servons (pH $\sim 7,4$). Bien que la charge positive de la PLL puisse peser sur les propriétés de surface du substrat verre/PLL, et que les charges des substrats soient susceptibles

— Structure supposée d'oligomères d'EDA chimisorbés au verre —



— Conformation supposée de la PLL physisorbée au verre —

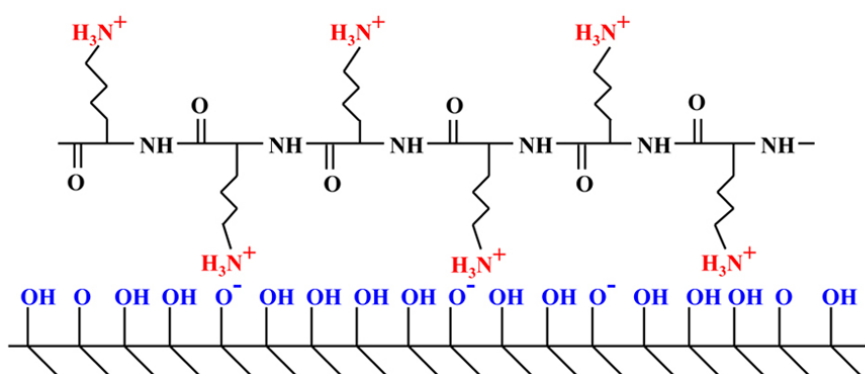


FIGURE 5.13: Schémas représentant les structures supposées des substrats eda' et du verre/PLL. La surface de l'eda' expose des groupes NH_2 distribués de façon hétérogène suite à une polycondensation chaotique de la molécule EDA. La distribution des groupes NH_3^+ de la PLL est en revanche très homogène.

d'influencer le comportement des cellules neuronales [139], il est peu probable que cette charge joue un rôle significatif dans le cadre de nos expériences. Premièrement, malgré la valeur élevée du pK_a de la PLL, il doit exister en milieu aqueux un échange de charge permanent au niveau des amines. Deuxièmement, il est possible que la présence de sels dans les milieux de culture puisse réduire l'influence des charges localement en jouant le rôle de tampon. Cette hypothèse a fait l'objet d'une expérience par STENGER et coll. [27] montrant que le ratio amines protonées/amines déprotonées était similaire entre un substrat de verre/PLL et un substrat de verre/EDA, lesquels ont été préalablement trempés durant quelques heures dans une solution de DMEM (« Dubelcco's Modified Eagle Medium », base des milieux employés pour la culture cellulaire, riche en sels).

Afin de lever les doutes suscités par la présence éventuelle de cette charge, un biopolymère similaire à la PLL, mais non chargé car comportant une chaîne latérale plus courte d'un groupe CH_2 , a fait l'objet d'expériences de culture cellulaire réalisées dans les mêmes conditions : il s'agit de la poly-L-ornithine (PLO ; cf. figure 2.3). Nous verrons au cours du chapitre 8 si le comportement des cellules diffère d'un substrat de verre/PLL à un substrat de verre/PLO.

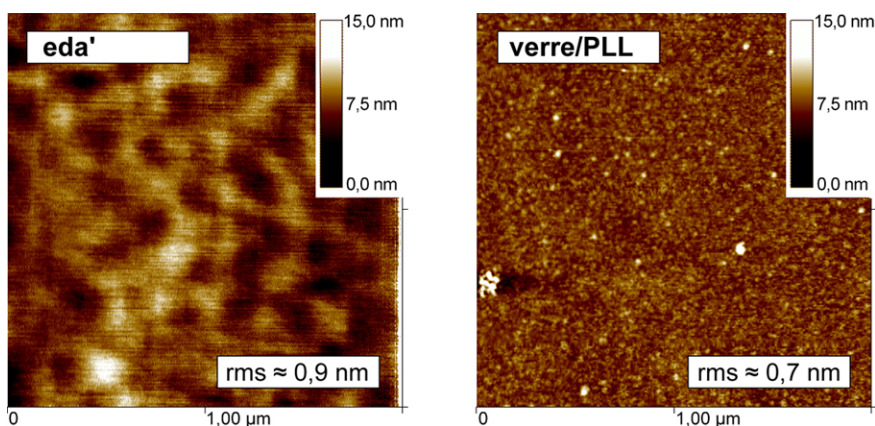


FIGURE 5.14: Comparaison topographique par AFM des substrats eda' et verre/PLL. Même si le rms est semblable d'un substrat à l'autre, la rugosité diffère d'un point de vue topographique : la surface de l'eda' semble exposer des agrégats moléculaires que ne présente pas la surface de verre/PLL.

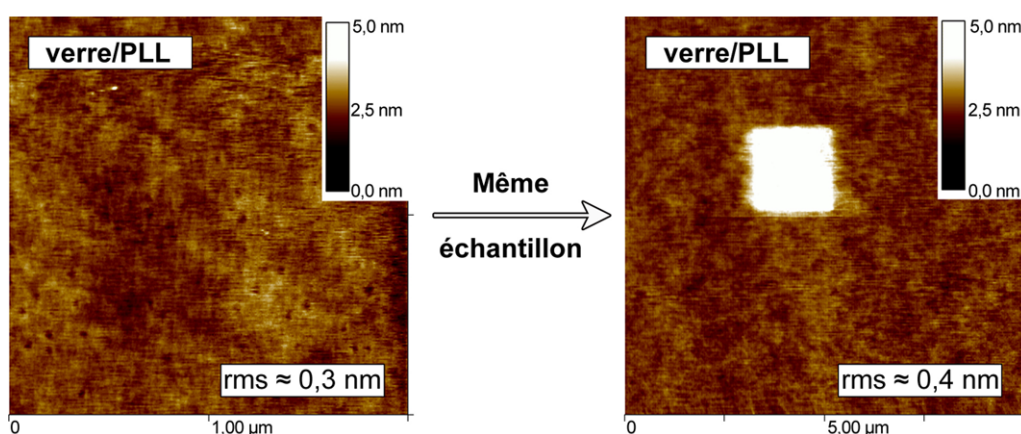


FIGURE 5.15: Images AFM d'un échantillon de verre/PLL sur $4 \mu\text{m}^2$ puis sur $100 \mu\text{m}^2$. L'image de droite suggère que le passage de la pointe de l'AFM a « soulevé » du matériel adsorbé à la surface du verre. Notons que, contrairement à l'image AFM présentée à la figure 5.14, la valeur du rms est cette fois-ci similaire à celle du verre propre. Ce résultat s'explique peut-être par une moins bonne résolution de l'image obtenue ici.

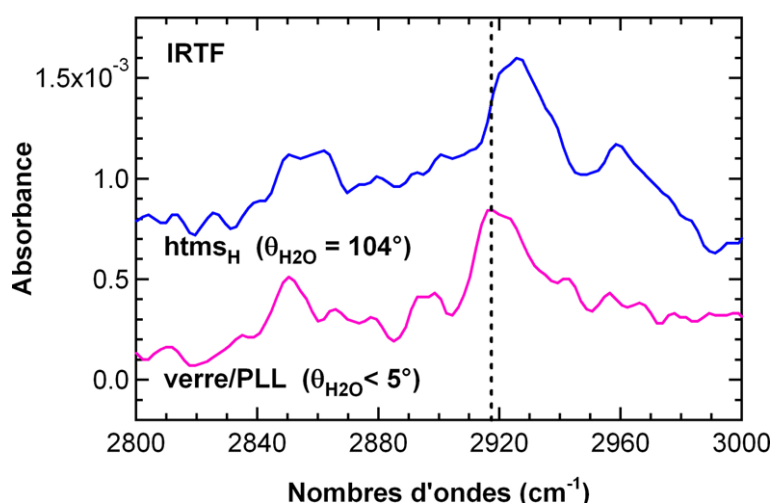


FIGURE 5.16: Spectres IR des substrats verre/PLL et htms_H (surfaces NH_2 et CH_3 de classe 1). L'intensité des pics CH_2 des deux spectres est comparable. Ce résultat est à corréliser avec la similarité de la longueur de leurs chaînes latérales respectives. Il reflète indirectement l'auto-assemblage très ordonné de la PLL à la surface du verre (cf. chapitre 4).

5.3.2 Poly-L-lysine physisorbée sur du polystyrène

D'après les images AFM présentées à la [figure 5.17](#), la topographie des surfaces de plastique (ou polystyrène, PS) ne semble pas modifiée une fois ces dernières recouvertes de PLL. En effet, quel que soit le type de boîte de pétri utilisé, les structures représentées sont de toute évidence caractéristiques des fibres de plastique qui les composent. Si ces fibres se croisent sur les boîtes 350001 (Falcon™), elles semblent arrangées de façon parallèle sur les boîtes T25 (Falcon™). Dans les deux cas, la rugosité mesurée n'excède pas 3 nm pour ce qui est du rms. La surface de la boîte T25 semble toutefois plus lisse que celle de la 350001, son rms étant pourtant légèrement supérieur ($\sim 2,9$ nm contre $\sim 2,2$ nm).

Bien qu'une simple observation indique que le mouillage des surfaces de plastique par la PLL soit moins favorable que sur le verre propre, il est vraisemblable que la distribution des énergies de surface soit également très homogène pour les substrats PS/PLL. En effet, d'après les renseignements fournis par le fabricant, les boîtes « [...] » offrent une chimie de surface uniforme, créée par un traitement sous vide au plasma qui permet l'adhérence des cellules. La surface de culture hydrophile contient des groupes fonctionnels chargés négativement favorisant l'adhérence et la croissance cellulaire. » Nous pouvons donc supposer que la PLL crée des liaisons de nature électrostatique avec le PS, et en conséquence, s'étale de façon uniforme sur celui-ci, produisant une monocouche de PLL épousant la topographie du substrat de PS sous-jacent.

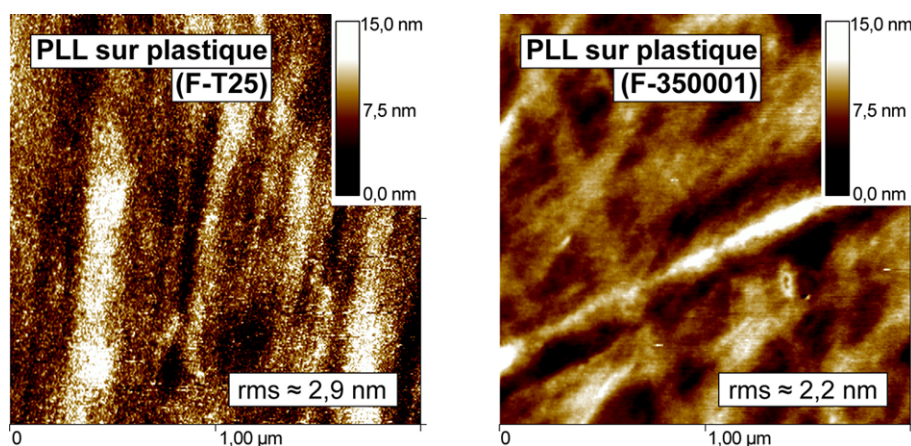


FIGURE 5.17: Poly-L-lysine (PLL) adsorbée sur deux substrats de plastique différents (images AFM). De toute évidence, la PLL adopte la morphologie des fibres de plastique, quel que soit le substrat de plastique considéré.

5.3.3 Conclusions

L'analyse des surfaces NH_2 , bien qu'essentiellement réduite à des expériences de mouillage, a néanmoins permis de distinguer la plupart des substrats fabriqués. De même que pour les surfaces CH_3 , les surfaces NH_2 ont été classées dans les trois grandes catégories relatives à la distribution d'énergie de surface, décrites au [chapitre 2](#). Seul le deta laisse place au doute, les expériences réalisées ne permettant pour l'instant pas d'assigner ce substrat à la classe 2 (surfaces modérément désordonnées) ou à la classe 3 (surfaces très désordonnées). Nous verrons au cours de la deuxième partie du document ([chapitre 9](#), page 155) dans quelle mesure les expériences de culture cellulaire permettent de trancher en faveur de l'une ou l'autre de ces classes en ce qui concerne l'assignation du deta.

Plus généralement, l'analyse révèle que les surfaces NH_2 se distinguent suivant d'autres paramètres que les surfaces CH_3 . Le meilleur exemple nous est fourni par les valeurs déterminées pour les énergies de surface totale γ_s . Là où les surfaces CH_3 présentaient des valeurs relativement inégales ($21,6 \text{ mN m}^{-1} \leq \gamma_s \leq 59,9 \text{ mN m}^{-1}$), les γ_s des surfaces NH_2 sont compris dans

un intervalle plus réduit ($50,1 \text{ mN m}^{-1} \leq \gamma_s \leq 56,3 \text{ mN m}^{-1}$ pour le couple de liquides $[H_2O, MI]$). D’une part, ces distinctions vont nous permettre de cibler de façon précise les paramètres de surface essentiels relatifs au comportement des cellules une fois cultivées sur ces surfaces. D’autre part, les gammes d’énergie de surface étant globalement du même ordre de grandeur entre substrats à terminaisons amine et méthyle, nous allons pouvoir comparer leurs effets sur les cellules en termes d’affinité chimique. Nous considérerons pour cela des substrats de classe identique mais chimiquement différents. Tous les substrats ayant fait l’objet de manipulations de culture cellulaire sont récapitulés dans le [tableau 5.5](#).

TABLEAU 5.5: Récapitulatif des substrats utilisés pour la culture cellulaire. Les substrats sont classés suivant l’organisation des groupes terminaux (CH_3 ou NH_2) exposés en surface : très ordonnée (classe 1), partiellement désordonnée (classe 2), ou très désordonnée (classe 3).

	classe 1	classe 2	classe 3
Surfaces CH_3	ots	ods	htms _{M1}
	otms	otms _x	htms _{M2}
	htms _H	htms _{Hx}	htms _{M3}
		odms _{x2}	
		odms _{24h}	
Surfaces NH_2^*	verre/PLL	adms	eda
	verre/PLO [†]	aptms	eda'
	PS/PLL [‡]		peda
			peda'
		deta [§]	

* La surface de verre/PLL est en fait une surface dotée d’une terminaison NH_3^+ .

† La surface du verre/PLO est supposée partager des propriétés identiques à celle du verre/PLL, excepté la charge surfacique contenue par la surface du verre/PLL, absente de la surface de verre/PLO.

‡ Classification supposée de la surface, malgré son caractère plus rugueux que la surface de verre/PLL.

§ L’analyse du deta ne permet de conclure à sa classification dans la classe 2 ou 3. Le devenir des cellules en culture sur cette surface nous permettra néanmoins de lever une partie du voile sur sa nanostructure (cf. page 155).

Deuxième partie

**NEURONES : CULTURE SUR
SURFACES MODIFIÉES**

Chapitre 6

Introduction aux propriétés des cellules neuronales

Le neurone, unité fonctionnelle du système nerveux, est responsable de l'émission et de la propagation du message nerveux. C'est une cellule excitable, qui transmet, propage et intègre des signaux électriques en fonction des informations qu'elle reçoit. Cette propriété est due à la présence, dans la membrane plasmique, de protéines spécifiques, formant des structures qui laissent passer certains ions : les canaux ioniques. Le neurone est une cellule particulière qui se caractérise par ses prolongements émergeant du soma (figure 6.1).

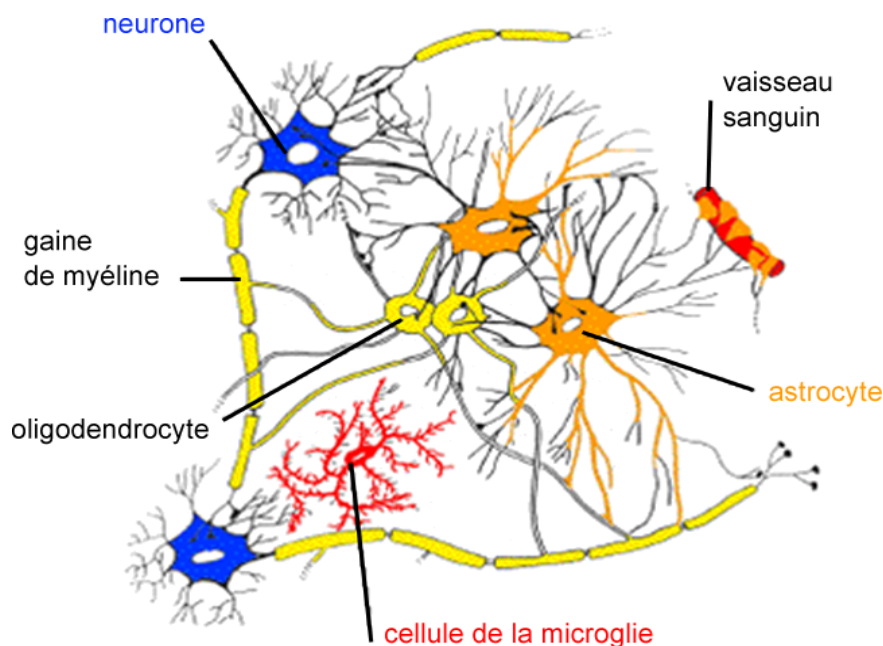


FIGURE 6.1: Schéma représentant des neurones parmi la matrice extracellulaire environnante.

Ces prolongements se divisent en deux catégories : l'axone et les dendrites. L'axone, unique à chaque neurone, constitue le prolongement le plus long. Il se ramifie pour former l'arborisation terminale et à chaque terminaison se trouve un bouton synaptique. Dans le système nerveux central (SNC), cette synapse représente le point de contact entre deux neurones, sachant qu'un neurone peut être connecté à plus de cent mille autres neurones. Dans le système nerveux périphérique (SNP), la jonction neuromusculaire représente le point de contact entre un motoneurone et une fibre musculaire. Le cerveau d'un mammifère comporte un nombre de neurones qui est de l'ordre de cent milliards. Malgré cela, les neurones ne comptent que pour environ 10% du total des cellules présentes dans le cerveau. En effet, environ 90% des cellules sont des cellules gliales. Ayant

des fonctions de protection immunitaire et de nutrition des neurones, elles jouent aussi un rôle dans le traitement et la modulation des signaux nerveux [140]. Les principales cellules formant le système nerveux, hormis les neurones, sont donc les cellules de la macroglie, composée d'astrocytes, d'oligodendrocytes, ou de cellules de Schwann. Les astrocytes relient les cellules nerveuses avec les vaisseaux sanguins. Les prolongements des oligodendrocytes s'enroulent autour des axones de plusieurs cellules du SNC qu'ils myélinisent, tandis que les cellules de Schwann myélinisent une seule fibre du SNP en s'enroulant de très nombreuses fois autour d'un axone (figure 6.1).

Durant ce chapitre, nous introduirons la cellule PC12, utilisée comme modèle de neurone dans ce travail. Nous décrirons quelles sont les spécificités qui la caractérisent, et qui expliquent pourquoi nous l'avons choisie pour nos expériences. Nous nous attacherons ensuite à présenter la structure du cytosquelette des cellules neuronales, les ressorts dynamiques des polymères qui le composent, et permettent aux cellules tant de se mouvoir que d'interagir avec leur substrat d'adhésion. Le cytosquelette est composé de trois types de polymères : les filaments d'actine ($\varnothing \approx 8$ nm), que l'on nomme aussi « microfilaments », les microtubules ($\varnothing \approx 25$ nm) et les filaments intermédiaires ($\varnothing \approx 11$ nm), également appelés neurofilaments dans le cas spécifique où les cellules considérées sont des neurones. Les neurofilaments ont des propriétés qui s'expriment particulièrement lorsqu'une connexion synaptique est formée. À cet instant, le diamètre de l'axone est accru de l'ordre de 5 fois ce qu'il était auparavant [141, 142]. Ayant un caractère polaire, les neurofilaments se repoussent les uns les autres et permettent ainsi de fixer le diamètre de l'axone. Des études relativement récentes indiquent que les neurofilaments sont impliqués dans les mécanismes de croissance axonale [143, 144]. Cependant, ces derniers font surtout la part belle à l'activité combinée des filaments d'actine et des microtubules au sein du cône de croissance [145, 146], structure située à l'extrémité de l'axone en phase d'extension. La dernière partie du chapitre nous conduira à présenter le rôle du cône de croissance et ses mécanismes de fonctionnement lors de la progression d'un axone sur un substrat.

6.1 Spécificités des cellules PC12 en tant que modèle de cellule neuronale

6.1.1 Généralités

Les cellules PC12 (figure 6.2) sont comme leur nom l'indique, dérivées d'un phéochromocytome (« PC ») de rat mâle. Elles constituent une lignée cellulaire de nature clonale, par opposition aux cellules primaires. Dans le cas où ces dernières sont des neurones, elles sont directement extraites du cerveau, tandis que les cellules PC12 requièrent un traitement spécial visant à les différencier en cellules de type neuronal. En effet, le phéochromocytome dont elles furent extraites et isolées, en 1976 [147], correspond à une tumeur d'une glande surrénale, qui ne fait donc pas partie du système nerveux. Une caractéristique de l'aspect tumoral de ces cellules est la perte du contrôle du cycle cellulaire. Cela se traduit notamment par l'absence de signal apoptotique, qui normalement déclenche la mort cellulaire. Les cellules sont donc en mesure de se diviser ou proliférer indéfiniment.

Le processus de différenciation correspond à l'expression différentielle des gènes contenus par toutes les cellules d'un organisme. Cette faculté qu'ont les cellules d'exprimer différenciellement certains gènes par rapport à d'autres, et donc de synthétiser les protéines issues de leur transcription dans des quantités distinctes, mène à la spécialisation des cellules, dont chaque type est assigné à une tâche spécifique au sein de l'organisme. Dans le cas des cellules neuronales, la différenciation se traduit par le développement de neurites (figure 6.2), terme qui regroupe à la fois les axones et les dendrites en phase de croissance. Ces neurites prennent naissance au niveau du soma des cellules, contenant le noyau qui lui-même contient le programme génétique (ou l'ADN). Elles s'étendent jusqu'à former des synapses avec d'autres cellules, qu'il s'agisse d'autres neurones ou de types cellulaires distincts tels que les cellules gliales ou les myoblastes, par exemple.

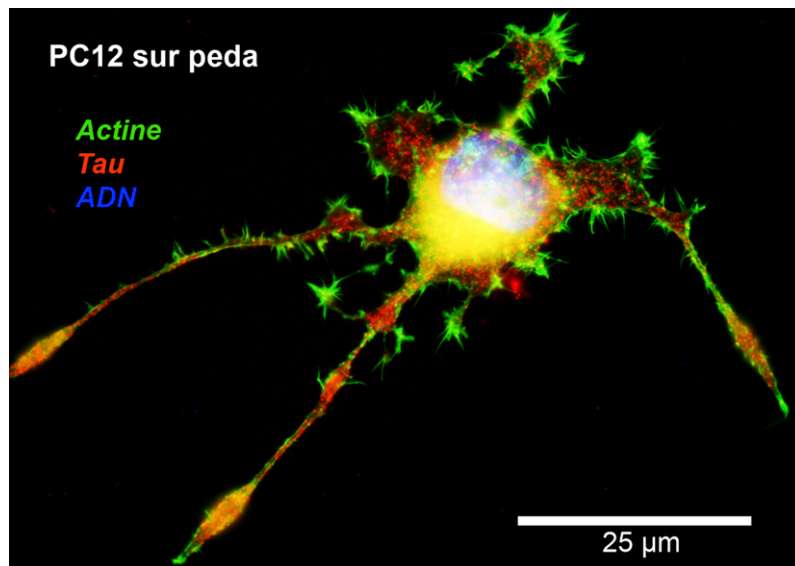


FIGURE 6.2: Image d'une cellule PC12 obtenue à la suite d'un immunomarquage (cf. chapitre 7). L'observation est faite par microscopie à épifluorescence (voir page 133).

6.1.2 Sensibilité au facteur de croissance nerveux (NGF)

La spécificité des cellules PC12, en tant que lignée cellulaire clonale, provient du fait qu'elles expriment le TrkA et le p75 [148,149], récepteurs transmembranaires du facteur de croissance nerveux (NGF, pour « nerve growth factor » ; figure 6.3). Les cellules PC12 deviennent par conséquent susceptibles de stopper leur processus de division, et du même mouvement, de se différencier en un phénotype neuronal, dès lors que le milieu dans lequel elles sont cultivées contient une concentration adéquate de NGF [92]. Cette faculté fait donc des cellules PC12 un modèle particulièrement adapté pour étudier les mécanismes de différenciation neuronale. La stabilité de l'état différencié obtenu est caractérisée par des spécificités propres aux cellules neuronales considérées de façon générale : les cellules sont excitables électriquement [150] et expriment des protéines caractéristiques de l'état de différenciation, en particulier celles liées au cytosquelette comme Tau et MAP1B [151].

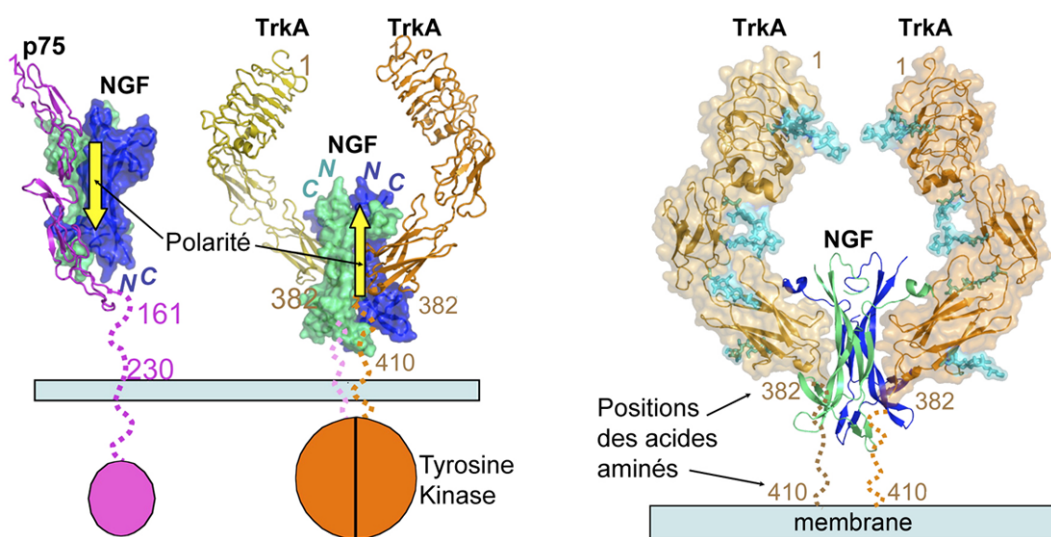


FIGURE 6.3: Structures des complexes NGF/p75 et NGF/TrkA (adapté de la Réf. [152]). Les lettres majuscules N et C indiquent la position des N-terminaux et des C-terminaux du NGF (en vert et en bleu). Les lignes pointillées indiquent les connecteurs peptidiques entre la membrane et les domaines du TrkA et du p75 en contact avec le NGF. Ces connecteurs sont long d'environ 30 et 70 acides aminés pour le TrkA et le p75, respectivement.

La différenciation des PC12 en cellules neuronales est susceptible d’être déclenchée par différents types de stimuli. Premièrement, la différenciation est possible dans un milieu non suppléé par l’addition de NGF. Elle est dans ce cas observée sur des substrats mous composés de différents éléments de matrices extracellulaires (ECM, pour « extra-cellular matrix »). Parmi ceux-ci, on relève une matrice extracellulaire dérivée d’astrocytes [153], ou bien une combinaison de collagènes de différents types couplés avec des protéoglycanes, des glycosaminoglycanes, de la fibronectine et de la laminine [154]. Deuxièmement, toujours dans un milieu sans NGF, la production de neurites par les PC12 est observée suite à des stimulations électriques [150] ou encore lorsque les cellules sont cultivées sur des surfaces électroactives [155]. Troisièmement, et comme évoqué plus haut, l’addition de NGF au milieu de culture provoque la différenciation neuronale en activant des cascades de signalisation intracellulaire, dont celle impliquant le complexe protéique I κ B kinase [156]. L’effet du NGF semble également corrélé à l’influx d’ions calcium de la matrice externe vers le cytoplasme chez les cellules PC12 [157], et dans d’autres cellules comme les 3T3, les récepteurs du NGF peuvent s’associer au canaux calciques de manière à augmenter la concentration intracellulaire de Ca²⁺ [158]. Les processus de vectorisation des ions calcium à travers les membranes sont considérés comme jouant un rôle important dans la croissance neuronale [20]. Enfin, le NGF peut induire la différenciation en activant la synthèse de protéines, telles Tau [151, 159] et MAP1B [151, 160] qui s’associent non seulement aux microtubules, mais aussi aux filaments d’actine [159, 160] du cytosquelette. Décrivons à présent la structure de ces derniers, ce qui nous donnera une idée plus précise de la manière dont s’effectue la croissance des neurites.

6.2 Dynamique des structures du cytosquelette des cellules neuronales

6.2.1 Microfilaments d’actine

L’extension des neurites en direction d’une population de cellules-cibles s’appuie sur la dynamique des microtubules et des filaments d’actine [145, 161]. Ces microfilaments constituant le cytosquelette cellulaire participent activement à ce processus d’extension en étant continuellement polymérisés et dépolymérisés à divers endroits de la cellule. La [figure 6.2](#) montre la localisation des filaments d’actine : situés dans les régions proches de la membrane cellulaire, ces filaments s’associent sous diverses formes, sur lesquelles nous reviendrons, pour constituer le « cortex » d’actine. Les filaments d’actine sont les plus flexibles des filaments du cytosquelette, et leur dynamique est par conséquent à l’œuvre dans nombre de mécanismes impliquant la mobilité cellulaire. Pour les phénomènes de mobilité intrinsèque (hors substrat d’adhésion), et dont le mouvement s’appuie uniquement sur la dynamique des microtubules (comme par exemple pour les spermatozoïdes), on parlera plutôt de « motilité ». L’actine est très impliquée dans le processus d’adhésion au substrat, préalable à tout éventuel mouvement cellulaire nécessitant un support mécanique.

La flexibilité des filaments d’actine provient de leur structure relativement simple. Les monomères d’actine, protéine de 42 kDa, s’assemblent les uns aux autres suivant une hélice double ([figure 6.4](#)), formant un homopolymère dont le diamètre est d’environ 8 nm, et la longueur de persistance 17 μ m, soit environ le diamètre du soma d’une cellule PC12. Les monomères d’actine sont dénommés actine-G, pour actine globulaire, et les homopolymères actine-F, signifiant actine filamentueuse. Chaque filament d’actine est polarisé, comportant une extrémité (+) et une autre (-). L’extrémité (+) est composée de monomères d’actine liés à l’ATP (adénosine triphosphate) tandis que l’extrémité (-) est associée à des monomères d’actine liés à l’ADP (adénosine diphosphate), i.e. de l’ATP hydrolysé ou déphosphorylé [162]. Cette polarisation de la structure hélicoïdale découle de l’asymétrie de l’actine-G.

L’actine associée à un filament a tendance à hydrolyser son ATP. Cette propriété est, avec la polarité du filament, à l’origine du phénomène dit de « tapis roulant » (en anglais : « treadmill ») [163]. L’extrémité (+) se lie plus facilement que l’extrémité (-) à l’actine-ATP, en

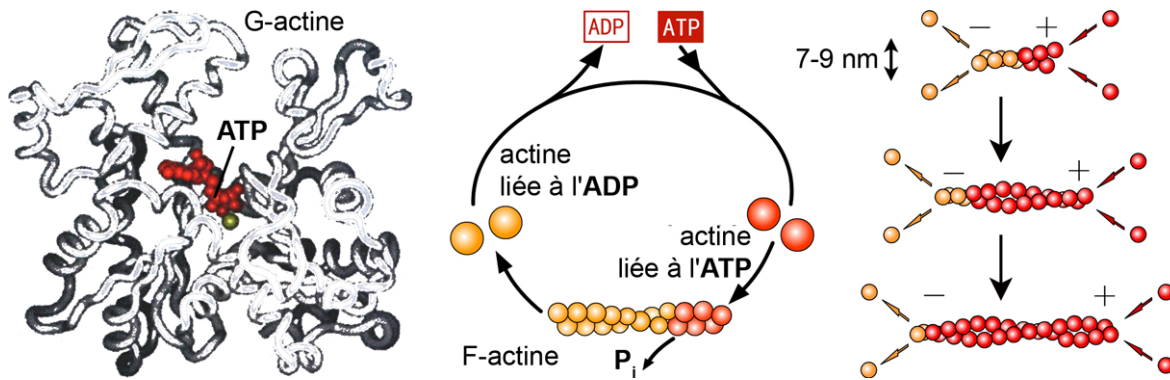


FIGURE 6.4: Illustration de la structure de l'actine globulaire, de l'actine filamenteuse, du cycle de polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine, et de la croissance rapide d'un filament.

concentration plus grande que l'actine-ADP dans les cellules, favorisant l'homopolymérisation de l'actine à l'extrémité (+). L'extrémité (-) étant moins active, l'actine du filament qui en est proche a passé plus de temps sous la forme filamenteuse, et est majoritairement sous forme d'ADP-actine. L'équilibre est donc déplacé vers la dépolymérisation à l'extrémité (-). Ainsi la chaîne croît en permanence du côté (+) et décroît du côté (-), et l'ensemble donne l'impression de se déplacer par rapport à un monomère central virtuellement maintenu à un endroit fixe. L'apport d'énergie nécessaire pour maintenir cet état hors d'équilibre se fait dans le cytosol (milieu liquide environnant), où l'ADP-actine est régénérée en ATP-actine. Le terme « tapis roulant » suggère que les monomères quittant l'extrémité (-) reviennent se fixer à l'extrémité (+) après un passage en solution. Ce processus peut être comparé aux mouvements permettant à certaines cellules, dont les PC12, de se déplacer au moyen d'un lamellipode. Le lamellipode correspond à une organisation des microfilaments d'actine en réseaux. Ces microfilaments peuvent aussi s'organiser en faisceaux, pour former des filopodes. Les filopodes et les lamellipodes feront l'objet d'une description approfondie à la [section 6.3](#).

6.2.2 Microtubules

Les microtubules, formés de la polymérisation de dimères de tubuline- α et de tubuline- β (masse moléculaire d'un dimère : ~ 100 kDa), sont beaucoup plus rigides que les filaments d'actine. Constituant des structures cylindriques d'environ 25 nm de diamètre ([figure 6.5](#)), leur longueur de persistance est de plusieurs millimètres, ce qui est gigantesque à l'échelle d'une cellule. Cette rigidité leur permet, d'une part, de participer aux processus de divisions cellulaires, en générant des forces suffisantes pour séparer les chromosomes, et d'autre part, de constituer les multiples « colonnes vertébrales » des neurites. L'agencement des microtubules est en effet responsable de la forme des extensions neuritiques, leur fournissant de plus un support pour le transport de matériaux cellulaires nécessaires à leur renouvellement et à leurs fonctions. Les microtubules servent ainsi d'« autoroutes » permettant le transport actif de vésicules par l'intermédiaires de protéines associées que l'on nomme également « moteurs moléculaires » : les kinésines transportent vers l'extrémité positive (+), processus appelé transport « antérograde », tandis que les dynéines transportent vers l'extrémité négative (-), il s'agit dans ce cas d'un transport « rétrograde ». Ce transport actif vient s'ajouter aux mouvements intracellulaires des molécules ou organites qui s'appuient sur les phénomènes diffusifs, beaucoup plus lents.

Le processus de formation est le suivant : les α -tubulines (liées au GTP) s'associent aux β -tubulines (liées au GTP ou GDP) pour former des dimères, qui eux-mêmes s'associent en protofilaments. L'association de 13 protofilaments conduit à la formation d'un cylindre : le microtubule ([figure 6.5](#), coupe transversale en bas à droite de la figure). Les principes régissant la dynamique des microtubules sont similaires à ceux de l'actine. La guanosine triphosphate (GTP) liée aux

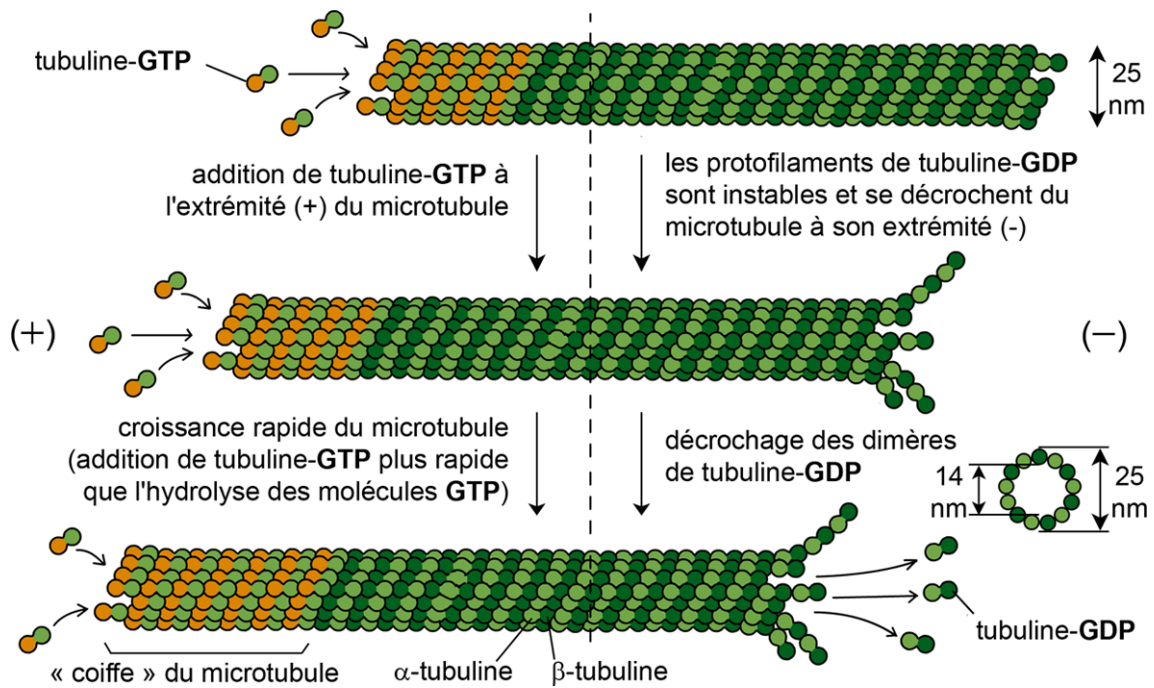


FIGURE 6.5: Schématisation de la structure et des mécanismes de polymérisation/ dépolymérisation des microtubules.

tubulines de l'extrémité (+) joue un rôle similaire à celui de l'ATP dans le cas de l'actine. La tubuline-GTP est préférentiellement captée par l'extrémité (+). Au sein du filament, la tubuline hydrolyse son GTP, et les tubulines-GDP (guanosine diphosphate) résultantes sont instables, menant à une dépolymérisation du côté de l'extrémité (-) [162]. La figure 6.5 illustre le phénomène de croissance rapide du microtubule, qui correspond au cas où l'addition de dimères de tubuline s'effectue plus rapidement que l'hydrolyse des tubuline-GTP. Ce processus est en cela similaire à celui illustré à la figure 6.4 et qui concerne l'actine. Il existe cependant une différence de taille entre la dynamique des deux filaments : le microtubule est en fait potentiellement beaucoup plus instable, et sujet au phénomène de « catastrophe », qui correspond à une dépolymérisation très rapide, et donc à un raccourcissement brutal du microtubule. Cela se produit lorsque l'extrémité (+) du microtubule perd sa « coiffe » de tubulines-GTP [164], qui stabilisent le microtubule en gardant les protofilaments à proximité les uns des autres [165].

Au sein des cellules, les microtubules sont organisés en faisceaux, interagissent entre eux, avec les microfilaments d'actine, ainsi qu'avec des centaines de protéines qui régulent sans cesse leur activité [166], et permettent un niveau d'organisation très complexe du cytosquelette. Arrêtons-nous quelques instants sur ces protéines qui présentent un intérêt particulier dans le cadre de notre étude.

6.2.3 Protéines associées aux microtubules

Les protéines associées aux microtubules (MAP, pour « microtubule-associated protein ») remplissent un large éventail de fonctions. Ces dernières incluent la stabilisation ou la déstabilisation des microtubules, la faculté de guider la polymérisation des microtubules vis-à-vis de trajectoires spécifiques, le pontage des microtubules entre eux, et la régulation des interactions entre les microtubules et d'autres types de protéines. Tau [167] et MAP1B [168], dont il est fait mention plus haut, sont des protéines clés. Les deux protéines contrôlent et maintiennent l'espacement entre les microtubules, leur permettant de s'organiser en faisceau (figure 6.6). MAP1B fait aussi le lien entre le microtubule par son extrémité C-terminale, et les neurofilaments ou l'actine corticale (sous la membrane) par son extrémité N-terminale, permettant d'organiser l'espace autour du microtubule [169].

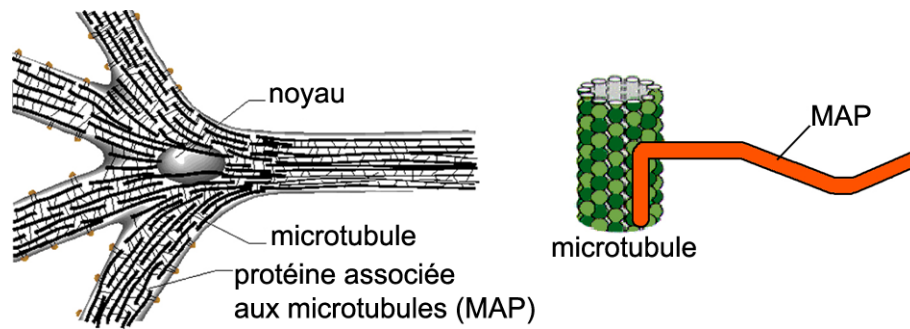


FIGURE 6.6: Représentation schématique des MAPs au sein des neurites (adapté de la Réf. [172]), et de leurs fonctions de contrôle de l'espace entre les microtubules.

Tau est identifié comme facteur stabilisant, dans la mesure où cette protéine prévient le scénario « catastrophe » évoqué pour les microtubules. Corrélativement, Tau intervient principalement là où les microtubules sont les plus dynamiques, c'est-à-dire à leurs extrémités, de façon à faire pencher l'équilibre polymérisation/dépolymérisation en faveur de l'addition de nouvelles sous-unités de tubulines, stimulant ainsi la croissance des microtubules [170]. Ce processus est parallèle à l'organisation en faisceaux des microtubules, également régulée par Tau [171].

L'interaction de la protéine Tau avec les microtubules est régulée par phosphorylation. Tau est une phosphoprotéine qui contient environ 80 sites potentiels de phosphorylation. La régulation de l'état de phosphorylation de la protéine Tau résulte des activités conjointes de protéines kinases et de protéines phosphatases. Une défaillance dans le fonctionnement des mécanismes de phosphorylation de la protéine Tau peut avoir des conséquences graves. Par exemple, la maladie d'Alzheimer correspond à une hyperphosphorylation de Tau qui conduit la protéine à se détacher massivement des microtubules, entraînant leur déstabilisation dans les cellules nerveuses [173]. Cette déstabilisation est supposée en partie responsable des symptômes présentés par la maladie, dont la perte de mémoire est l'un des plus connus.

L'activité des MAP est, elle aussi, régulée par de nombreuses protéines [166], ce qui peut être à l'origine de réactions en cascade extrêmement rapides, menant à des réorganisations du cytosquelette s'effectuant donc elles aussi très rapidement. Dans le cas des cellules neuronales, une forte activité des MAP est concentrée dans une région proche ou au sein même de la structure qui forme l'extrémité des neurites en phase d'extension (ou de rétraction) : le cône de croissance.

6.3 Cône de croissance : « tête chercheuse » ou « cerveau » des neurites

Situé à l'extrémité des excroissances neuritiques, le cône de croissance sonde l'environnement extracellulaire de façon à orienter la trajectoire de la neurite vers une population de cellules-cibles (figure 6.7). Les paramètres intégrés sont notamment la topographie [23–25], la chimie de surface [27–29] et l'élasticité du substrat [30, 31, 33]. À ces paramètres, s'ajoutent les gradients de molécules solubles, tels que l'ion calcium [19] ou les facteurs neurotrophiques [174]. L'influence de la distribution d'énergie du substrat, mettant en jeu des gradients à une échelle relativement grande (4,24 mm × 4,24 mm), a également fait l'objet d'une étude [16], montrant que les neurites étaient préférentiellement initiées dans une direction parallèle aux gradients.

6.3.1 Structure et protéines associées aux filaments d'actine

L'existence des cônes de croissance est révélée en 1890 par l'histologiste espagnol Santiago RAMÓN Y CAJAL, lequel se base à l'époque sur des images stationnaires prises au microscope pour décrire le cône de croissance comme « une concentration protoplasmique de forme conique, sujette à des protrusions cytoplasmiques » [175]. Les « protrusions », que l'on peut définir comme

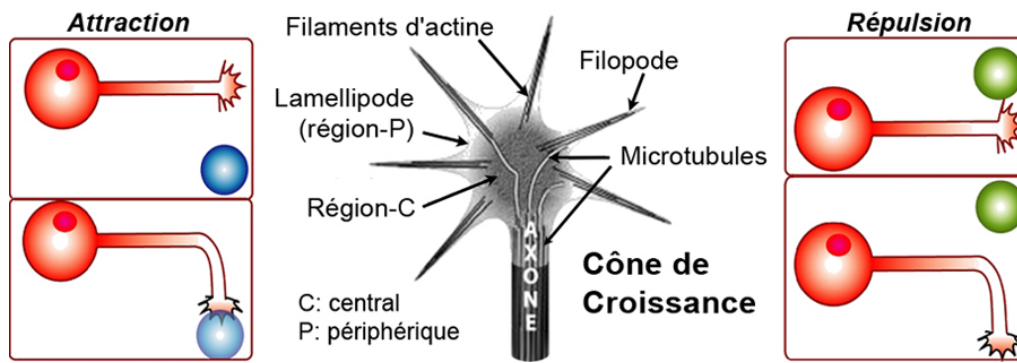


FIGURE 6.7: Illustration schématique d'un cône de croissance, de ses structures, et de ses fonctions de guidage dans l'orientation de la croissance neuritique.

« projections de matériel cellulaire » font déjà référence au caractère extrêmement dynamique du cône de croissance, dont les fonctions sensibles, motrices, intégratives et adaptatives au milieu environnant découlent en droite ligne de sa structure très spécialisée.

La morphologie du cône de croissance peut se décomposer en deux zones distinctes : une région centrale (région-C) et une région périphérique (région-P) (figure 6.7). La région-C voit l'extrémité des faisceaux de microtubules constamment alimentée par l'apport de nouvelles molécules de tubuline. L'agencement des microtubules nouvellement constitués s'effectue dans la direction déterminée par les processus hautement dynamiques ayant lieu en amont du cône de croissance, dans la région-P. Celle-ci est globalement dépourvue de microtubules, laissant la place à des filaments d'actine polymérisés soit en filopodes, soit en lamellipodes.

Les filopodes sont formés de filaments d'actine agencés parallèlement, de façon à former des structures à la fois très fines (d'un diamètre compris entre environ 100 et 800 nm [176,177] et dont la longueur peut s'étendre sur plusieurs micromètres. Cette possibilité suggère l'important potentiel d'exploration dont sont dotés les filopodes, du moins en termes d'espace accessible [146]. Les filopodes sont aussi à l'origine de la formation de nanotubes, structures qui permettent l'échange « à distance » d'organites (mitochondries, par exemple) entre deux cellules [178]. Les nanotubes se distinguent cependant des filopodes dès lors qu'à leur formation succède le détachement de la membrane du substrat. Les lamellipodes sont constitués d'actine polymérisée en un réseau de filaments régulièrement enchevêtrés, d'une épaisseur très fine (de l'ordre de 100 nm, tout comme les filopodes [177]) par rapport à la neurite [179]. Les lamellipodes « avancent » sur le substrat par un mécanisme d'ondulation, de même que les filopodes (cf. figures 7.6 et 9.13), qui par ailleurs fournissent une structure sur laquelle les lamellipodes peuvent s'appuyer [146].

Même si les rôles respectifs du filopode et du lamellipode dans la croissance axonale ne sont pas totalement éclaircis, ils se distinguent vraisemblablement en raison de la surface plus importante couverte par le lamellipode, et dans les relations respectives qu'ils entretiennent avec les microtubules. À ce sujet, il convient d'ajouter que les microtubules sont susceptibles de pénétrer de façon transitoire dans la région-P du cône de croissance [180], *via* le processus d'instabilité dynamique qui correspond à une croissance très rapide, déjà décrite. En se projetant de telle sorte, l'extrémité (+) entre en liaison avec la base des filopodes, comme illustré à la figure 6.7, et participe ainsi de l'orientation prise par le cône, et donc par la neurite, au cours de sa croissance [145,177]. Par ailleurs, le lamellipode peut exercer des forces sur le substrat dont l'intensité atteint les 20 pN, tandis que le filopode n'exerce aucune force supérieure à 3 pN [181].

De nombreuses protéines viennent réguler l'activité des microtubules et des filaments d'actine (figure 6.8) et les liens existant entre ces deux types de structures. Sans prétendre à l'exhaustivité, citons la fascine impliquée dans l'agencement des filaments d'actine en filopodes, et les complexes Arp2/3, qui par leur structure particulière, permettent, en se fixant à un filament d'actine, d'initier la croissance d'un nouveau filament ayant un angle précis avec le précédent. C'est ce mécanisme qui est à l'origine de la formation des lamellipodes [163]. Une protéine comme ENA/VASP

facilite la polymérisation de l'actine à l'extrémité des filopodes et des lamellipodes [182]. Cela est supposément due à son activité inhibitrice des protéines chaperonnes chargées de bloquer la polymérisation [183]. Citons enfin les myosines II, impliquées dans le flux rétrograde d'actine, que nous décrivons plus bas. Pour résumer, l'activité du cône de croissance est régulée par un grand nombre de paramètres. C'est la combinaison de tous ces paramètres, influant notamment sur le cytosquelette de la cellule, qui permet à la neurite, non seulement d'avancer sur un substrat, mais aussi d'orienter sa croissance dans des directions spécifiques. La figure 6.9 récapitule un certain nombre de facteurs que nous venons d'évoquer. Nous n'entrerons pas dans le détail des points illustrés par cette figure, le but étant ici de montrer la complexité des processus engagés.

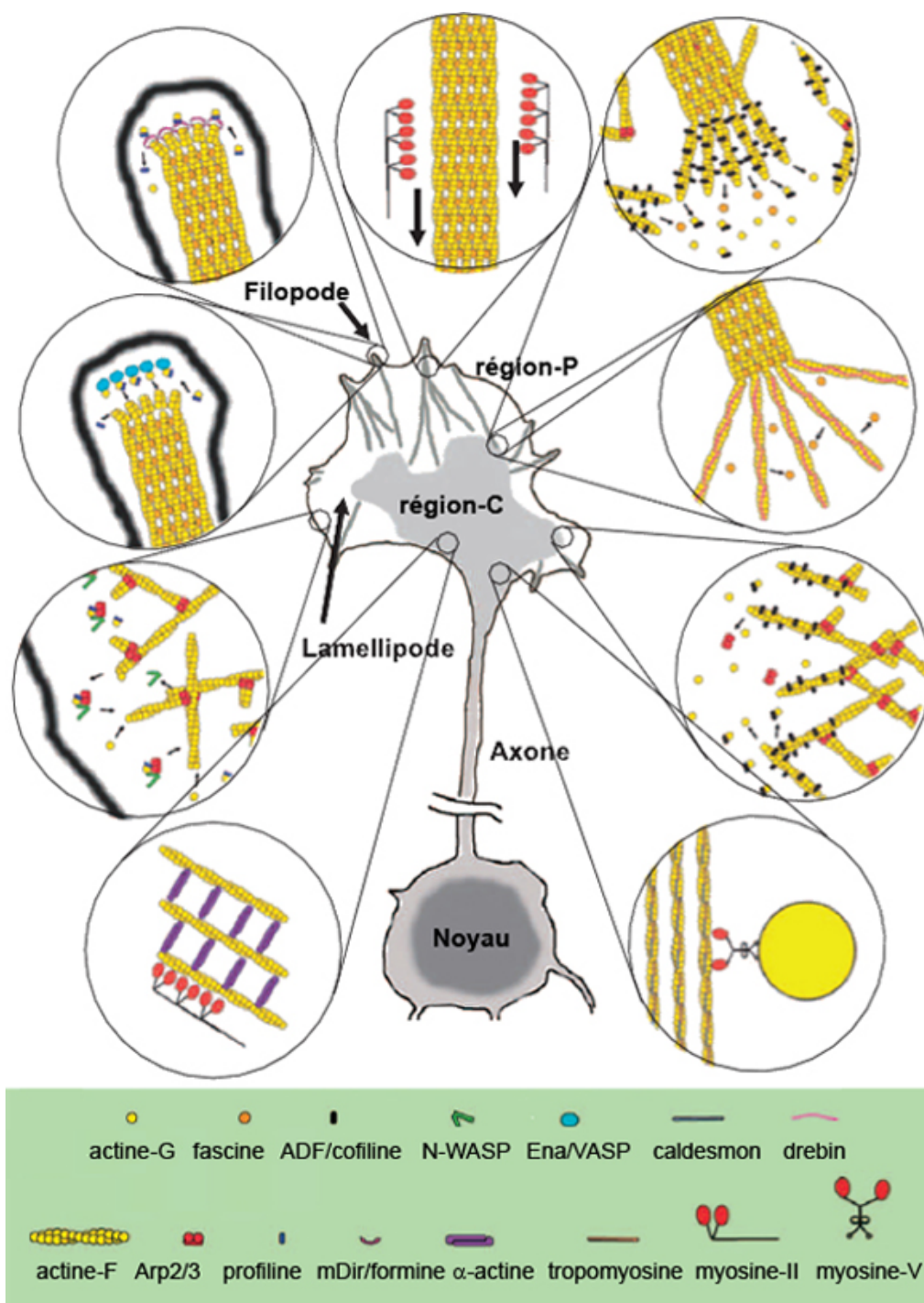


FIGURE 6.8: Illustration schématique de protéines s'associant aux filaments d'actine au niveau du cône de croissance, adapté de la Réf. [163].

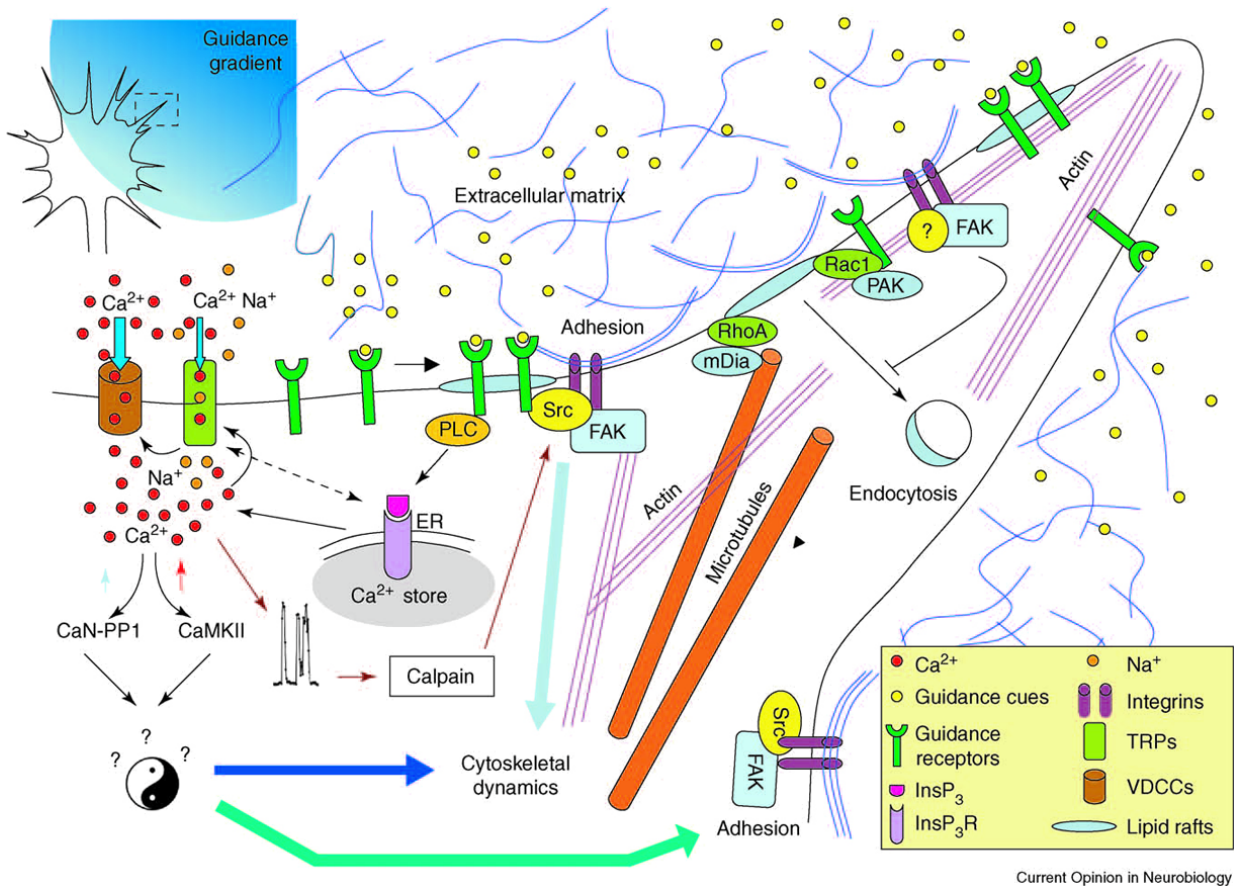


FIGURE 6.9: Schéma illustrant la complexité des réseaux de signalisation qui contrôlent la réponse du cône de croissance à des signaux extracellulaires de guidage (extrait de la Réf. [184]).

6.3.2 Mécanisme d'avancée de la neurite sur un substrat *via* le cône de croissance

L'activité coordonnée des filopodes, des lamellipodes, et des microtubules permet au cône de croissance de réagir aux signaux dispensés par le milieu extracellulaire environnant. Par exemple, des signaux chimiotactiques attractifs dispensés par des nétrines conduisent à engager la croissance de la neurite dans la direction dont elles proviennent (figure 6.7). Inversement, des sémaphorines peuvent susciter la réaction inverse, à savoir la répulsion du cône de croissance [161]. Il est aussi possible que la même molécule conduise, suivant les conditions ou le type de neurone considéré, à des réponses contraires.

Le mécanisme d'avancée du cône (figure 6.10) est généralement considéré comme étant décomposable en trois étapes distinctes : une protrusion initiale, un engorgement intermédiaire, et une consolidation finale [146]. La protrusion correspond à une projection frontale des filopodes et des lamellipodes générée par une polymérisation accrue des filaments d'actine. La phase d'engorgement apparaît lorsque les microtubules envahissent les protrusions en apportant les vésicules qui contiennent les matériaux nécessaires à la croissance neuritique, notamment les lipides amphiphiles permettant le renouvellement des membranes après fusion des vésicules, les mitochondries pour l'apport énergétique, ou les réticulums endoplasmiques, impliqués dans le repliement des protéines. Durant la phase de consolidation, la majorité des réseaux d'actine situés au niveau de la zone concernée par la phase d'engorgement sont déplacés vers le front de migration. En fait, ils dépolymérisent (mais polymérisent en amont) pour laisser la place au recouvrement membranaire des microtubules néoformés. Ainsi, la neurite maintient sa forme cylindrique à la base du cône de croissance. Ce processus en trois phases est également reproduit lors de la formation de branches collatérales le long de la neurite « principale », comme illustré à la figure 6.10.

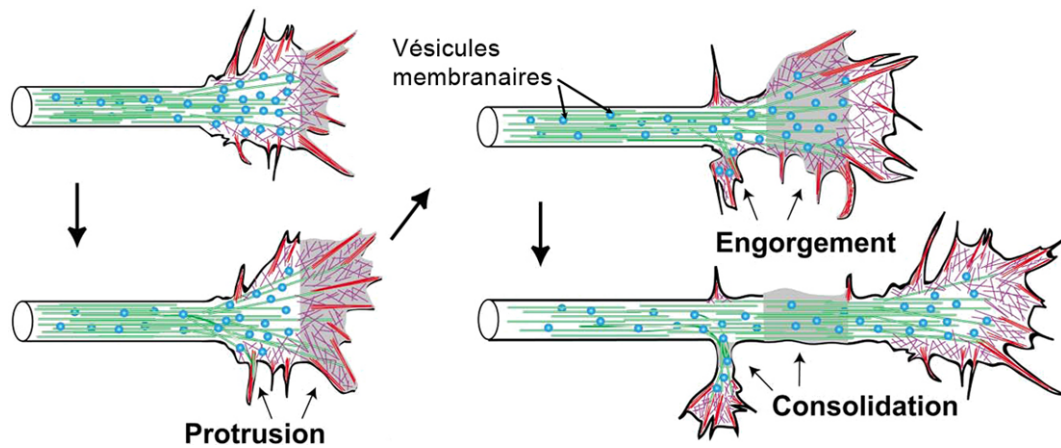


FIGURE 6.10: Mécanisme d'avancée des neurites *via* le cône de croissance selon trois phases distinctes, adapté de la Réf. [146].

Le processus d'avancée du cône ne peut s'effectuer sans un couplage du cytosquelette d'actine avec le substrat, impliquant la génération de tensions mécaniques pour le premier comme pour le second [181, 185]. Ce couplage s'effectue lui-même à travers la création sans cesse renouvelée de points focaux d'adhésion en amont du cône de croissance, sur lesquels le cytosquelette s'appuie pour générer un phénomène de traction entraînant la neurite vers l'avant [18]. L'apparition et la disparition des points focaux est modulée par nombre de protéines au rang desquelles la vinculine, la paxiline ou encore les intégrines tiennent une place importante [22]. Notamment, la vinculine joue un rôle clé consistant à faire le lien entre le cytosquelette d'actine et la partie cytosolique des protéines transmembranaires comme les intégrines [21]. Les points focaux se forment généralement en amont des protrusions filopodiques ou lamellipodiques, et de façon répétée et ponctuelle. Parmi ces points focaux, certains se voient sélectionnés, stabilisés, et renforcent considérablement leur adhésion au substrat. On assiste alors au recrutement de nombreuses protéines dont celles citées ci-dessus, ainsi qu'à l'activation et à la désactivation successives d'autres protéines chargées de réguler leur activité, telles que les petites protéines-G Rac1 et RhoA [22]. C'est seulement une fois le point focal stabilisé, que les liens entre la machinerie mêlant actine et myosines, récepteurs cellulaires et substrat vont générer une force suffisante pour tirer le cône de croissance vers l'avant.

Ce modèle est démontré comme étant particulièrement pertinent au regard des substrats non-flexibles ou rigides [18, 22], ce qui est en l'occurrence le cas pour tous les substrats considérés dans notre étude. En effet, les substrats élaborés et analysés au cours des chapitres précédents sont à base de verre, et font par conséquent état de rigidités de l'ordre du GPa. Cet ordre de grandeur est sans commune mesure avec des substrats considérés comme « mous », composés de diverses matrices extracellulaires, de gels de polyacrylamide ou de polydiméthylsiloxane (PDMS), et dont l'élasticité est plutôt de l'ordre du kPa [31]. Sans génération de force suffisante, les contractions de l'actomyosine auront plutôt tendance à générer ce qu'il est convenu d'appeler des flux rétrogrades d'actine-F. Ce processus est généré par les moteurs moléculaires que sont les myosines II et V (figure 6.8) et consiste à ramener activement les filaments d'actine vers la base du cône de croissance, autrement dit en aval de la région-P, vers la région-C. Les filaments sont alors dépolymérisés et les monomères libérés à nouveau disponibles (ou pas) pour de futures phases de protrusion, une fois leur retour effectué dans la région-P. Le flux rétrograde est distinct du processus de « tapis roulant » décrit pour l'actine, en ce sens que tout le filament est en mouvement vers l'arrière, il ne s'agit donc pas seulement de polymérisation à l'extrémité (+) et de dépolymérisation à l'extrémité (-), comme on a pu le voir auparavant. Une fois l'ensemble du cône emmené vers l'avant (phase d'engorgement), le point focal d'adhésion est « avalé » par l'afflux de matériel et désassemblé dans le même temps [22]. Un autre point focal peut alors être sélectionné pendant une nouvelle phase de protrusion se déroulant en amont, tandis que la zone située en aval est consolidée. L'avancée d'une neurite semble donc s'apparenter à un procédé régulier rythmé par des « bonds » successifs.

Chapitre 7

Cellules PC12 : manipulation, imagerie, et méthodes d'analyses quantitatives

Ce chapitre vise en premier lieu à décrire tous les différents protocoles employés pour cultiver les cellules PC12, et la façon dont ces protocoles ont souvent dû être adaptés suivant les particularités des conditions expérimentales auxquelles nous avons eu à faire face. En second lieu, nous présenterons les différentes techniques d'imagerie cellulaire employées. L'investigation des mécanismes cellulaires impliqués dans les expériences qui vont suivre ([chapitres 8, 9, et 10](#)) privilégie l'analyse de cellules fixées au substrat, soit pour des analyses AFM, soit pour des analyses d'immunomarquage en fluorescence. Quelques expériences feront toutefois état de cellules vivantes, c'est dans ce cas l'interférométrie qui sera utilisée. En dehors de ces manipulations, l'imagerie des cellules fera le plus souvent appel à une simple observation par microscopie optique à contraste de phase. Enfin, nous exposerons les méthodes grâce auxquelles nous avons pu estimer quantitativement le degré de stimulation de croissance neuritique, selon le substrat d'adhésion.

7.1 Culture cellulaire

Hors spécification, les produits biologiques cités ci-dessous proviennent d'Invitrogen (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France).

7.1.1 Entretien des cellules et culture de routine

Les cellules PC12 proviennent de l'ATTC (« American Type Culture Collection », CRL 1721) et sont maintenues après décongélation dans un milieu DMEM (« Dubelcco's Modified Eagle Medium ») contenant (en proportions volumiques) 5% de sérum de cheval, 5% de sérum de veau foetal (HyClone), 1% d'acides aminés non-essentiels, et 1% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine). Le substrat utilisé pour les maintenir est une boîte de culture T25 (Falcon ; le chiffre 25 signifiant 25 cm² de surface accessible aux cellules), dotée d'un fond plat de polystyrène chargé négativement, que nous recouvrons de poly-L-lysine afin de renforcer l'adhésion des cellules au substrat (cf. [chapitre 5](#)). Les boîtes contenant les cellules sont disposées dans un incubateur à 37°C, dont l'humidité relative est maximale (100%), et le taux de CO₂ maintenu à 5% par un système d'autorégulation.

Le taux de CO₂ permet de tamponner le pH des milieux de culture aux alentours de 7,4. Malgré cela, le milieu est susceptible de devenir acide dès que le nombre de cellules devient trop important, et/ou dès lors que les cellules ont consommé tous les nutriments contenus dans le milieu de culture. Dans ce cas, le milieu initialement de couleur rouge vire au jaune. Ce type de conditions est très toxique pour les cellules, qui peuvent ainsi subir des dommages irréparables,

et c’est pourquoi nous croyons bon de préciser ici que toutes les manipulations effectuées l’ont été dans des conditions « propres ». Dans les cas où pour une raison x ou y , le milieu est apparu jaune, les cellules ont été jetées immédiatement et de nouvelles cellules décongelées afin de procéder aux expériences.

Les cellules PC12 ont une durée de cycle cellulaire relativement courte [92], ce qui signifie qu’elles prolifèrent rapidement, et c’est pourquoi les cellules ont été repiquées 1 à 2 fois par semaine, en divisant à chaque fois le nombre total de cellules contenues dans une boîte par un nombre compris entre 3 et 7. Une boîte T25 dans laquelle les cellules sont à confluence (i.e., couvrent entièrement la surface), contient un nombre de cellules qui est de l’ordre de 10 millions. Le repiquage consiste à couper les liaisons cellule-substrat par l’action enzymatique de la trypsine, *a priori* non nocive pour les cellules si tant est qu’elle reste en contact avec elles moins de 10 min à l’état concentré, ou qu’elle soit diluée dans du milieu de culture. Pour plus de sûreté, nous avons d’une part limité l’exposition des cellules à la trypsine à l’état concentré à une durée de 7 min, suffisante pour non seulement décrocher les cellules du substrat, mais aussi et surtout pour décrocher les cellules entre elles. D’autre part, nous avons aussi retiré l’essentiel de la trypsine avant de resuspendre les cellules dans du milieu de culture. Les cellules PC12 ayant une forte propension à favoriser les contacts intercellulaires par rapport aux contacts cellule-substrat (quel que soit le substrat par ailleurs) [92], la phase de resuspension des cellules s’est systématiquement accompagnée de nombreux pipetages, favorisant mécaniquement l’obtention de cellules isolées.

Le processus de repiquage ne doit impérativement pas attendre que les cellules atteignent la confluence totale. Outre l’augmentation de consommation de nutriments pouvant mener à l’acidification du milieu évoquée plus haut, les cellules n’ont plus suffisamment d’espace pour se diviser librement, sont donc contraintes et en état de stress, ce qui conduit inéluctablement à leur détérioration. Le moment idéal pour le repiquage est donc choisi lorsqu’on estime l’état de confluence proche de 90%. L’illustration des conséquences d’un repiquage effectué correctement est montrée à la figure 7.1. Le repiquage sépare des périodes de culture cellulaire appelées « passages ». Les cellules sont ici photographiées moins de 24 h après le repiquage effectué entre le passage N°2 et le passage N°3 après décongélation. Globalement, les cellules apparaissent dans un état très convenable étant donné le peu de temps séparant la photographie du processus de repiquage. De plus, nous observons que les cellules sont, hormis quelques petits amas repérables sur la photographie, plutôt bien espacées, et que peu d’entre elles sont encore en suspension au voisinage de la surface. Enfin, nombre de cellules développent de petites protrusions, signe que les cellules ont, dans leur majorité, très bien adhéré à la surface, suffisamment en tout cas pour non seulement survivre, mais aussi pour se développer. Abordons à présent les différents aspects de la culture des cellules PC12 dans des conditions expérimentales.

7.1.2 Culture sur lamelles de verre modifiées

Procédure d’ensemencement des lamelles par les cellules

Dans les conditions expérimentales, les cellules sont utilisées après avoir subi au moins trois passages suite à leur décongélation. Les cellules ont été stockées au passage N°4 (après achat des cellules), les manipulations sont donc réalisées avec des cellules ayant subi au minimum sept passages. Les cellules sont utilisées jusqu’au passage N°17 (soit 13 passages après décongélation), et pas au-delà, afin de se prémunir contre les éventuelles variations génétiques que les cellules auraient pu subir au cours des cycles successifs. Une nouvelle ampoule contenant des cellules « fraîches » est alors décongelée en vue de procéder à de nouvelles expériences.

Avant toute manipulation de culture cellulaire, les surfaces modifiées sont stérilisées par immersion dans une solution composée de 70% de méthanol et 30% d’eau ultrapure. L’eau contenue dans la solution permet de rendre poreuses les membranes des bactéries éventuellement adsorbées. Ainsi le méthanol peut pénétrer dans leur cytoplasme et les tuer. Eu égard aux types d’expériences considérées, cette méthode est plus appropriée que l’exposition des surfaces à des rayonnements

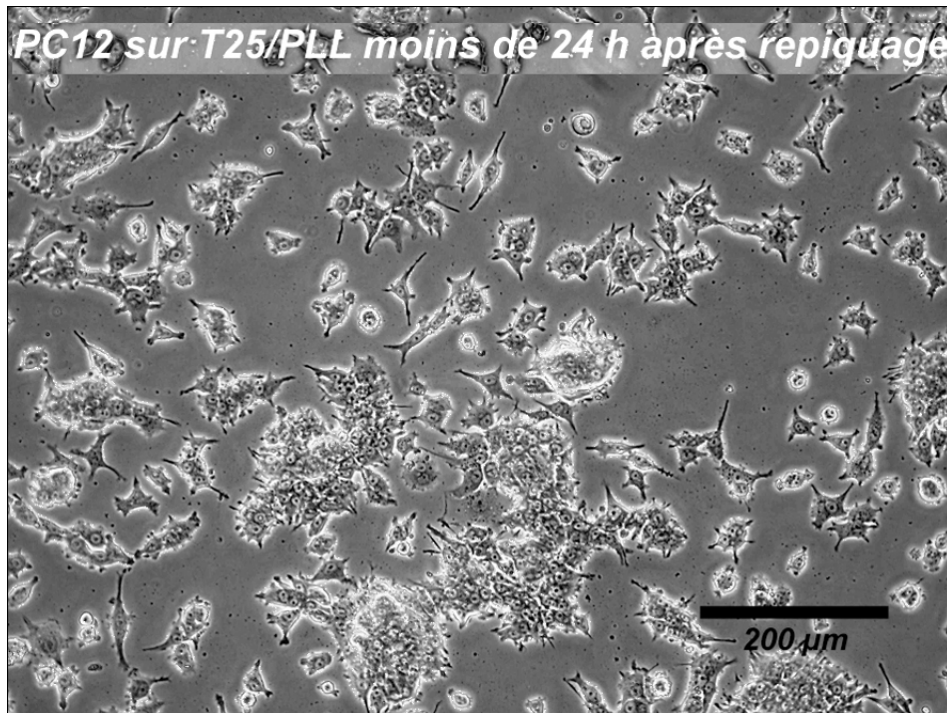


FIGURE 7.1: Illustration de l'état des cellules PC12 moins de 24 h après un repiquage sur PS/PLL. L'observation est effectuée par microscopie optique à contraste de phase (objectif $\times 10$).

UV. En effet, les surfaces auto-assemblées peuvent réagir photochimiquement et se dégrader sous l'action de rayons UV, combinés à la présence de dioxygène [186]. Les rayons UV provoquent la transformation du dioxygène (O_2) de l'air en ozone (O_3), qui va en retour se dissocier pour former des radicaux d'oxygène ($O \cdot$) très réactifs. Leur action résulte dans la scission des chaînes d'alkylsiloxanes [187]. Après 15 min d'immersion, les lamelles sont laissées à l'air libre sous la hotte à flux laminaire jusqu'à ce qu'elles aient complètement séché. Une fois sèches, elles sont alors disposées dans des boîtes de pétri de 35 mm de diamètre (Falcon 350001).

Les cellules sont ensuite dissociées de la surface d'une boîte T25 et resuspendues dans du milieu de culture (identique à celui décrit à la section précédente), dont la concentration cellulaire est ensuite évaluée par comptage manuel à l'aide d'une cellule de Malassez. Puis on opère des dilutions successives afin d'obtenir la concentration souhaitée de cellules sur les surfaces modifiées. Dans toutes nos expériences, cette concentration est comprise entre $5 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-2}$ et 10^4 cm^{-2} , ce qui correspond à un total de cellules ensemencées de l'ordre de $5 \cdot 10^4$.

Suivant les surfaces et le type de manipulation envisagée, nous avons eu recours à deux procédures distinctes pour l'ensemencement des cellules (figure 7.2). La première consiste à utiliser 2 ml de milieu de culture, volume suffisant pour couvrir l'intégralité des lamelles (de 30 mm de diamètre). Cette méthode est celle employée pour toutes les expériences décrites au chapitre 8. La deuxième tient compte de la forte hydrophobicité de certains substrats (notamment certains de ceux dotés d'une terminaison CH_3), et qui ont donc tendance à repousser à la fois le milieu et les cellules vers le bord des lamelles. Pour contrevenir à ce type de problème, nous avons piégé les cellules dans un faible volume de milieu, réduit à 335 μl lors du dépôt de cellules. Le temps en culture lors des manipulations effectuées dans ce cadre n'a pas excédé 48 h. Par conséquent, aucun changement de milieu n'a été effectué pour ces expériences, qui sont celles décrites au chapitre 9. Pratiquement, et afin de garantir une dispersion homogène des cellules sur la surface, cinq gouttes de volume égal ($\sim 67 \mu\text{l}$) ont été déposées sur les lamelles. Il va de soi que ces gouttes contiennent des cellules dont la concentration est homogénéisée préalablement au dépôt, en effectuant des allers et retours successifs à l'aide d'une pipette ou micropipette. La surface couverte par le milieu sur la lamelle est dans ce cas voisine d'environ 80% de cette dernière.

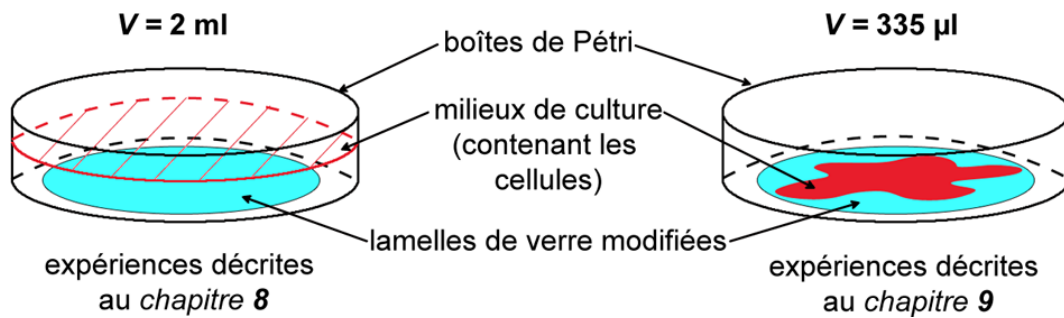


FIGURE 7.2: Schémas illustrant les différents protocoles d'ensemencement des substrats. Ces protocoles correspondent aux diverses expériences dont les résultats seront exposés aux chapitres 8 et 9. Les lamelles de verre et les boîtes de pétri ont un diamètre respectif de 30 et 35 mm.

Pour les manipulations RICM, le protocole de disposition des lamelles nécessite un léger ajustement, qui consiste à utiliser une boîte de pétri plus grande ($\varnothing = 50$ mm). Le fond de la boîte est creusé d'un trou de 28 mm de diamètre, de façon à pouvoir fixer, par-dessus le plastique, une lamelle ($\varnothing = 30$ mm) devenant ainsi accessible à l'objectif du microscope (figure 7.3). Pour fixer la lamelle, on utilise un gel de silicone (de marque « Sader ») relativement inerte et garantissant l'étanchéité du dispositif.

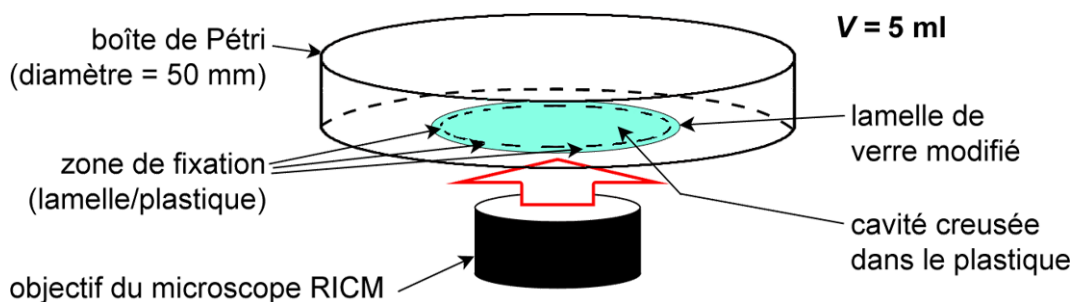


FIGURE 7.3: Illustration du dispositif utilisé pour les observations en RICM.

L'analyse en milieu liquide des surfaces et des cellules par AFM fait appel au même type de procédé, l'AFM nécessitant une surface stable. Dans ce cas, la culture est réalisée de façon classique, et immédiatement avant l'analyse, trois « pointes » de gel de silicone sont déposées à l'aide d'une pipette pasteur aux extrémités d'un triangle équilatéral circonscrit aux dimensions de la lamelle, sur le fond d'une boîte de pétri de 50 mm de diamètre (non modifiée cette fois-ci). La lamelle destinée à l'analyse est ensuite prélevée à l'aide d'une pince au fond de sa boîte originelle, puis délicatement déposée par-dessus les trois pointes de silicone. Une légère pression est appliquée sur la lamelle au niveau des pointes, puis du milieu de culture est ajouté.

Temps en culture, traitement au NGF et conditions de sérum

Rappelons que le but des manipulations consiste à étudier l'impact des propriétés de surface des lamelles sur le comportement initial des cellules PC12 en matière d'adhésion et de différenciation, c'est-à-dire dans les heures ou les jours suivant le dépôt des cellules. Par conséquent, la durée des expériences est réduite au minimum possible. Il a cependant fallu adapter ce temps passé en culture suivant certaines conditions imposées par la nécessité d'effectuer des contrôles appropriés (tel le traitement des cellules par l'ajout de NGF au milieu) et de comparer les résultats avec les données fournies par la littérature [92, 147, 188]. Par ailleurs, le traitement au NGF, utilisé comme contrôle positif pour la différenciation des cellules, impose certaines conditions vis-à-vis de la quantité de sérum contenue dans les milieux, généralement différentes des conditions de culture

où le NGF est absent des milieux. En effet, le traitement au NGF est beaucoup plus efficace si le milieu de culture est dépourvu de sérum [188, 189]. Cependant, les cellules PC12 ne peuvent survivre à un retrait complet de sérum du milieu de culture [188]. Il a donc fallu trouver un bon compromis, permettant aux cellules non seulement de survivre, mais aussi de réagir de la façon souhaitée aux divers stimuli imposés par les conditions de culture (propriétés des surfaces, et présence ou absence de facteur de croissance).

En outre, les cellules PC12 ne peuvent adhérer à n'importe quel substrat en présence d'un milieu contenant du NGF. Cela impose donc des changements de milieux, permettant en premier lieu l'ajout du NGF, et en second lieu, le renouvellement régulier du NGF, qui est consommé par les cellules. Ces changements de milieu peuvent induire un stress relativement élevé, de nature mécanique et/ou chimique, qui se traduit entre autres par un décollement des cellules les plus faiblement adhérentes au substrat. Le stress mécanique est d'autant plus ressenti par les cellules quand ces dernières adhèrent faiblement aux surfaces modifiées, ce qui est le cas pour nos surfaces, comme nous allons le voir au cours du [chapitre 8](#). Le stress chimique est supposé faire suite à la perte d'une certaine quantité de matrice extracellulaire secrétée par les cellules, contenant des protéines nécessaires à leur développement, et partiellement retirées par le processus de changement de milieu. Chaque changement de milieu doit donc être effectué dans les conditions les plus douces possibles, à savoir le préchauffage à 37° du nouveau milieu, et une très lente addition de ce nouveau milieu sur la surface.

Les conditions retenues pour les expériences sont les suivantes : pour celles relatées au [chapitre 9](#), où le NGF n'est pas utilisé et où les expériences sont de courte durée, le milieu n'est pas renouvelé, par conséquent le milieu utilisé pour les expériences est identique à celui exploité pour la culture de routine. Pour les expériences décrites au [chapitre 8](#), le dépôt de cellules est effectué avec du milieu standard. Au bout de 24 h de culture, après l'adhésion des cellules aux substrats, un premier changement de milieu est effectué. Ce milieu, dépourvu de sérum de cheval, est additionné d'une proportion inchangée de sérum de veau foetal maintenue à 5%, que le milieu contienne du NGF ou pas. Par la suite, le milieu est renouvelé tous les deux ou trois jours.

La concentration de NGF (NGF-7S, extrait de glandes sous-maxillaires de souris, Sigma-Aldrich) utilisée pour les expériences de contrôle est de 100 ng ml⁻¹. D'après les informations fournies par le fournisseur, le NGF-7S est actif pour une gamme de concentrations comprises entre 0,1 et 200 ng ml⁻¹. Nous avons donc procédé à des tests, et déterminé la concentration la plus appropriée à nos expériences, permettant d'obtenir une différenciation plutôt rapide des cellules sans pour autant stimuler en excès leur prolifération, effet parallèle constaté du NGF [190]. L'impact du NGF a été évalué pour des cultures de PC12 sur eda' (cf. [tableau 2.2](#) pour le processus de formation, et [section 5.2](#) pour les analyses) menées en parallèles et pour lesquelles le NGF fut ajouté respectivement au bout de 4, 6 et 8 jours ([figure 7.4](#)). Pour chacune des lamelles, le nombre de cellules isolées initiant des neurites a été compté (selon le protocole décrit plus loin), et ce nombre rapporté au nombre total de cellules isolées. Même si les cellules initient d'elles-mêmes un certain nombre de neurites à partir du 4^{ème} jour de culture, on observe clairement une stimulation de la neuritogénèse deux jours après l'ajout de NGF aux milieux. Les diverses conditions de culture employées sont récapitulées en conclusion du chapitre.

Déstabilisation du cytosquelette d'actine par la cytochalasine-B

La propension des cônes de croissance à générer des filopodes et des lamellipodes a été évaluée pour une manipulation au cours de laquelle nous avons testé l'effet de la cytochalasine-B (Sigma-Aldrich), drogue connue pour déstabiliser la polymérisation des filaments d'actine [159, 191, 192]. Trois concentrations différentes ont été utilisées : 0,5 µM, 5 µM, et 50 µM. La cytochalasine-B a été solubilisée dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) préalablement à sa dilution dans les milieux de culture. Dans tous les cas, la concentration finale de DMSO n'excédait pas 0,1% en volume. Deux types de contrôle négatif ont été effectués parallèlement aux expériences, l'un consistant au

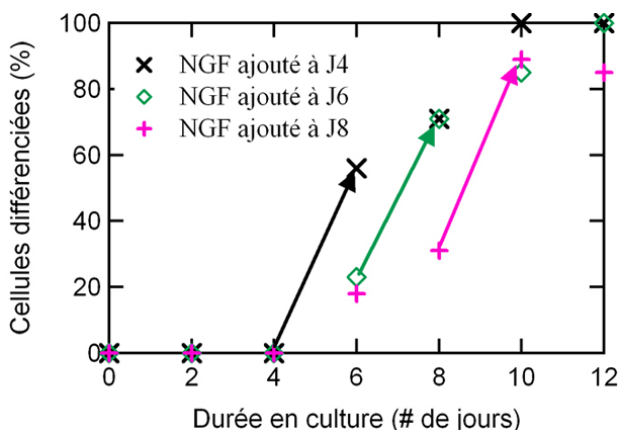
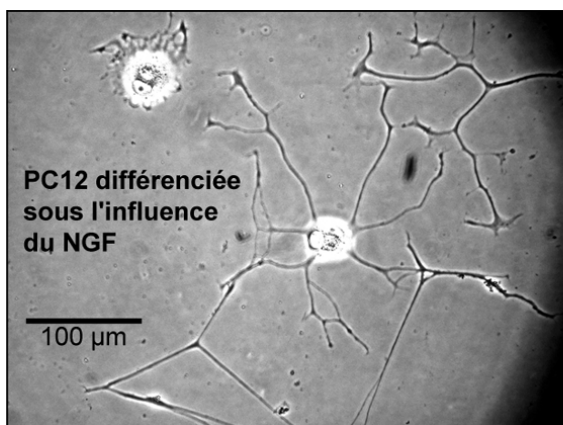


FIGURE 7.4: Évaluation de l'impact du NGF sur la propension des cellules PC12 à initier des neurites. la neuritogénèse est fortement stimulée pendant les deux jours qui suivent l'addition de NGF au milieu de culture. Les cellules commencent à se différencier sans NGF au bout du 4^{ème} jour car elles évoluent sur un substrat qui le permet (eda' ; cf. chapitre 8).

traitement des cellules par du DMSO à 0,1%, et l'autre sans traitement. La cytochalasine a été ajoutée aux milieux de culture entre 7 et 8 h après l'ensemencement des lamelles. Dans le but de ne pas trop perturber les cellules, les solutions ont été préparées de façon à ce que le volume de milieu ajouté contenant la cytochalasine soit égal à 10% du volume final de solution. Ce protocole a permis d'éviter le changement total de milieu, généralement observé comme ayant un effet très néfaste sur l'adhésion des cellules. Aucun changement de milieu n'a ensuite été effectué.

7.2 Imagerie des cellules

7.2.1 Contraste de phase et interférométrie

Les analyses de routine portant sur l'évolution des cellules ont été effectuées à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase (MCP, Nikon Eclipse TS100) équipé d'un appareil photo, et d'objectifs $\times 10$ et $\times 20$. Deux exemples d'images obtenues grâce au MCP sont fournis aux figures 7.1 et 7.4. En outre, l'utilisation d'un microscope utilisant le principe de contraste interférentiel (RICM, pour « Reflexion Interference Contrast Microscopy ») a permis l'imagerie des zones interfaciales entre les cellules PC12 et certains substrats fabriqués au cours de cette étude. La RICM [193] est la technique la plus appropriée quand il s'agit de visualiser les surfaces d'adhésion des cellules [194].

L'image est formée par interférence entre la lumière réfléchiée par la surface de verre fonctionnalisée (I_1) et la lumière réfléchiée par la surface des cellules adhérentes au substrat (I_2) (figure 7.5). En admettant que l'indice de réfraction n_2 de la membrane a une valeur supérieure à celle de l'indice du liquide environnant n_1 , la lumière réfléchiée par l'interface liquide-membrane subit un saut de phase $\delta = \pi$ [194]. Par conséquent, la surface en contact très rapproché avec le substrat apparaît en foncé, tandis que les zones plus éloignées apparaissent plus claires. Au-delà de la ligne de contact circonscrivant la zone d'adhésion proche, on observe parfois la formation de franges d'interférences (figure 7.6) dont l'apparition et l'allure dépendent de la fonction $h(x)$, représentant la hauteur à laquelle est située la membrane par rapport au substrat, en fonction de la distance à la ligne de contact de sa projection sur le substrat.

La RICM est source de nombreuses applications. Par exemple, les franges d'interférence permettent de mesurer avec précision l'angle de contact formé par un liquide avec une surface solide. Ce procédé peut se révéler beaucoup plus fiable que la technique exposée au chapitre 3, surtout en ce qui concerne les petits angles ($\theta < 10^\circ$). Citons également la possibilité théorique de déterminer la tension membranaire, l'énergie d'adhésion et le module de courbure d'une vésicule dont on connaît la pression osmotique [195], tout cela après une reconstruction 3D effectuée par RICM.

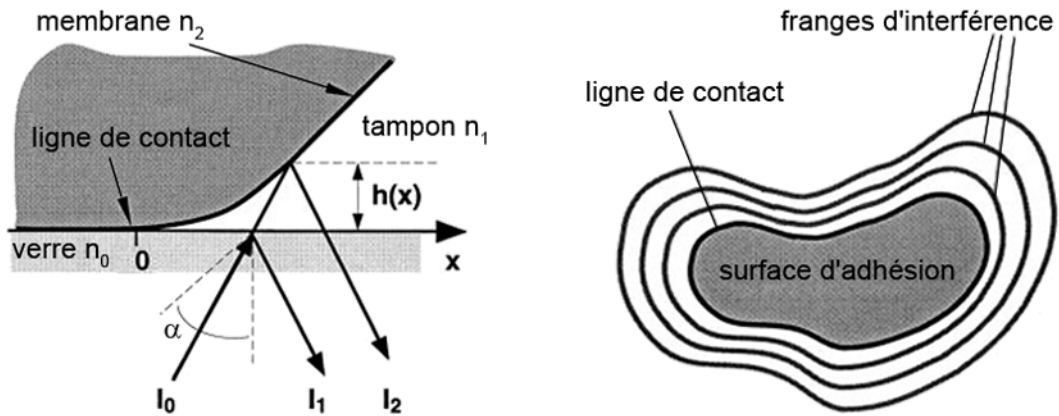


FIGURE 7.5: Illustration schématique du principe de la RICM, adaptée de la Réf. [194].

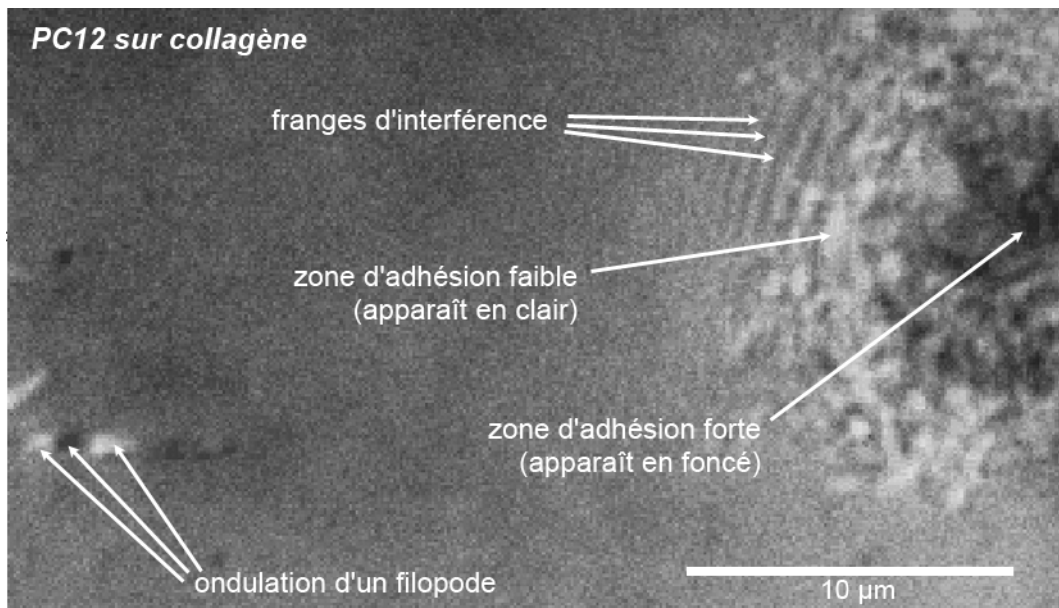


FIGURE 7.6: Image RICM d'une cellule PC12 dans les 30 min suivant l'adhésion. Les filopodes apparaissant à la gauche de l'image proviennent d'une autre cellule, dont le soma n'est pas visible ici.

Le microscope utilisé dans nos expériences est un Olympus IX 71 équipé d'un objectif apochromatique de grandissement $\times 100$, d'un filtre interférentiel agissant à une longueur d'onde $\lambda = 546$ nm, et d'une caméra numérique CCD Roper HQ. L'intervalle en surface, entre la ligne de contact et la première frange d'interférence, est d'environ $1 \mu\text{m}$. Cette valeur nous permet d'estimer la hauteur séparant la surface des zones « claires » situées le plus souvent dans cet intervalle, comme étant inférieure à environ 150 nm [194]. L'alternance de zones claires et sombres pour les filopodes imagés (figure 7.6) est souvent remarquée quel que soit le substrat d'adhésion. Il s'agit ici de collagène de type I en très faible concentration ($50 \mu\text{g/ml}$), dont nous avons couvert une lamelle de verre, et dont nous analyserons la surface plus en détails au chapitre 10.

Dans notre étude, l'imagerie RICM a été utilisée pour caractériser les différences en matière d'intensité d'adhésion des cellules sur les surfaces de verres aminosilanisés et sur celles recouvertes de biopolymères. Nous évaluerons ainsi l'évolution de cellules PC12 en culture sur les substrats suivants : eda', htms_{M2}, verre/PLL et verre/PLO (cf. chapitre 8, page 143). Signalons enfin que le matériel à disposition était équipé d'un mécanisme permettant de contrôler la température, mais pas le taux de CO₂, qui permet au milieu de culture de garder un taux d'acidité constant. Les cellules ont donc été imagées rapidement, c'est-à-dire moins de 30 min après avoir été sorties de l'incubateur.

7.2.2 Microscopie à force atomique (AFM)

Les détails concernant le mode utilisé (tapping uniquement pour l’analyse des cellules), le type de pointe, et les constantes de raideurs des microleviers utilisés sont précisés à la fin du [chapitre 3](#).

Expériences en milieu liquide sur des cellules vivantes

L’AFM permet d’imager des neurones vivants, et la mise en lumière de nombreuses microstructures invisibles par d’autres techniques [196]. Même si les cellules PC12 ont tendance à adhérer faiblement à leur substrat [92], plusieurs tentatives d’imager des cellules vivantes ont été effectuées. Nous en dévoilons une ([figure 7.7](#)), qui à l’image des autres, n’est pas franchement une réussite si l’on en juge d’après la résolution obtenue, relativement peu élevée. Le substrat utilisé est du collagène, produisant des fibres dont on peut s’attendre à ce qu’elles fournissent un support pour lequel l’adhésion est plus forte que celle des substrats de verre modifiés. Malgré cela, aucun axone constitué n’a pu être imagé, faute d’adhérer suffisamment, la pointe décrochant systématiquement toutes les neurites sur lesquelles l’opération fut tentée. En revanche, l’extrémité des neurites, donc les cônes de croissance, semblaient mieux adhérer, puisqu’il fut possible d’en imagier quelques-uns. L’extrémité de la neurite considérée est imagée à deux reprises à 42 min d’intervalle. Les images de gauche représentent les valeurs de hauteur (en μm) et celles de droite l’intensité de déflexion du levier, mesurée en mV.

Sur la première image au temps t_1 , le cône de croissance semble exposer un lamellipode, marqué par une flèche blanche sur la [figure 7.7](#). L’analyse de section ([figure 7.8](#)) révèle une hauteur de 85 nm pour cette structure, contre 646 nm pour ce qui semble être la base du cône de croissance, ou tout au moins une zone neuritique possédant suffisamment de microtubules pour apparaître aussi « épaisse ». Cependant, aucun filopode n’apparaît sur l’image, dont l’apparence relativement floue ne permet de conclure quant à leur absence ou leur éventuelle présence. En outre, la seconde image, réalisée au même endroit 42 min après la première, montre que la structure de la neurite s’est entre-temps passablement dégradée, bien qu’elle ne se soit pas rétractée. En particulier, la zone neuritique située au-dessus de la zone délimitée par une ligne pointillée ([figure 7.7](#)) semble avoir été « raclée » par la pointe de l’AFM, qui scanne la surface dans le sens allant de la gauche vers la droite sur l’image. Ainsi, la ligne pointillée semble indiquer la démarcation existant entre la région du cône de croissance dont la structure est dominée par la présence de microtubules (en-dessous) et la zone majoritairement composée par des réseaux d’actine polymérisée (au-dessus).

Expériences menées à l’air libre sur des cellules fixées au substrat

Après un bref rinçage au PBS, les cellules ont été fixées par addition d’une solution de glutaraldéhyde à 2% (v/v) dans du PBS, à température ambiante. Au bout de 15 min, les échantillons sont rincés 2 à 3 fois dans du PBS, puis à l’eau ultrapure afin de solubiliser et retirer les cristaux de sels adsorbés sur le substrat et les cellules. Les échantillons sont ensuite séchés sous un flux d’azote préalablement à l’analyse AFM. Précisons que la plateforme sur laquelle est positionnée l’AFM est aussi dotée d’un microscope optique, permettant d’ajuster la pointe de l’AFM au-dessus des cellules. Les analyses de section comme celles présentées à la [figure 6.7](#) sont réalisées à l’aide du logiciel d’exploitation de l’AFM *Nanoscope* (cf. [chapitre 3](#)).

Une observation rapide permet de constater que la résolution des images obtenues est considérablement augmentée suite à l’opération de fixation des cellules ([figure 7.9](#)). En toute apparence ce type de fixation préserve le cytosquelette ainsi que les corps des neurites, conformément à ce qui a pu être observé par ailleurs [177]. La première image de la [figure 7.9](#) expose un réseau de neurites plus ou moins enchevêtrées ainsi qu’un lamellipode couvrant une surface relativement élevée ($S > 50 \mu\text{m}^2$). Ce lamellipode, ou plutôt cette « zone lamellipodique » semble d’ailleurs difficilement attribuable à l’une ou l’autre extrémité des neurites présentes à l’image. Au contraire, le lamellipode apparaît comme un pont reliant les parties latérales de deux des neurites.

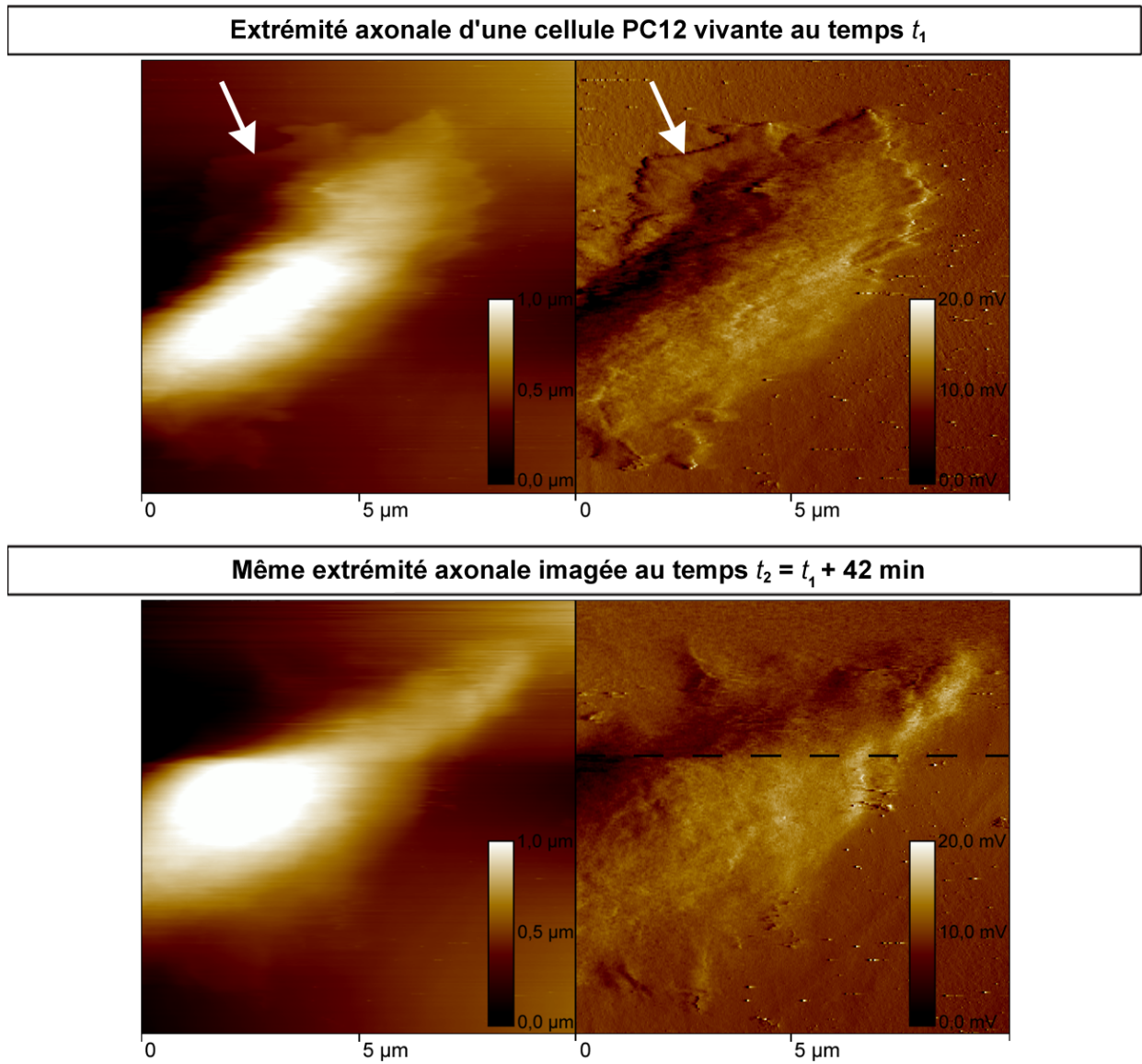


FIGURE 7.7: Dynamique de rétraction d'un axone par imagerie AFM en milieu liquide. La flèche indique un lamellipode non observée sur l'image suivante. Les tirets délimitent les deux zones suivantes : celle située en-dessous, pour laquelle la structure de la neurite ne semble pas modifiée, et celle du dessus, qui semble avoir subi l'effet du passage de la pointe de l'AFM.

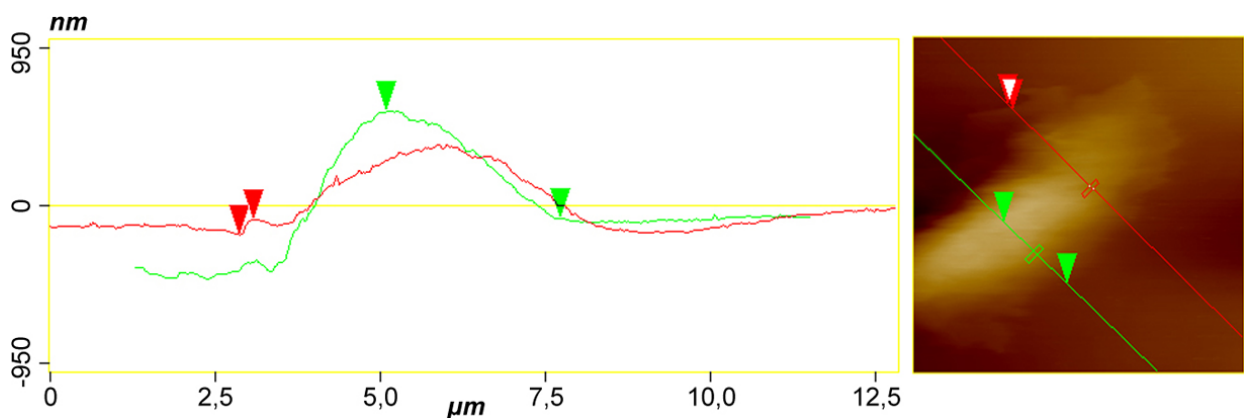


FIGURE 7.8: Analyses de section de la neurite imagée à la figure précédente. La section représentée par la ligne rouge signale la présence d'un lamellipode de 85 nm de hauteur.

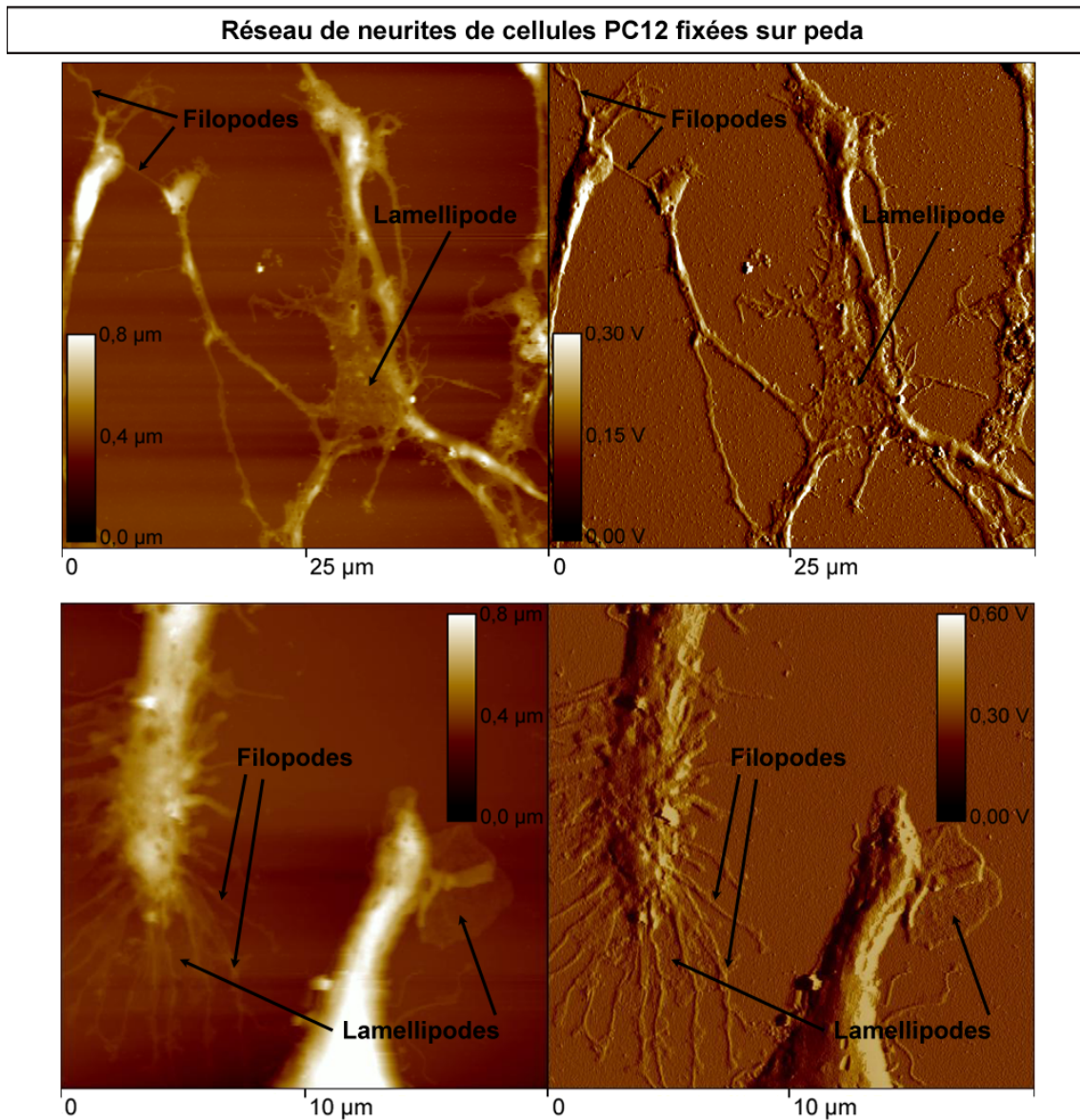


FIGURE 7.9: Images AFM obtenues pour des cellules PC12 fixées sur le substrat par l'action du glutaraldéhyde. On distingue de nombreux filopodes et lamellipodes. Notons que les lamellipodes ne se trouvent pas uniquement aux extrémités des neurites, comme observé sur l'image en haut à droite. Nous reviendrons sur ce point au [chapitre 10](#).

En haut à gauche, on observe un filopode, issu quant à lui d'un cône de croissance reconnaissable en tant que tel, qui s'est étendu suffisamment pour atteindre un cône de croissance voisin appartenant à une autre neurite. La seconde image, couvrant une surface inférieure à la précédente ($400 \mu\text{m}^2$ contre $2500 \mu\text{m}^2$), montre de façon très nette la forte densité de filopodes dont le cône de croissance est doté. Cette forte densité est peut-être due à la proximité d'une autre cellule, visible en bas à droite, qui pourrait « exciter » le cône en émettant, par exemple, des signaux neurotrophiques auquel ce dernier serait sensible. Notons que la partie visible de la cellule en bas à droite est très proche du noyau de la cellule, difficilement imageable à l'AFM du fait de sa hauteur. Généralement, l'observation de cellules entières est compliquée par deux facteurs : en premier lieu par la limitation du piézoélectrique, fixée à $\sim 6,6 \mu\text{m}$, en second lieu par la faible propension du soma des cellules PC12 à s'étaler, ces dernières possédant un faible volume cytoplasmique. À titre indicatif, nous montrons à la [figure 7.10](#) une image pour laquelle deux somas entiers ont pu être imagés simultanément. Les analyses de section réalisées au centre des cellules révèlent une hauteur d'environ $1,7 \mu\text{m}$. L'analyse des dimensions des filopodes fera l'objet d'une analyse approfondie au cours du [chapitre 9](#).

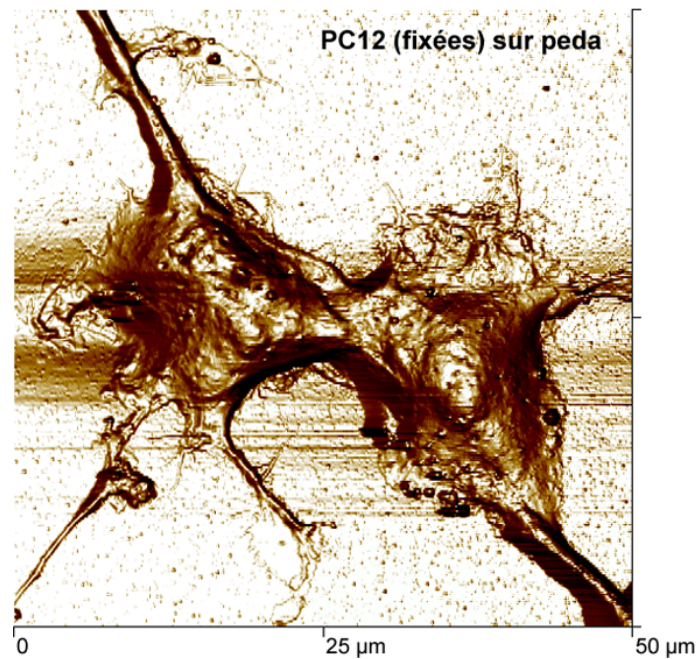


FIGURE 7.10: Somas de cellules PC12 imagés par AFM.

7.2.3 Immunofluorescence

Afin de caractériser l'état de différenciation des cellules sur les différents substrats utilisés, les protéines Tau et MAP1B, décrites au cours du [chapitre 6](#), ont été marquées grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre ces protéines. Nous avons également marqué les filaments d'actine et l'ADN. Les anticorps primaires monoclonaux anti-MAP1B et Tau5 (\leftrightarrow anti-Tau) proviennent respectivement de chez Sigma-Aldrich et Merck Chemicals (UK). Cy3TM (fluorochrome couplé à un anticorps secondaire) provient de chez Jackson ImmunoResearch (Cambridgeshire, UK), et la phalloïdine (\leftrightarrow anti-F-actine) couplée à l'Alexa-Fluor 488 de chez Molecular Probes. Après une période en culture dont la durée sera précisée ultérieurement (voir page [136](#)), les cellules ont été fixées sur les lamelles par une solution de formaldéhyde (3,7% (*v/v*)) dans du PBS) pendant 15 min. Les membranes cellulaires ont ensuite été perméabilisées pendant 20 min à l'aide d'une solution de Triton X-100 (détergent) à 0,1% (*v/v*) et de BSA (l'albumine sérique bovine, qui sert à saturer les sites de liaison non-spécifique, c'est-à-dire à masquer les sites de liaison de faible affinité) à 0,1% dans du PBS. Tous les rinçages, dilutions d'anticorps, et étapes de blocage ont été pratiqués en usant d'une solution de PBS contenant 0,1% BSA et 0,01% de Triton X-100.

Suite à la fixation et à la perméabilisation des cellules, Tau5 (dilué dans une proportion 1:100) ou anti-MAP1B (dilution : 1:800) ont été incubés pendant toute la nuit suivant la manipulation, à une température de 4°C. Vient ensuite l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome Cy3 (dilution : 1:400), incubé pendant 2 h à température ambiante. L'anticorps secondaire possède des sites de reconnaissance spécifiques aux anticorps primaires évoqués ci-dessus, et Cy3 est doté d'un certain nombre de fluorophores qui vont permettre d'augmenter l'intensité du signal observable, en multipliant celui-ci d'autant de fluorophores que Cy3 possède. Les noyaux des cellules, autrement dit l'ADN, sont marqués par incubation du DAPI (4-6-diamidino-2-phénylindole) à 0,5 g/ml pendant 15 min. Finalement, l'actine-F est marquée par incubation pendant 30 min de la phalloïdine couplée à l'Alexa Fluor 488, concentrée à 5 unités/ml. Enfin, les cellules sont abondamment rincées dans du PBS et les lamelles montées sur des lames à l'aide d'une solution visqueuse de Fluoromount GTM (Southern Biotech).

Un microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse E600) couplé à une caméra couleur à haute-résolution (Nikon DXM 1200) a servi à observer les cellules, en utilisant les objectifs $\times 10$, $\times 50$ et $\times 100$ dont est doté le microscope. Les images obtenues n'ont pas fait l'objet de traitement

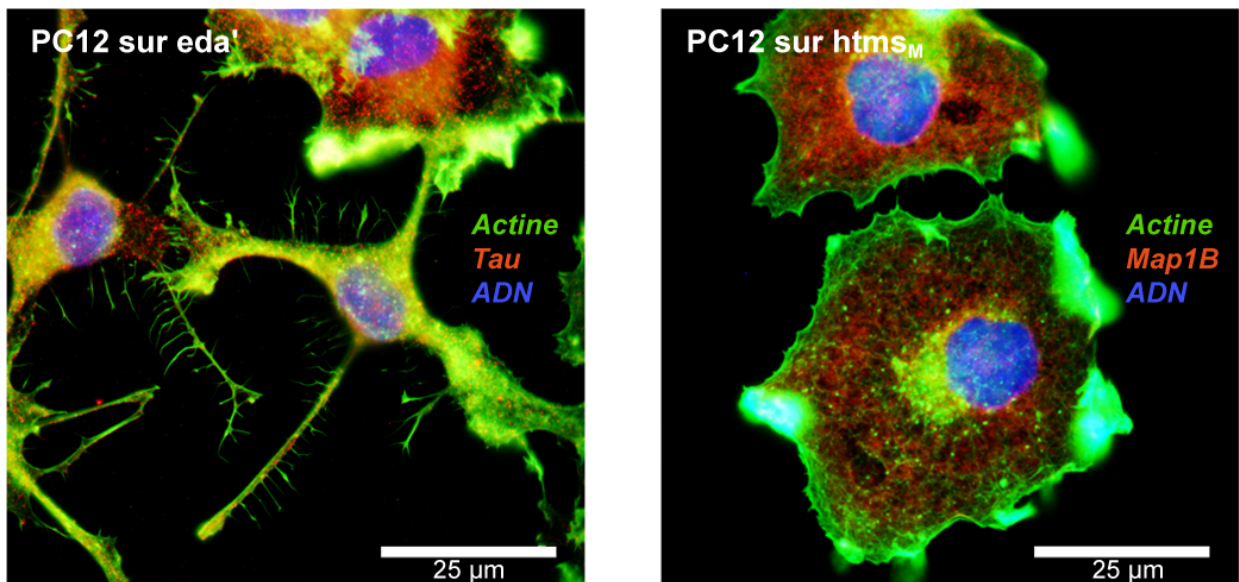


FIGURE 7.11: Exemples d’images de cellules PC12 marquées par des anticorps fluorescents.

particulier, hormis parfois un léger renforcement du contraste, toujours effectué de façon homogène d’une image à l’autre dès lors qu’il s’agissait de comparer des intensités de fluorescence. En guise d’exemple, des images de cellules immunomarquées sont montrées à la [figure 7.11](#) (voir aussi la [figure 6.2](#)). Sur la [figure 7.11](#), l’intensité de fluorescence représentant l’actine-F a été artificiellement augmentée sur l’image de gauche, de façon à faire ressortir clairement la présence des filopodes, disposés de façon relativement régulière sur toute la longueur des neurites observées. C’est pour cela que dans le reste des cellules, l’actine apparaît de manière floue et masque en partie le signal produit par le marquage de Tau. En revanche, sur l’image de droite, nous distinguons clairement les trois types de marquages effectués. Le cortex d’actine sous-membranaire apparaît même avec une résolution étonnante, et nous arrivons à distinguer des réseaux de filaments entrecroisés au sein du cortex. MAP1B est distribué de façon plus homogène dans toute la cellule, hormis dans les zones proches du cortex. Nous remarquons aussi la propension des cellules à s’étaler beaucoup plus sur l’image de droite, par rapport aux deux cellules situées à mi-hauteur de l’image de gauche. Gardons-nous cependant de tirer des conclusions hâtives à ce sujet, et réservons nos analyses pour les données que nous exposerons au cours des deux chapitres suivants (cf. pages 141–144 et pages 152–154).

7.3 Analyses quantitatives

7.3.1 Quantification de la croissance axonale

Nombre de neurites par unité de surface

La propension des cellules PC12 à générer des neurites a été évaluée pour un certain nombre de substrats, et de façon systématique pour tous les substrats CH_3/OH , dont les résultats seront exposés au [chapitre 9](#). Pour ce faire, nous avons employé la méthode suivante : au moins dix photographies des cellules en culture ont été prises pour chaque substrat d’adhésion, à l’aide de l’appareil photo intégré au MCP Nikon Eclipse TS100. Les images produites sont le fruit d’un agrandissement provoqué par l’utilisation de l’objectif $\times 20$, et chaque image correspond à $S = 0,182 \text{ mm}^2$ de surface pour chaque photographie. Nous avons donc un minimum de $S = 1,82 \text{ mm}^2$ de surface à disposition pour compter le nombre de neurites. Compte-tenu de la densité cellulaire d’ensemencement (cf. [tableau 7.1](#)), cela correspond à un nombre de cellules de l’ordre de ~ 900 pour chaque substrat, et sans doute plus si l’on considère les mitoses effectuées par les cellules entre l’ensemencement et le comptage effectif, un ou plusieurs jours après.

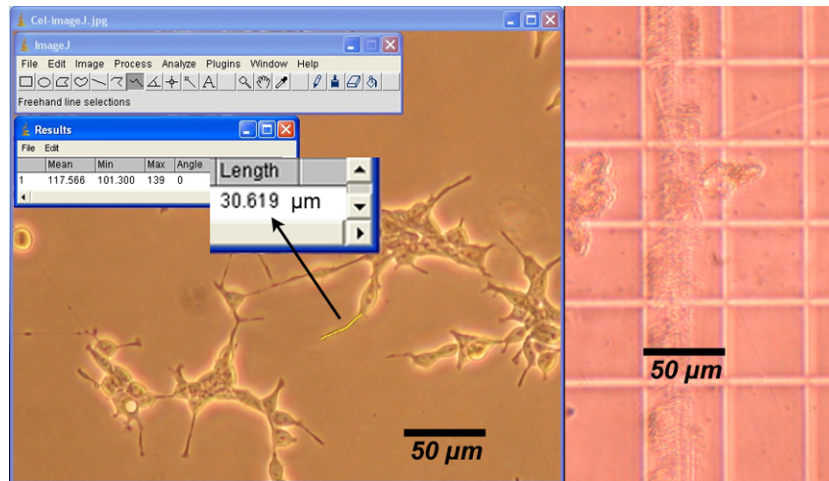


FIGURE 7.12: Illustration de la procédure de mesure et de comptage des neurites. Les neurites sont mesurées manuellement à l’aide du logiciel libre ImageJ. L’image de droite représente le quadrillage d’une cellule de Malassez, permettant le calibrage des mesures.

De façon à éviter de confondre les neurites comptabilisées avec d’éventuelles protrusions du soma ou encore des filopodes, dont la longueur dépasse rarement la dizaine de microns, seules les neurites ayant une longueur supérieure à 25 μm ont été comptées en tant que telles. Cette longueur de 25 μm correspond approximativement au diamètre du soma d’une cellule PC12 (figures 7.10 et 7.11) multiplié par un facteur $\frac{3}{2}$. Ce seuil a parfois été porté à 30 μm afin d’accentuer les différences relevées en matière de neuritogénèse d’un substrat à l’autre. La mesure des longueurs des neurites a été effectuée manuellement à l’aide d’ImageJ (cf. chapitre 3).

Cinétique de croissance axonale

La mesure de la longueur des neurites en fonction du temps a fait l’objet d’un protocole particulier, découlant de restrictions techniques ne nous permettant pas de mesurer en continu l’évolution des neurites sur une surface pendant une période prolongée (même de quelques heures). Pour pallier à ces restrictions, nous avons cultivé les cellules normalement, et à intervalles plus ou moins réguliers (une heure minimum), les boîtes contenant les cellules ont été sorties de l’incubateur pour prendre de multiples photographies de ces dernières. Ensuite, toutes les neurites photographiées ont été mesurées selon le protocole décrit plus haut, et seules les dix plus grandes valeurs ont été retenues pour en effectuer la moyenne. Ce procédé permet de s’affranchir de toutes les neurites initiées au cours de l’expérience, et qui viendrait donc abaisser les longueurs moyennes calculées pour un groupe particulier de neurites. On peut donc *a priori* considérer que les résultats obtenus font état des seules neurites générées au début de l’expérience.

7.3.2 Comptage des filopodes et des lamellipodes

La méthode décrite ici fait suite aux protocoles décrits précédemment concernant le traitement des cellules par la cytochalasine-B. Tout d’abord, pour chaque condition de culture considérée, une douzaine de cônes de croissance fixés et choisis au hasard sur le substrat ont été imagés par AFM. Ensuite, nous avons compté le nombre de filopodes visibles sur les images, et déterminé si oui ou non nous voyions apparaître un ou des lamellipodes émergeant du cône ou à proximité immédiate. Pour chaque image, nous avons en outre distingué le nombre de filopodes émergeant, soit du cône de croissance, soit du corps de la neurite. Par ailleurs, des photos de la zone correspondante à chaque neurite ont été prises à l’aide du microscope optique, afin de déterminer la distance séparant la neurite imagée de la cellule qui lui est le plus proche sur la surface.

7.3.3 Conclusions

Les cellules PC12 revêtent un certain nombre de spécificités, en particulier sur le plan de la culture cellulaire, dont les conditions dépendent grandement des contraintes imposées par la nature des expériences. Soulignons les deux grands types d'expériences menées : dans la première série d'expérience (à suivre dans le [chapitre 8](#)), le volume de milieu (2 ml) est considéré comme « standard » vis-à-vis de la densité cellulaire, la durée des cultures est d'un minimum de 6 jours pleins, et les cultures sont réalisées sur des surfaces modifiées par des terminaisons amine (hormis l'htms_{M2}). Nous y comparerons les réponses cellulaires observées sur des monocouches d'alkylsiloxanes de classe 3 (eda', peda', htms_{M2}), et sur des surfaces couvertes de biopolymères (verre/PLL, verre/PLO, PS/PLL), fournissant des supports de classe 1. Dans la deuxième série d'expériences (à suivre dans le [chapitre 9](#)), le volume de milieu est réduit ($V = 335 \mu\text{l}$), la durée en culture aussi ($t \leq 48 \text{ h}$) et les cultures sont réalisées uniquement sur des lamelles de verre modifiées par des alkylsiloxanes, qu'ils soient dotés de terminaisons NH₂ ou CH₃. Les différentes conditions de culture suivant le type d'expériences menées sont résumées ci-dessous dans le [tableau 7.1](#). De même que pour les tableaux résumant les procédés de modification de surfaces ([tableau 2.2](#)) et la répartition des substrats dans les différentes classes relatives aux distributions d'énergie ([tableau 5.5](#)), il pourra être utile de s'y référer en temps voulu.

TABLEAU 7.1: Récapitulatif des conditions de culture des expériences décrites aux chapitres 8 et 9. V est le volume de milieu contenant les cellules lors de l'ensemencement des surfaces.

	<i>Chapitre 8</i>	<i>Chapitre 9</i>	
		Surfaces CH ₃ *	Surfaces NH ₂ *
Substrats	eda', peda', htms _{M2} , verre/PLL, verre/PLO, PS/PLL	ots, ods, otms, otms _x , htms _{M1} , htms _{M2} , htms _{M3} , htms _H , htms _{Hx} , odms _{x2} , odms _{24h}	eda, peda, deta, adms, aptms
$V_{\text{milieu}}^\dagger$	2 ml [‡]	335 μl	335 μl
# de cellules [†]	$\sim 5 \cdot 10^4$	$\sim 5 \cdot 10^4$	$\sim 5 \cdot 10^4$
Densité cellulaire [†]	$\sim 5 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-2}$	$\sim 10^4 \text{ cm}^{-2}$	$\sim 10^4 \text{ cm}^{-2}$
Temps en culture	≥ 6 jours	48 h	24 h
Changement de milieu	oui	non	non
Traitement au NGF	oui et non	non	non

* La répartition des surfaces dans les classes de distribution d'énergie est résumée dans le [tableau 5.5](#).

† Valeurs estimées lors de l'ensemencement des surfaces par les cellules (à t_0).

‡ Pour les expériences en RICM, ce volume est porté à 5 ml.

Chapitre 8

Influence de la distribution des énergies de surface sur la neuritogénèse

Au cours des chapitres précédents, nous avons, d'une part, décrit les propriétés des surfaces en termes de distribution d'énergie (chapitres 4 et 5), et d'autre part, présenté les protocoles et techniques d'investigation se rapportant à la manipulation des cellules (chapitre 7). Nous allons maintenant présenter les résultats décrivant l'évolution des cellules en culture sur une partie des surfaces analysées au chapitre 5, et nous concentrer plus particulièrement sur les différences constatées entre des surfaces de classe 3 à base de verre silanisé (eda', peda', htms_{M2}) et des surfaces de classe 1 fabriquées par la physisorption de biopolymères adsorbés sur du verre (verre/PLL et verre/PLO) ou du plastique (PS/PLL), qui font office de surfaces de contrôle pour nos expériences. Contrairement aux biopolymères, physisorbés au verre ou au plastique, et donc susceptibles de se désorber en milieu liquide, les surfaces silanisées forment des surfaces relativement stables, puisque les molécules utilisées pour modifier le verre y forment des liaisons covalentes. Ces dernières ont prouvé [46] qu'elles pouvaient présenter une alternative convenable aux biopolymères comme la poly-L-lysine, substrat standard pour la culture de neurones [197].

La PLL est considérée comme promoteur d'une interaction non-spécifique avec la surface des cellules, et donc dépourvue de mécanisme de type « clé-serrure ». En outre, l'énergie de surface est distribuée de façon très homogène à l'échelle submicrométrique, contrairement aux surfaces silanisées de classe 3 évoquées précédemment. Les résultats présentés ci-après visent à montrer que la distribution d'énergie de surface, et sa distribution spatiale aux échelles submicrométriques, peut se révéler d'une influence critique sur la faculté des cellules à initier des neurites. Nous montrerons ainsi que, par-delà l'influence des terminaisons chimiques présentes en surface des substrats, une distribution spécifique des signaux physiques est en mesure d'induire la différenciation des cellules PC12, dans un milieu non enrichi par l'ajout de NGF. Signalons que la plupart des résultats présentés au cours des pages qui suivent est rassemblée dans un article publié dans la revue *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [137] (cf. annexe B).

8.1 Prolifération *vs.* neuritogénèse

8.1.1 Cellules sur substrats de classe 1 ou 3 en présence ou en l'absence de NGF

Les cellules PC12 cultivées sur une surface de verre modifiée par l'EDA (substrat eda') développent des neurites dans un milieu sans NGF (figure 8.1). Après quatre à six jours de culture, les neurites sont initiées par la plupart des cellules isolées. D'une longueur pouvant atteindre 150 μm , elles dépassent les 25 μm dans environ 20% des cas, sur un échantillon total de 116 cellules isolées,

comptées à partir de diverses photographies prises au cours de l'expérience présentée à la [figure 8.2](#). En revanche, quand les mêmes cellules sont cultivées dans les mêmes conditions (sans NGF) mais sur un substrat de verre/PLL, aucun processus de développement de neurite n'est observé, suggérant que les cellules ne se sont pas différenciées sur le substrat.

Si la culture cellulaire est prolongée au-delà de 6 jours, dans le cas de l'eda', les cellules isolées restantes initient à leur tour des neurites, et après 12 jours de culture nous observons un taux d'environ 60 à 80% de ces cellules initiant des neurites d'une longueur supérieure à 25 μm . La formation de neurites s'effectue jusqu'à ce qu'elle soit finalement contrainte, soit par le regroupement des cellules, qui s'attirent mutuellement *via* la production de facteurs attractifs, soit par l'expansion des colonies de cellules qui continuent de proliférer. En effet, les cellules PC12 tendent à former de petites colonies, observées indistinctement sur eda' ou verre/PLL. Les cellules PC12 ont une aptitude particulière à former plus facilement des contacts cellule-cellule que des contacts cellule-substrat [92]. Mêmeensemencées à des densités relativement faibles (ici : 5.10^3 cm^{-2}), les cellules forment ces colonies qui s'étendent au fil du temps.

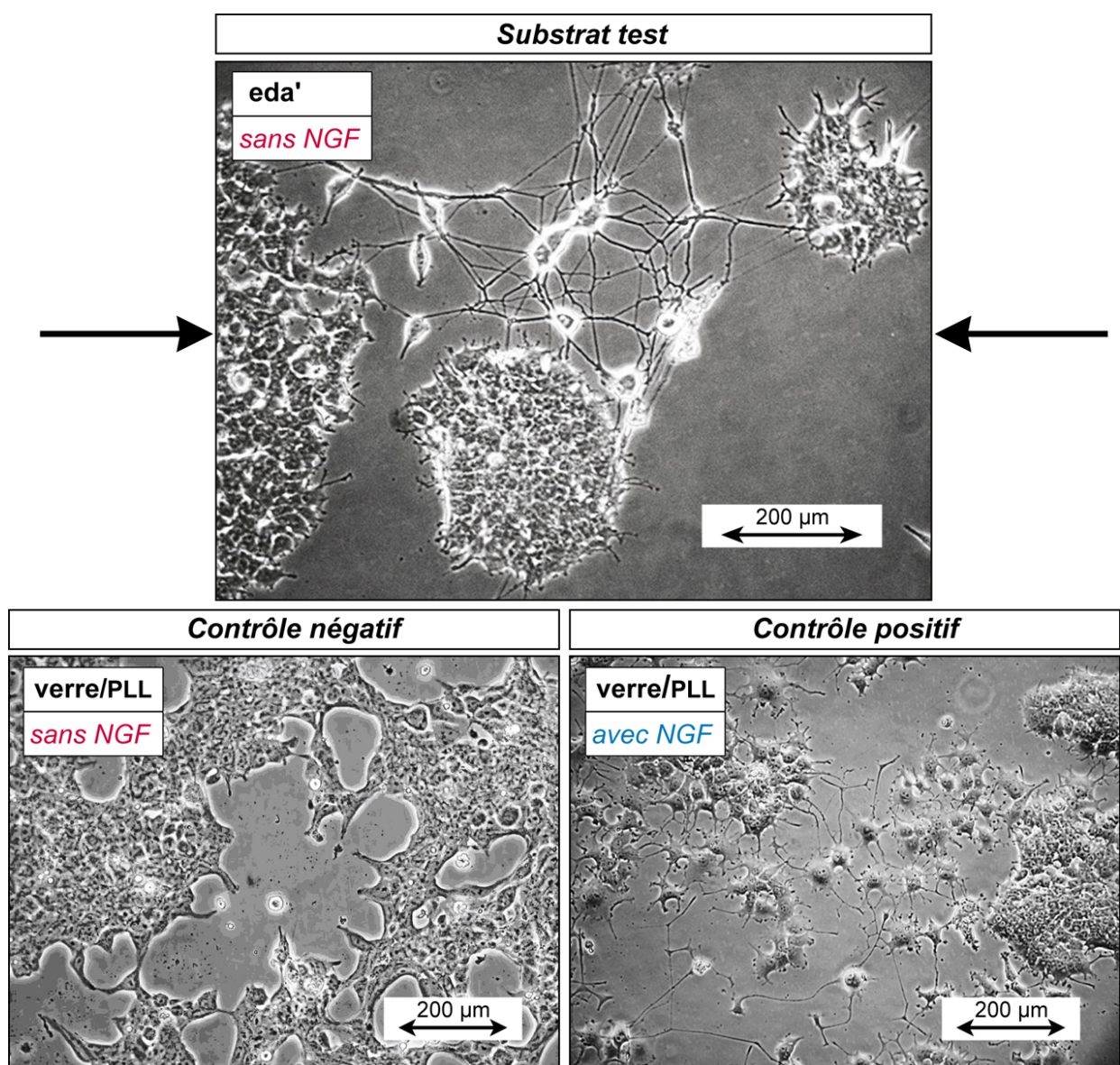


FIGURE 8.1: Cellules PC12 cultivées sur eda' (sans NGF) et sur verre/PLL (avec et sans NGF). Les photos proviennent d'un microscope optique à contraste de phase et sont prises après 6 jours de culture. Des neurites sont initiées sur eda', et sur verre/PLL uniquement dans le cas où les cellules subissent un traitement au NGF. Dans ce dernier cas, les cellules continuent de proliférer sur la surface jusqu'à la recouvrir entièrement (\leftrightarrow confluence).

Une fois piégées au sein d’une colonie, les cellules ne se comportent plus comme les cellules isolées. Une cellule piégée ne développe plus de neurite, quel que soit le substrat et que du NGF soit ajouté au milieu ou pas. En particulier, les cellules PC12 piégées dans des amas cellulaires sur verre/PLL, en présence de NGF, ne développent pas de neurite, contrairement aux cellules isolées situées à proximité. En accord avec la littérature [147, 188], les cellules PC12 cultivées sur un substrat couvert de PLL initient des neurites dès lors que le milieu est complété d’une concentration adéquate de NGF, et qu’elles ne sont pas piégées au sein de colonies (figure 8.1).

Globalement, les observations indiquent que les surfaces de classe 3 composées de verre modifié par greffage de l’aminosilane EDA, déclenchent la neuritogénèse, de façon similaire au NGF lorsque les cellules sont cultivées sur des bio-substrats plus classiques ; cependant l’eda’ ne semble pour autant pas bloquer la prolifération des cellules, en particulier de celles piégées au sein des colonies.

Les substrats eda’ et verre/PLL exhibent en surface des propriétés chimiques comparables, comportant chacun des groupements amine. En revanche, la distribution de ces terminaisons amine est différente entre ces substrats, comme nous avons pu le constater au travers des analyses effectuées au cours de la première partie de ce travail (cf. chapitre 5). La différence essentielle semble résider dans la présence de gradients locaux, provoqués par l’alternance de groupes NH_2 et de groupes OH, pour le substrat eda’, alors que le substrat verre/PLL semble constitué d’un tapis plus lisse et homogène de terminaisons amine, responsables d’une distribution elle aussi plus homogène des énergies de surface. Ainsi, les gradients locaux dans les énergies d’adhésion semblent être le critère essentiel provoquant l’initiation de neurites par les cellules.

8.1.2 Influence physique ou influence chimique ?

Précisons d’emblée que les images présentées aux figures 8.2 et 8.3 proviennent de photographies prises au cours de la même expérience, alors que celles de la figure 8.1 proviennent d’une expérience indépendante, effectuée dans les mêmes conditions expérimentales (cf. tableau 7.1).

Terminaison chimique des molécules

L’épaisseur e de la couche formée sur le verre, tant par les oligomères d’aminosilane chimisorbés, que par la PLL physisorbée, est suffisamment petite ($e < 20$ nm) pour que nous puissions affirmer avec une quasi-certitude que la rigidité (ou l’élasticité) du substrat n’est pas un paramètre entrant en ligne de compte dans ces expériences. Il est par contre possible que la nature des terminaisons chimiques puisse influencer sur les résultats [27–29]. C’est pourquoi les expériences ont été reproduites en utilisant d’autres substrats, appartenant aux mêmes classes mais composés de molécules dont le groupe terminal est différent chimiquement. À savoir, pour la classe 1 : la poly-L-ornithine (PLO), dotée d’une amine terminale non chargée (celle de la PLL étant chargée positivement), et pour la classe 3 : l’HTMS, doté d’une terminaison CH_3 (contre NH_2 pour l’EDA).

Revenons un instant à l’analyse de surfaces pour ouvrir une parenthèse qui nous semble nécessaire. Nous souhaitons comparer l’effet des surfaces modifiées par l’EDA et par l’HTMS d’un point de vue chimique. Ces deux molécules sont placées dans des conditions similaires de greffage (temps de greffage ~ 16 h, cf. tableau 2.2) pour former les surfaces d’eda’ et d’htms_{M1}. La terminaison CH_3 de l’HTMS est sensée rendre la surface plus hydrophobe par rapport à celle modifiée par l’EDA, dotée d’une terminaison NH_2 , à la condition que le nombre de molécules adsorbées soit identique pour les deux substrats. Il ne semble pourtant pas que ce soit le cas, puisque l’eau forme un angle de contact sur l’htms_{M1} ($\sim 38^\circ$) inférieur à celui formé sur l’eda’ (cf. tableaux 4.2 et 5.1). Cela suggère que l’HTMS, pourtant placé dans des conditions identiques de greffage, s’adsorbe sur le verre plus lentement que l’EDA. Ce phénomène peut s’expliquer par la plus forte réactivité de la terminaison NH_2 dont l’EDA est munie, et l’hypothèse d’une réaction plus lente pour l’HTMS se voit renforcée par la nécessité d’allonger le temps de réaction à 24 h afin d’obtenir un angle de contact d’environ 47° (cas de l’htms_{M2}). Nous comparerons donc, non pas l’eda’ et l’htms_{M1}, mais l’eda’ et l’htms_{M2}, possédant le même angle de contact.

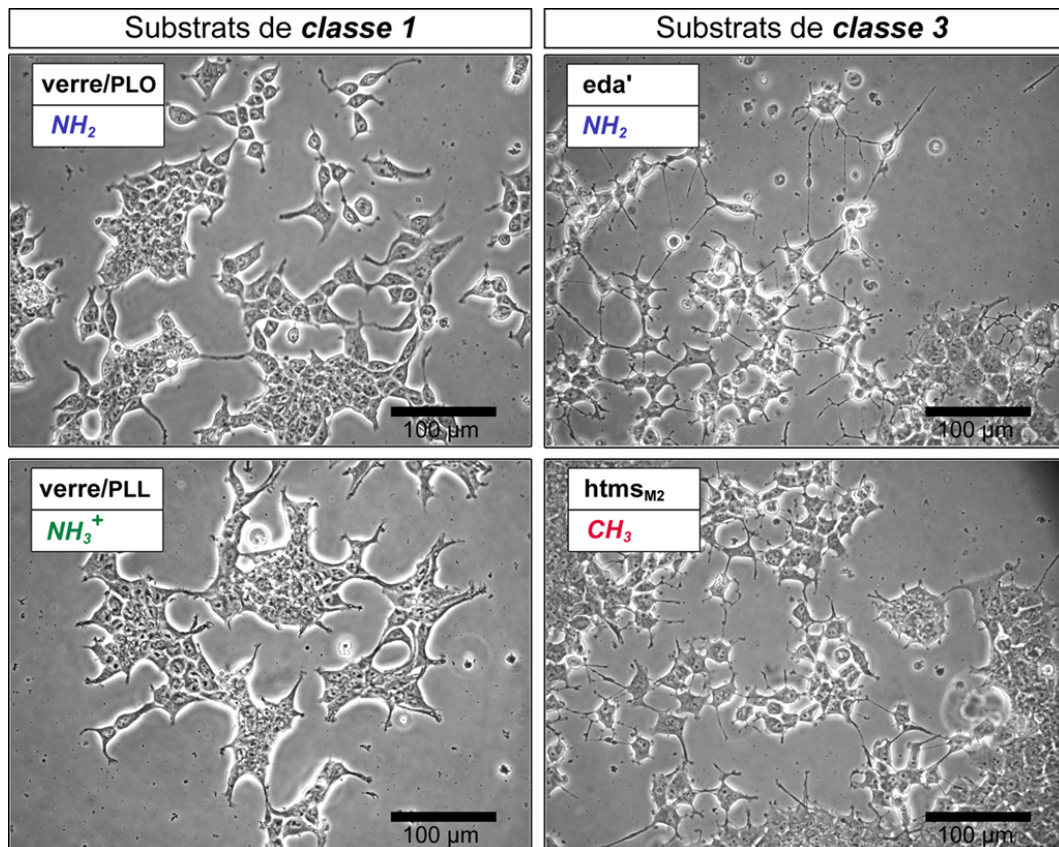


FIGURE 8.2: Évaluation de l'influence de la nature des terminaisons chimiques. La neuritogénèse est sensiblement identique sur verre/PLL et verre/PLO (quasi-nulle), ou sur eda' et htms_{M2} (élevée). Les cultures sont réalisées sans NGF. Ces résultats indiquent que la nature et la charge éventuelle des groupements chimiques présents en surface ne constituent pas le critère essentiel stimulant ou non la neuritogénèse. Le facteur essentiel est donc bien la distribution spatiale des groupes chimiques, et donc la distribution des énergies d'adhésion.

La réponse des cellules en culture sur les surfaces modifiées par la PLO (verre/PLO) et par l'HTMS (htms_{M2}) est comparable à celle des cellules en culture sur des surfaces respectivement modifiées par la PLL et par l'EDA. Après 6 jours de culture sans NGF, la production de neurites sur verre/PLO n'est pas plus significative que sur verre/PLL. Par contre, les cellules isolées développent des neurites sur htms_{M2} comme elles le font sur eda', à ceci près que la longueur des neurites initiées semble plus courte que sur eda'. Ces résultats renforcent l'hypothèse que c'est la nature physique du substrat, à savoir la distribution de l'énergie de surface, et non sa nature chimique, qui est à l'origine de la production ou de l'absence de production de neurites par les cellules PC12.

Autres paramètres : sous-substrat et groupe phényle

Habituellement, les biopolymères comme la PLL ou la PLO sont plutôt utilisés pour couvrir des surfaces de plastique (ou polystyrène, PS), et non des surfaces de verre, sauf dans le cadre de manipulations spécifiques requérant leur utilisation, comme c'est le cas pour la microscopie optique de fluorescence. Nous avons donc testé le substrat « PS/PLL », afin d'évaluer notamment si l'élévation de la rugosité, induite par la différence de structure du plastique par rapport à celle du verre, beaucoup plus lisse, pouvait induire un changement au niveau du comportement des cellules. Bien que les surfaces de plastique génèrent un rms d'environ 2–3 nm, les biopolymères sont supposés couvrir ces surfaces d'une façon similaire au verre, c'est-à-dire de façon homogène. Les observations indiquent que les cellules ne produisent pas plus de neurites lorsqu'elles sont cultivées sans apport externe de NGF sur de la PLL couvrant du plastique (figure 8.3), que lorsqu'elles sont cultivées sur de la PLL couvrant une surface de verre (figures 8.1 et 8.2).

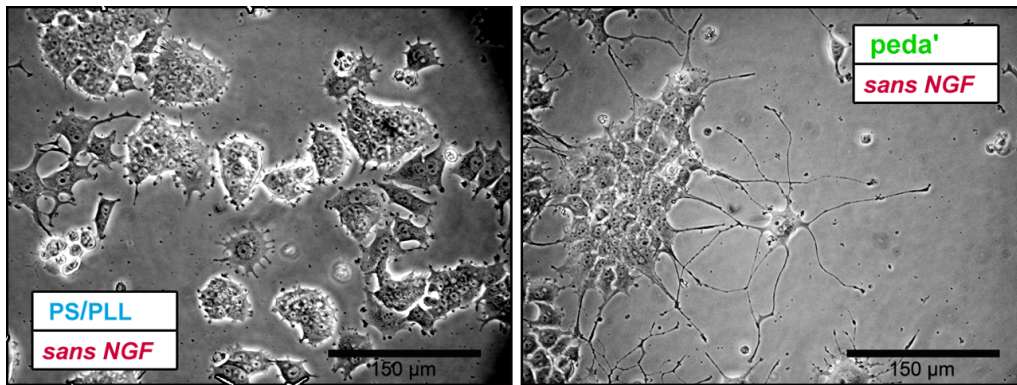


FIGURE 8.3: Évaluation de l'influence d'autres paramètres sur la croissance axonale des PC12.

Sur PS/PLL la neuritogénèse n'est pas plus significative que sur verre/PLL (figure 8.1). Sur *peda'*, les cellules initient des neurites de la même manière que sur *eda'* (figures 8.1 et 8.2).

Cela indique que la morphologie et/ou le rms généré par les fibres de plastique ne paraissent pas susceptibles de stimuler la neuritogénèse des cellules PC12. Ce résultat peut sembler trivial à première vue, dans la mesure où le maintien de la culture se déroule également sur un substrat de PLL, recouvrant la surface de boîtes en plastique spécialement traitées pour la culture cellulaire (T25), et que les cellules ne se différencient pas sur ce substrat. Cependant, cette vérification est essentielle, puisque dans les conditions expérimentales, la densité surfacique des cellules déposées sur le substrat au temps t_0 est bien moindre que dans le cadre du maintien de la culture ($\sim 5 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-2}$ contre $\sim 5 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-2}$).

Indirectement, ces résultats suggèrent aussi que la nanorugosité des substrats d'*eda'* ou d'*htms_M*, pour lesquels le greffage n'est pas optimal, n'est pas responsable des mécanismes qui conduisent les cellules à générer des neurites en l'absence de NGF. Nous vérifierons cette hypothèse au cours du chapitre suivant.

Enfin, une autre molécule dont la structure est proche de celle de l'EDA a également fait l'objet du même type d'expérience : il s'agit du PEDA, comportant un groupe phényle le long de sa chaîne carbonée. Le PEDA étant, tout comme l'EDA et l'HTMS, un trialkoxysilane, il conduit dans les mêmes conditions de greffage, à une surface désordonnée de classe 3. Seul son groupe phényle le différencie de l'EDA, et rend théoriquement la surface légèrement plus hydrophobe, ce qui est effectivement constaté pour des substrats dont les greffages respectifs de ces deux molécules sont optimaux ($\theta_{\text{H}_2\text{O}} \approx 70^\circ$ pour le *peda*, et $\theta_{\text{H}_2\text{O}} \approx 67^\circ$ pour l'*eda*). Les observations indiquent que les cellules génèrent aussi des neurites lorsqu'elles sont cultivées sur ce substrat (figure 8.3), suggérant une fois de plus que la nature des groupements chimiques du substrat n'est pas le facteur essentiel conduisant aux résultats obtenus.

8.2 Caractérisation de l'état de différenciation

8.2.1 Estimation des niveaux d'expression de MAP1B

Comme vu au chapitre 6, l'état de différenciation des cellules neuronales est caractérisé par les hauts niveaux d'expression de marqueurs protéiques neuronaux tels que MAP1B ou Tau. Aussi, rappelons brièvement que MAP1B, protéine spécifique des neurones, est impliquée dans l'assemblage des microtubules [198], et que son expression est stimulée parallèlement à la différenciation des cellules PC12 suite à un traitement au NGF [151, 199], lorsque les cellules sont cultivées sur un substrat standard enduit de PLL. Notamment, l'action du NGF se manifeste en activant de façon sélective une protéine kinase impliquée dans la phosphorylation des MAP [200].

Sans surprise, de hauts niveaux de fluorescence reflétant la concentration de MAP1B sont détectés dans les cellules générant des neurites, typiquement dans les cellules isolées plutôt que dans les cellules au sein d'agrégats cellulaires (figure 8.4). Les niveaux élevés de neuritogénèse,

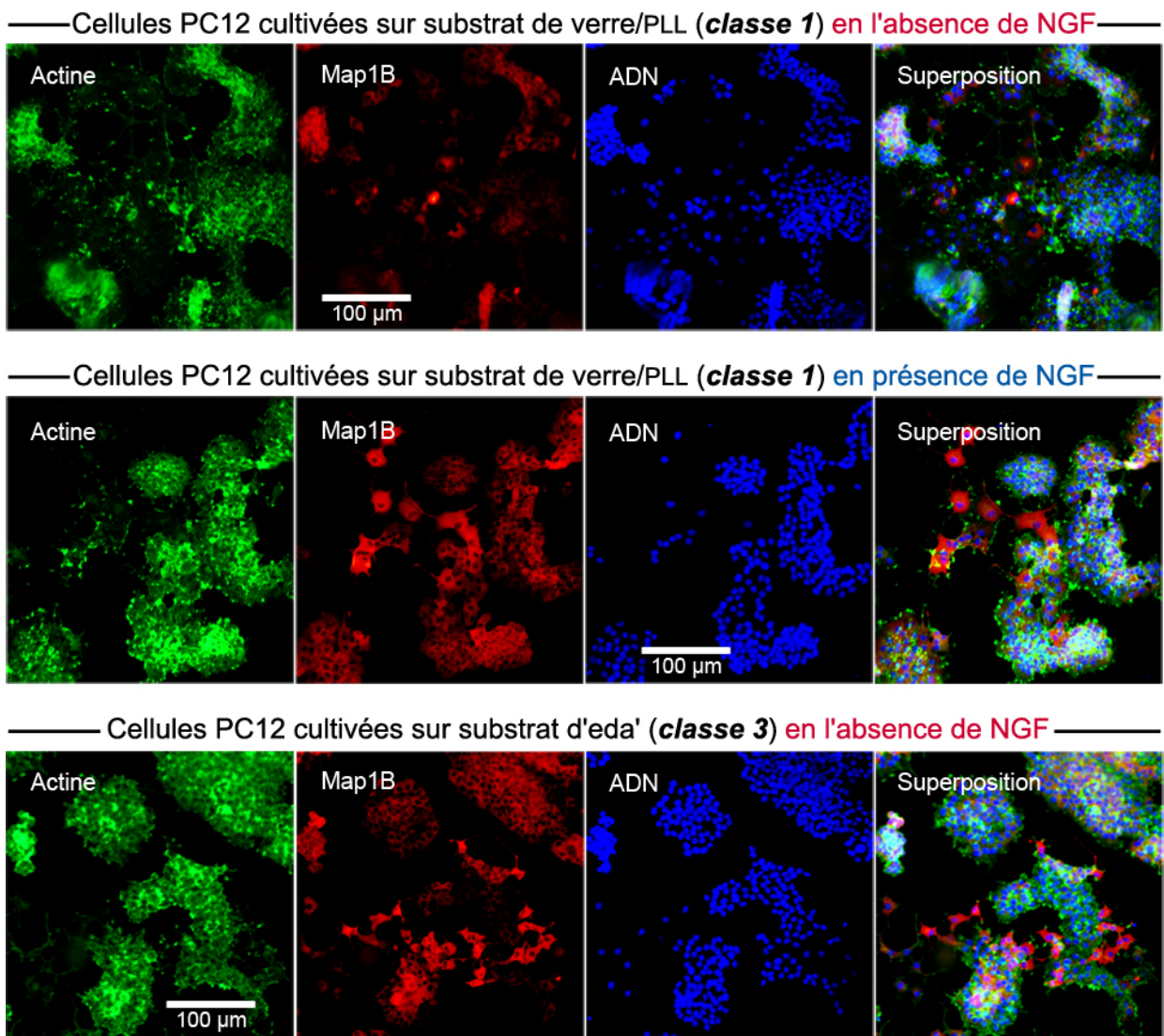


FIGURE 8.4: Expression de MAP1B sur verre/PLL et eda', en présence ou en l'absence de NGF. De fortes intensités de fluorescence reflétant des concentrations élevées de MAP1B sont repérées dans les cellules isolées cultivées en présence de NGF sur verre/PLL, ou en l'absence de NGF sur eda', mais pas en l'absence de NGF sur verre/PLL.

corrélativement aux hauts niveaux de fluorescence, sont induits non seulement par le traitement au NGF des cellules sur verre/PLL, mais également par le substrat eda' lui-même. Inversement, les signaux de fluorescence apparaissent globalement plus faibles dans les cellules évoluant sur verre/PLL mais non stimulées par le traitement au NGF. Cette observation est évidente en ce qui concerne les cellules isolées, tandis que les colonies de cellules renvoient parfois des signaux de fluorescence plus élevés. Cependant, cette hausse de fluorescence constatée pour les colonies de cellules ne peut être considérée comme significative, et ce quelle que soit la surface. En effet, elle découle vraisemblablement de signaux intrinsèquement plus faibles, mais qui, en provenant de multiples cellules, se superposent les uns aux autres pour donner l'apparence d'un signal élevé.

Ces résultats fournissent de nouveaux éléments prouvant que les propriétés de surface du verre modifié par l'EDA peuvent induire la différenciation neuronale des cellules PC12. Autrement dit, les cellules produisent des neurites, non pas en réaction à un stress quelconque, mais bien à la suite d'un processus conduisant à les faire suivre une voie de différenciation stable et caractéristique de tout neurone différencié digne de cette appellation. En outre, ces résultats confirment les résultats d'autres études [150, 153–155] stipulant que le traitement au NGF n'est pas l'unique stimulus menant à la neuritogénèse des cellules PC12. Examinons à présent la localisation de Tau dans les cellules PC12 cultivées sur divers substrats et traitées ou non par du NGF (figure 8.5).

8.2.2 Localisation de Tau au sein des cellules différenciées

Pour commencer, quelques rappels : de même que pour MAP1B, le traitement au NGF stimule l'expression de Tau dans les cellules PC12 [151]. Tau stabilise les microtubules, faisant pencher la balance cinétique de polymérisation/dépolymérisation en faveur de l'addition de nouvelles sous-unités de tubuline aux extrémités des microtubules, stimulant ainsi leur croissance [170]. Tau est également identifié comme s'associant avec l'actine filamenteuse au niveau des cônes de croissance, et comme régulant les processus dynamiques du cytosquelette d'actine impliqués dans la différenciation des cellules PC12 [159, 201].

Conformément aux résultats reportés dans la littérature, les cellules PC12 cultivées sur un substrat couvert de PLL (classe 1) et dans un milieu enrichi en NGF expriment Tau, comme l'indiquent les hauts niveaux de fluorescence repérés dans la cellule imagée, aussi bien dans le corps cellulaire que le long des neurites (figure 8.5). En outre, Tau est exprimé dans les cellules cultivées sans NGF sur les substrats de classe 3 présentés (eda', peda', htms_{M2}). La localisation de Tau au sein des neurites présente des similarités suivant que les cellules sont différenciées par traitement au NGF sur verre/PLL ou par « effet de surface » sur eda', peda' et htms_{M2}. En effet, Tau est particulièrement visible, corps cellulaires exceptés, dans tous les cônes de croissance (figure 8.5, flèches pleines) ainsi qu'aux points de branchements des neurites ou aux points où celles-ci changent de direction (figure 8.5, flèches creuses), c'est-à-dire dans toutes les zones neuritiques où la dynamique des microtubules est particulièrement importante. Ces résultats indiquent une fois encore que les interactions cellule-substrat peuvent, sinon se substituer au NGF, tout au moins conduire à des mécanismes dont les effets sont similaires à ceux du NGF, en participant à l'initiation des neurites par les cellules.

Toutefois, la fluorescence de Tau semble parfois plus élevée et mieux distribuée tout le long des neurites lorsque les cellules sont différenciées par traitement au NGF (figure 8.5, ellipse pointillée) plutôt que par effet de surface. Cette constatation nous amène à faire l'hypothèse suivante : bien que les interactions cellule-substrat semblent capables à elles-seules de générer la production de neurites par les cellules, elles ne peuvent se substituer entièrement aux fonctions remplies par le NGF, autrement dit, les mécanismes moléculaires liés à la différenciation des cellules ne seraient pas tous activés. Une observation d'une autre nature vient à l'appui de cette interprétation : dans nos expériences, les cellules PC12 différenciées par effet de surface sur les substrats de classe 3 n'ont en règle générale pas survécu lorsque la culture se prolongeait au-delà d'une douzaine de jours. Par contre, les cellules traitées au NGF étaient capables de se maintenir, dans leur état différencié, et sous réserve que le NGF soit constamment renouvelé, au-delà d'une durée de vingt jours. En outre, la longueur des neurites mesurées excédait rarement la centaine de microns, alors que des cellules traitées au NGF étendaient des neurites bien plus grandes ($l > 1$ mm) dès lors qu'elles étaient cultivées suffisamment longtemps. Par conséquent, bien que la présence de NGF ne semble pas obligatoirement requise afin de déclencher les mécanismes conduisant à la différenciation, elle pourrait le devenir par la suite, en permettant aux cellules PC12, non seulement de survivre à long terme dans un état différencié, et parallèlement, de stabiliser ses neurites et ainsi permettre leur extension prolongée dans l'espace environnant.

8.3 Structure des interfaces cellule-substrat

8.3.1 Forces d'adhésion

Estimation de l'intensité des interactions adhésives selon le substrat

L'observation de cellules par RICM permet de visualiser les régions adhérentes des cellules en contact rapproché avec le substrat, qui apparaissent foncées sur les images [194]. Les cellules PC12 semblent moins adhérentes sur les substrats de verre silanisés eda' et htms_{M2} que sur les surfaces de verre sur lesquelles les biopolymères PLO et PLL sont physisorbés (figure 8.6).

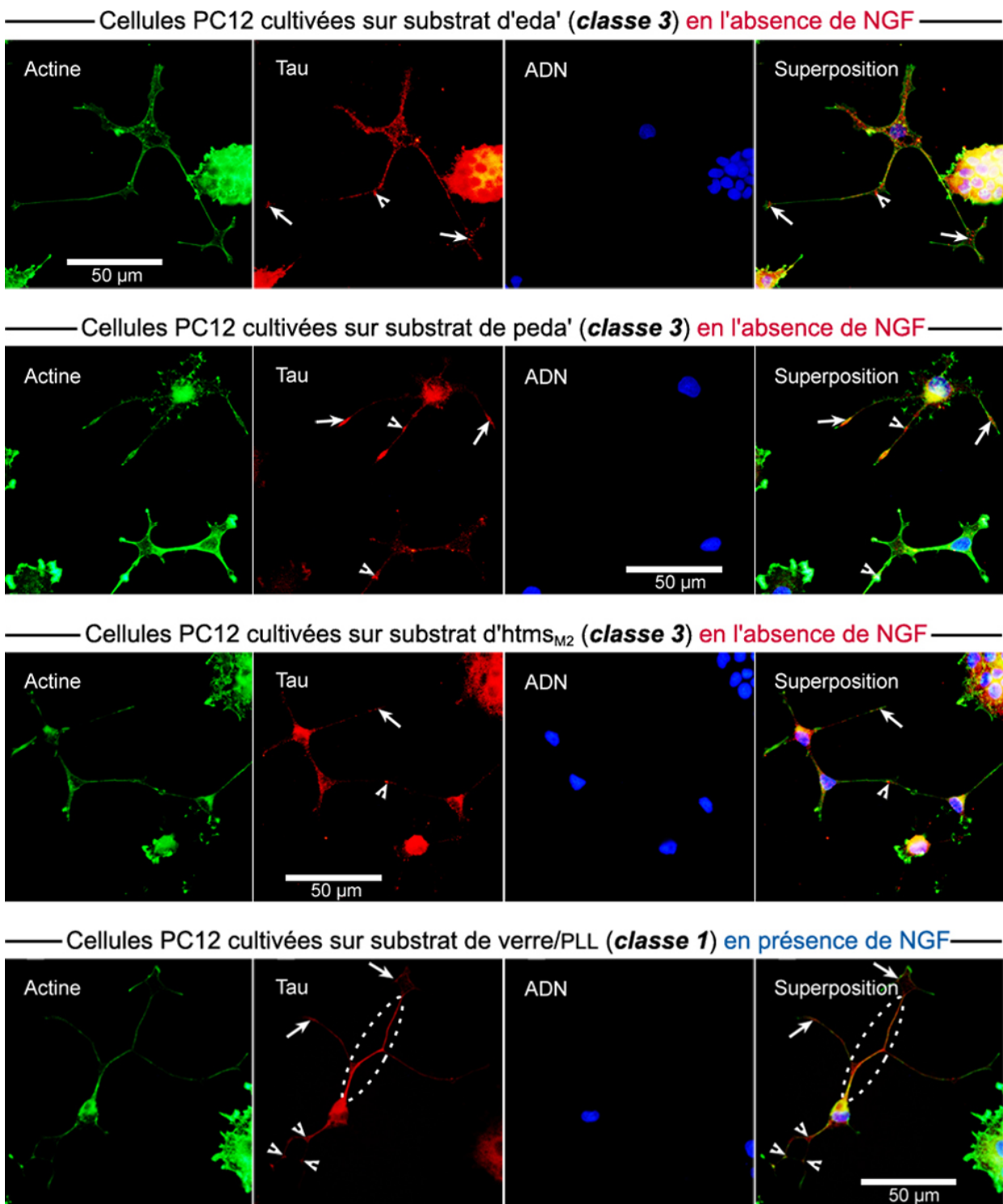


FIGURE 8.5: Localisation de Tau dans les neurites des cellules PC12 différenciées. Les flèches indiquent des intensités de fluorescence élevées reflétant des concentrations élevées de Tau dans les cônes de croissance. Les pointes de flèche indiquent la même chose là où les neurites se branchent ou changent de direction. L'ellipse pointillée indique une neurite pour laquelle Tau semble présent en quantité importante tout le long de la neurite.

Sur les surfaces silanisées, seuls les cônes de croissance semblent en contact proche avec le substrat. Au contraire, les cellules en culture sur verre/PLL et sur verre/PLO voient la majorité de leur surface adhérente apparaître en foncé, signe que les cellules développent une interaction plus adhésive sur toute la surface accessible à la membrane. Cette différence pourrait être corrélée à la distribution des terminaisons amine (NH_2 ou NH_3^+), couvrant la surface de manière plus dense et plus homogène dans le cas des substrats de classe 1. Les surfaces de classe 3, quant à elles, com-

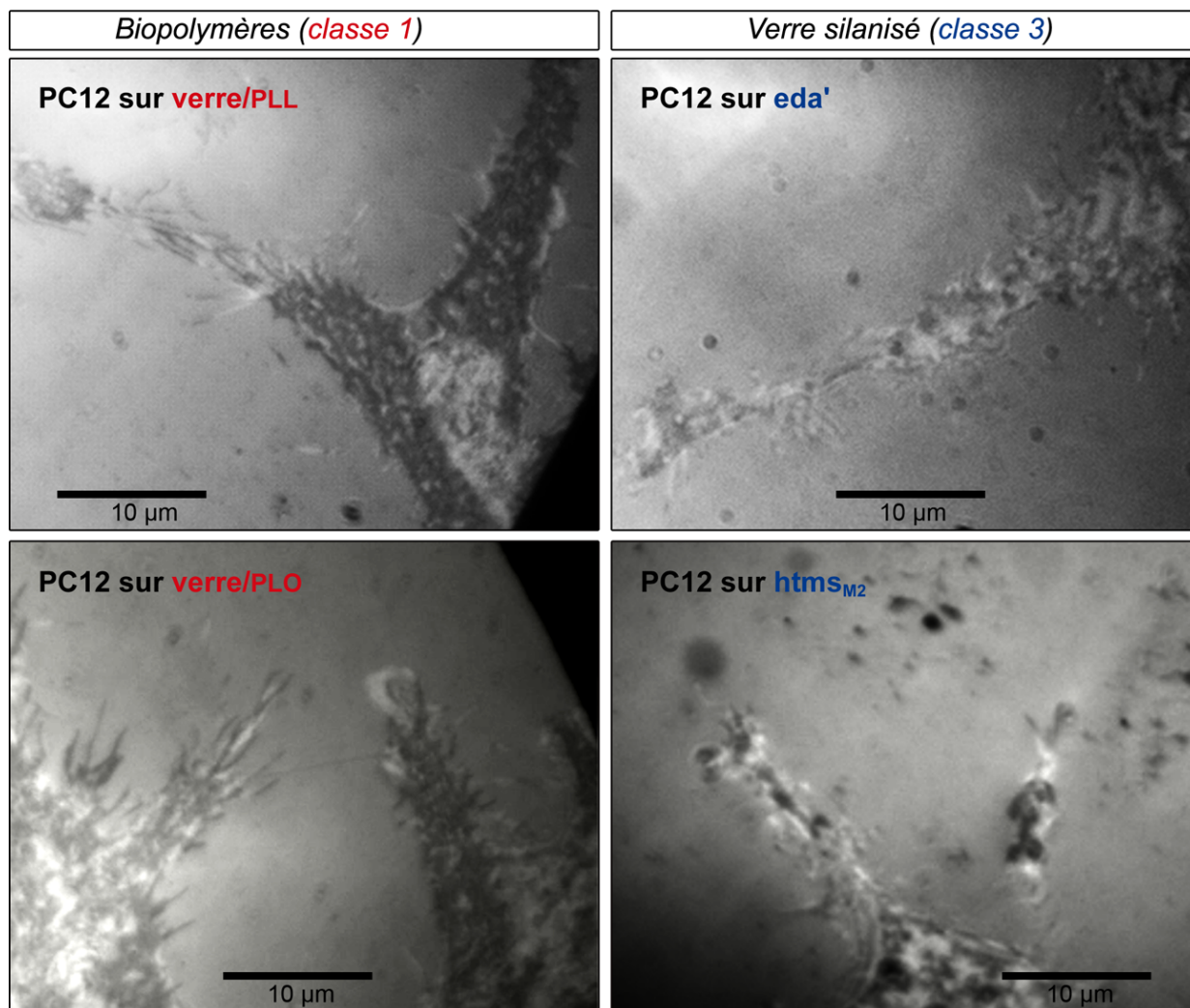


FIGURE 8.6: RICM en conditions de culture sur des cellules vivantes (toujours en l'absence de NGF). Les cellules en culture sont en contact plus rapproché avec la surface des biopolymères qu'avec les surfaces de verre silanisées.

portent une part non-négligeable de groupes hydroxyle (OH) exposés. Bien que ces groupes OH produisent une surface très hydrophile et une énergie de surface très élevée ($\gamma_c \geq 150 \text{ mN m}^{-1}$), ils sont peu favorables à l'adhésion des cellules PC12 d'un point de vue chimique (nous développerons cet aspect au chapitre 9). Considérant cela, la faible adhésion observée sur eda' et sur htms_{M2} supporte l'hypothèse effectuée dans la partie « surfaces » (partie I), établissant les surfaces silanisées de classe 3 comme présentant un caractère chimique macroscopique proche de celui du verre. Il est aussi possible que la nanorugosité des substrats eda' ou htms_M, pour lesquels l'adsorption d'EDA et d'HTMS n'est pas optimale, affaiblisse les contacts cellule-substrat.

Influence sur la morphologie des neurites

Des études précédentes [202, 203] ont montré que la topographie des substrats, à des échelles très petites ($< 1 \mu\text{m}$), pouvaient moduler la production de neurites par les cellules PC12, en coopération avec le NGF. Dans le même ordre d'idée, des biomatériaux composés par exemple de membranes en silicone pourvues de nanopores, peuvent influencer sur la morphologie des cellules PC12, toujours en présence de NGF [204]. Ainsi, les cellules PC12 semblent non seulement en mesure d'intégrer la structure spatiale de leur environnement aux échelles nanométriques, mais également d'adapter leurs formes à cet environnement.

De manière analogue à la topographie, la distribution des terminaisons chimiques des substrats, et donc la distribution des énergies d'adhésion, semble affecter la morphologie des neurites

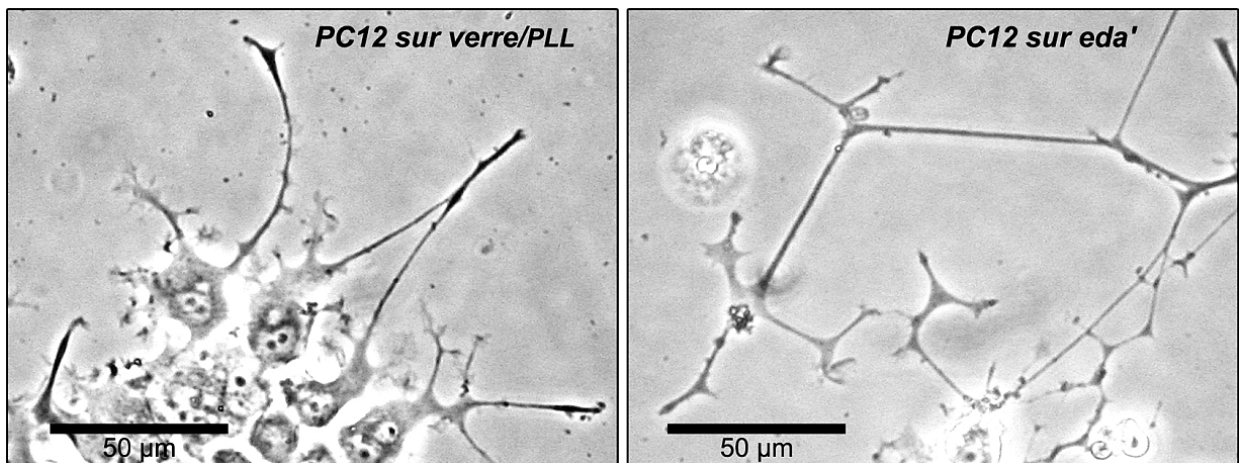


FIGURE 8.7: Morphologie des neurites évoluant sur verre/PLL et sur eda'. Les neurites effectuent des courbes sur verre/PLL, alors que sur eda' les neurites sont étirées de façon rectiligne entre deux points d'adhésion.

initiées. La distribution homogène des terminaisons amine du substrat verre/PLL permet au neurites d'adhérer plus fermement. C'est probablement pourquoi nous observons ces neurites suivre des trajectoires courbes sur verre/PLL lorsque les cellules sont différenciées suite à un traitement au NGF (figure 8.7), suggérant le maintien de contacts rapprochés avec le substrat tout au long de leur croissance. Inversement, sur les surfaces silanisées, tel le substrat eda', les neurites paraissent souvent tracer des lignes droites entre ce que l'on suppose être des zones d'adhésion : du soma des cellules aux points de branchement, et jusqu'aux cônes de croissance. Entre ces zones d'adhésion, dont certaines apparaissent « foncées » en RICM (figure 8.6), les neurites adhèrent faiblement.

Ces observations suggèrent une interprétation possible en ce qui concerne la structure des substrats : l'hétérogénéité des surfaces silanisées de classe 3 n'est peut-être pas confinée au niveau submicrométrique. Il est par exemple envisageable que des agrégats de silanes se concentrent en des points particuliers des substrats, formant ainsi des zones d'adhésion plus fortes, sur lesquelles reposeraient les points de branchement observés. Les filopodes chargés de sonder la surface pourraient adhérer brièvement sur les zones pourvoyant une adhésion faible, puis s'étendre plus avant de façon à atteindre des zones d'adhésion plus forte, et au final orienter la croissance neuritique dans la direction correspondante. Nous entrevoyons ici la possibilité qu'auraient les signaux physiques du substrat, non seulement de générer la différenciation initiale des cellules, mais aussi d'influencer le guidage des neurites au cours de leur croissance. Quoiqu'il en soit, ce guidage potentiel est très certainement modulé par des signaux chimiques, c'est-à-dire par des molécules émises par les cellules à travers le milieu de culture environnant [19, 174].

8.3.2 Adsorption protéique sur les surfaces modifiées

Bien que les observations interférométriques semblent indiquer que les cellules seraient en mesure d'interagir directement avec les terminaisons chimiques présentes en surface des lamelles modifiées, il est plus probable que ces interactions soient modulées par les protéines du sérum, elles-mêmes en interaction constante avec la surface [205–207]. Évidemment, la contribution potentielle des protéines sériques à l'adhésion cellulaire dépend de leur habilité propre à adhérer aux surfaces [39]. Afin de tester cette hypothèse, l'analyse des surfaces dans les conditions de la culture cellulaire a été effectuée par imagerie AFM en milieu liquide (figure 8.8).

La surface de verre/PLL voit sa nanorugosité augmenter entre l'imagerie préalable au dépôt des cellules et l'imagerie dans les conditions de la culture. Le rms est typiquement inférieur au nanomètre quand la surface est imagée immédiatement après le traitement de la surface de verre par la PLL. Cette valeur est à peu près similaire à celle du verre propre. En revanche, dans les conditions expérimentales, c'est-à-dire 5 jours après le dépôt de cellules, le rms augmente jusqu'à

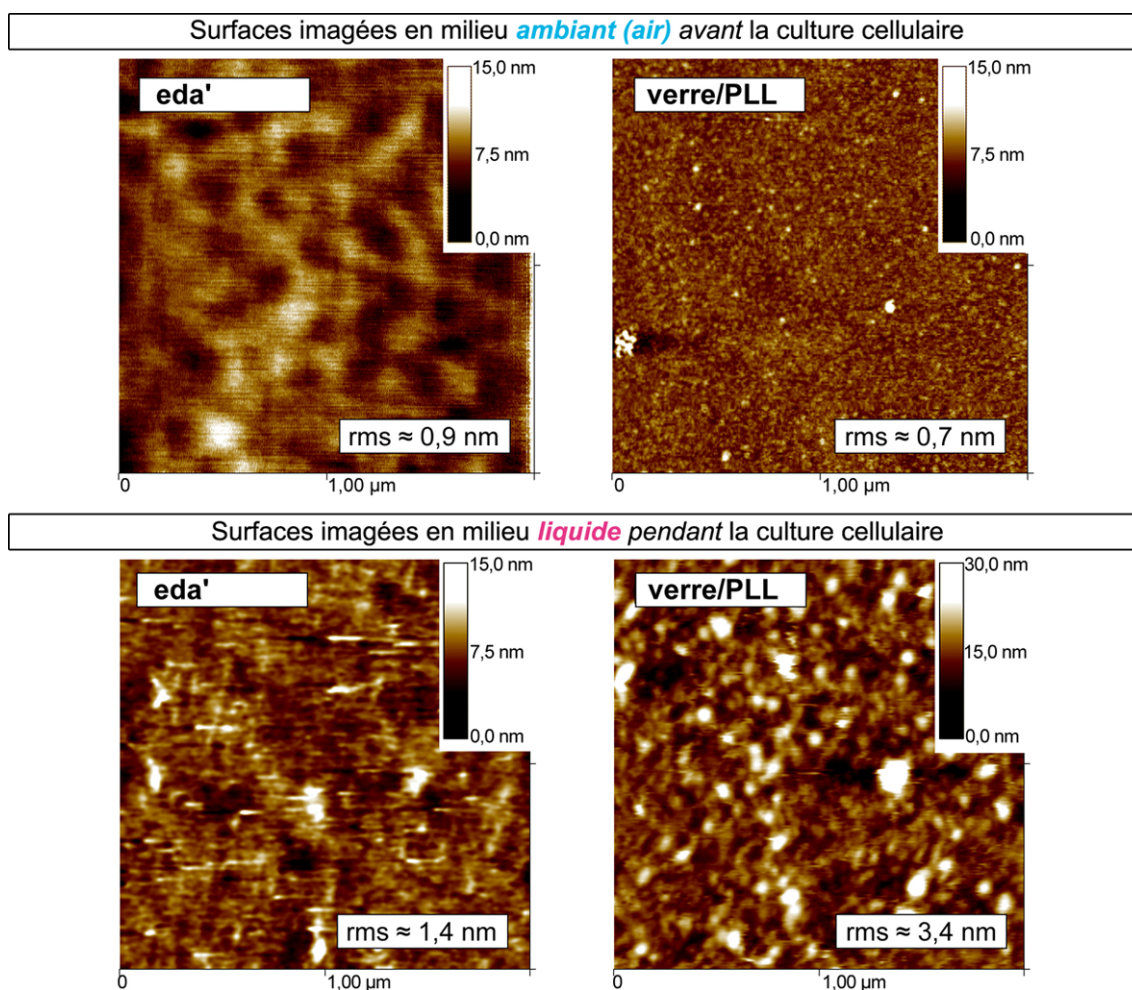


FIGURE 8.8: Évaluation de la modification des surfaces par l'adsorption de protéines du sérum (AFM). La rugosité sur verre/PLL est modifiée dans des proportions plus importantes que sur eda'.

atteindre une valeur d'environ 3 nm, suggérant l'adsorption de matériel sur la surface. Ce résultat va dans le sens d'une observation effectuée par RICHERT et coll. indiquant la forte affinité de protéines sériques avec des films de PLL [208]. Nous pensons donc que ce matériel correspond aux protéines sériques présentes dans le milieu de culture, telles que la fibronectine ou la BSA.

Au contraire, la nanorugosité de la surface eda' n'est pas significativement différente lorsqu'elle est imagée en milieu *ambient* ($\text{rms} \approx 0,9 \text{ nm}$) ou en milieu *liquide* ($\text{rms} \approx 1,4 \text{ nm}$), et ce bien qu'il soit démontré par ailleurs que des protéines telles que la BSA [209] ou la fibronectine [210] soient en mesure d'adhérer sur des surfaces de silice. En outre, la topographie de la surface, faisant apparaître des sortes de plots que nous supposons être des agrégats d'aminosilanes (cf. chapitre 5) ne semble pas modifiée outre mesure. Une quantité plus importante de protéines semble donc adhérer au substrat verre/PLL, pour lequel les terminaisons amine sont distribuées de façon plus homogène.

Au final, le substrat eda' ne semble pas être significativement modifié lors de son passage en milieu *liquide*, et par conséquent, les protéines du sérum pourraient de pas être le médiateur critique de la distribution d'énergie de surface provoquant la différenciation des cellules PC12. Il est par contre envisageable que l'adsorption protéique potentialise la surface d'eda' d'une façon différente de la surface de verre/PLL, mais sans pour autant modifier la nanorugosité du substrat, auquel cas elle pourrait avoir un effet déterminant sur le comportement des cellules. Remarquons au passage qu'une surface de PS/PLL ne semble pas sensiblement modifiée par l'éventuelle adsorption protéique en surface (figure 8.9), laissant la porte ouverte à tout type d'interprétation quant à leur modification éventuelle.

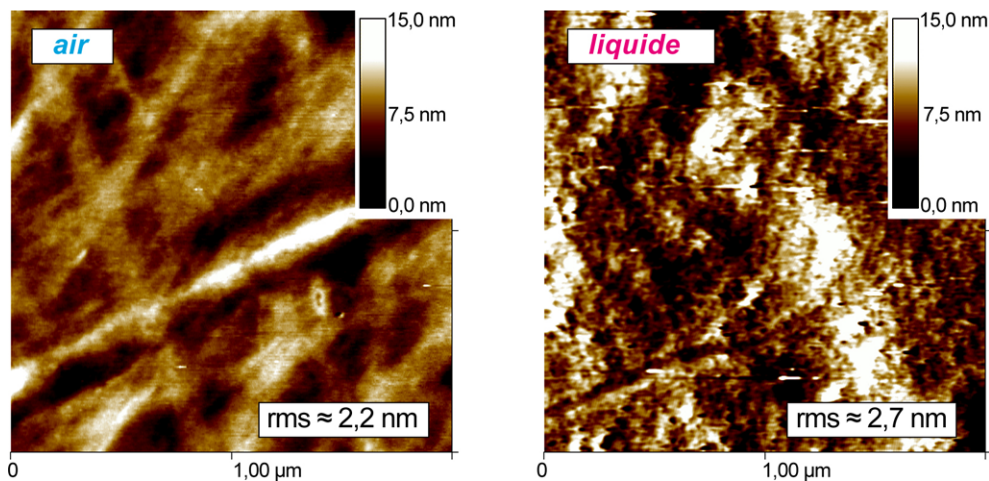


FIGURE 8.9: Substrat PS/PLL imagé par AFM en milieu ambiant et en milieu liquide (i.e., en conditions de culture). La rugosité n'est pas modifiée de façon significative.

8.3.3 Conclusions

Les expériences présentées dans ce chapitre ont permis de démontrer l'existence d'une connexion entre la distribution des énergies d'adhésion des substrats et la différenciation neuronale. Les cellules PC12 cultivées en l'absence de NGF sur des surfaces exhibant une distribution homogène de terminaisons NH_2 (verre/PLL ou PS/PLL) ou NH_3^+ (verre/PLO) prolifèrent. Par contre, certaines des cellules cultivées sur des surfaces pour lesquelles la distribution des terminaisons NH_2 (eda', peda') ou CH_3 (htms_{M2}) est plus hétérogène, semblent stopper le cycle de division mitotique dans lequel elles sont engagées par nature, et se mettent à produire des neurites. Il s'agit en particulier des cellules isolées, ou de celles présentes en périphérie des colonies cellulaires. Ces cellules présentent toutes les caractéristiques des cellules différenciées, à savoir la production de neurites, et surtout, l'expression de protéines associées aux microtubules, caractéristiques de cet état de différenciation. Les cellules font donc preuve d'un état de différenciation stable.

La visualisation de l'interface cellule-substrat par interférométrie nous a permis de constater que les cellules adhéraient de façon plus forte sur les surfaces de verre modifiées par physisorption de biopolymères que sur les surfaces de verre silanisées. En outre, l'imagerie AFM des surfaces en conditions de culture semble révéler une adsorption distincte des protéines suivant le type de surface, bien que les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure quant à la potentialisation effective des surfaces. Ce type de problématique étant très difficile à résoudre, nous avons choisi d'orienter la suite de ce travail sur, d'une part, l'identification précise des paramètres de surface qui conduisent à la différenciation des cellules, et d'autre part, l'identification des moyens dont pourraient disposer les cellules pour sonder et intégrer ces paramètres, et ainsi produire le type de réponse observée, à savoir la différenciation des cellules.

Chapitre 9

Impact des hétérogénéités chimiques à l'échelle nanométrique

Le chapitre précédent nous a permis de démontrer l'aptitude des cellules PC12 à se différencier sans apport externe de NGF lorsqu'elles étaient cultivées sur des surfaces auto-assemblées d'alkylsiloxanes sur du verre. Ces surfaces contenaient un mélange de fonctions OH et NH₂ (ou CH₃) pourvoyant des gradients locaux dans les énergies d'adhésion. Cependant, nous n'avons pas encore déterminé si le stimulus conduisant à la différenciation des cellules PC12 était la nanorugosité de la surface, la concentration surfacique des terminaisons des silanes (plus faible pour les surfaces de classe 3 que pour celles de classe 1), l'alternance à l'échelle nanométrique de groupes OH et NH₂ (ou CH₃), ou encore une combinaison de ces différents paramètres.

Nous examinerons les influences de ces stimuli potentiels, en mettant cette fois-ci de côté les surfaces modifiées par physisorption de biopolymères. À présent, afin de disposer de meilleurs contrôles, nous utilisons uniquement des surfaces de verre modifiées par divers alkylsiloxanes. En outre, les milieux de culture sont tous dépourvus de NGF, ce qui permet de réduire la durée des cultures tout en évitant les changements de milieu, auquel les cellules PC12 ont tendance à réagir plutôt négativement.

Dans la première partie du chapitre, nous étudierons le comportement des cellules sur des surfaces à terminaison CH₃ appartenant aux trois classes définies au [chapitre 2](#) et analysées au [chapitre 4](#). Cette section est résumée dans la référence [134] (cf. [annexe D](#)). Au cours de la seconde partie du chapitre, les expériences décrites mettront les cellules aux prises avec les surfaces de classe 2 et 3 à terminaison NH₂, analysées au [chapitre 5](#). Enfin, la dernière partie du chapitre sera consacrée à des expériences au cours desquelles nous tenterons de mettre en lumière les éventuels moyens dont disposent les cellules pour sonder la distribution énergétique des surfaces sur lesquelles elles évoluent. Nous nous attarderons sur le possible rôle joué par les filopodes, dont l'importance a déjà été démontrée, tant dans l'initiation des neurites [211] que dans la sensation des nanostructures environnantes [203].

9.1 Culture sur surfaces à terminaison CH₃

9.1.1 Observation des cellules et quantification de la croissance axonale

Adhésion des cellules

Comme nous le verrons plus en détails au cours de la [2^{ème} section](#) de ce chapitre, les cellules PC12 cultivées sur du verre propre démontrent une faible propension à adhérer au substrat. Après une période initiale, suivant l'ensemencement, où les cellules semblent adhérer tant bien que mal, elles tendent à se détacher, et au bout de 48 h de culture, un certain nombre d'entre elles, et plus spécialement les cellules isolées, sont observées dérivant au voisinage de la surface. Autrement dit, les cellules ont une affinité plutôt faible avec les surfaces de silice pure. Sur ce substrat, les

cellules semblent mieux adhérer lorsqu'elles sont organisées en amas, suggérant que l'agrégation à d'autres cellules leur fournit un substrat d'adhésion plus adapté. Sur des surfaces de classe 1, très ordonnées, et composées de terminaisons CH_3 , les cellules PC12 n'adhèrent pas du tout, et des agrégats de cellules, *a priori* mortes, sont observés flottant au-dessus de la surface (figure 9.1). Ces résultats indiquent la faible affinité des cellules PC12 pour les surfaces exclusivement composées, soit de groupes OH (verre propre), soit de groupes CH_3 (surfaces de classe 1).

Au contraire, lorsque les cellules sont cultivées sur des surfaces de classe 2 ou 3, les cellules adhèrent. Par conséquent, il apparaît que l'adhésion est favorisée dès lors qu'un désordre, si faible soit-il, fait irruption dans l'arrangement surfacique des groupes CH_3 . Il est hautement probable que ce désordre soit corrélé à l'émergence en surface de groupes OH devenant accessibles aux cellules. La surface ferait alors état de gradients locaux dans les énergies d'adhésion, promouvant l'adhésion, et rejoignant ainsi les conclusions du chapitre 8.

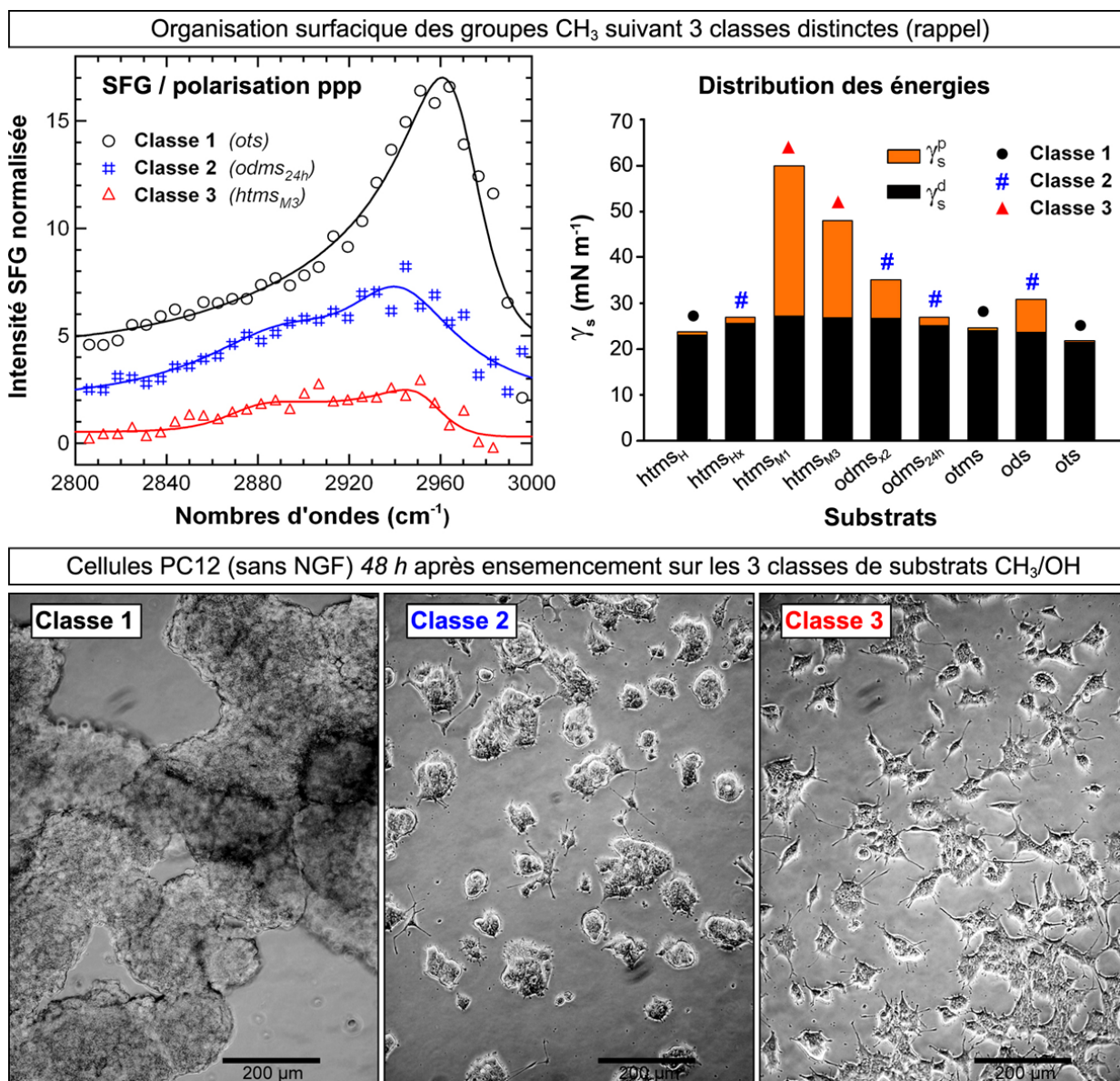


FIGURE 9.1: Corrélation entre ordre surfacique (spectre SFG), distribution des composantes γ^p et γ^d des énergies de surface, et adhésion et différenciation des cellules PC12. Les graphiques présentés au sujet des analyses de surfaces ne sont que de brefs rappels. La SFG permet de distinguer la classe 1 des classes 2 et 3, et ces dernières se distinguent par des distributions distinctes de la composante polaire γ^d de l'énergie de surface. Pour plus de détails, se reporter aux analyses effectuées au chapitre 4.

Propension des cellules à initier des neurites

Les surfaces de classe 2 et 3 possèdent toutes deux la faculté de permettre l'adhésion des cellules PC12. Cependant, ces dernières génèrent un nombre de neurites plus important (figure 9.1 et 9.2) sur les surfaces de classe 3 ($\# > 50 \text{ mm}^{-2}$), que sur les surfaces de classe 2 ($\# < 20 \text{ mm}^{-2}$) ou de classe 1' (i.e. surfaces incomplètes d'alkylsiloxanes, assemblées de façon analogue aux surfaces de classe 1, mais partageant les propriétés des surfaces de classe 2; cf. chapitre 4, page 80). En ce qui concerne les surfaces de classe 1 : ots, otms et htms_H, elles ne permettent pas aux cellules d'adhérer. De ce fait, aucune neurite n'a pu être comptabilisée.

L'ensemble de ces observations et mesures permet de conclure que plus la surface est hétérogène d'un point de vue chimique, plus les cellules génèrent des neurites. Ces résultats sont en complet accord avec ceux du chapitre 8, et confirment que c'est la présence, à l'échelle submicrométrique, de gradients locaux dans les énergies d'adhésion, qui est à l'origine de la neuritogénèse. En effet, même si les cellules génèrent des neurites sur les surfaces de classe 2, qui présentent ce type de gradients, elles le font de façon moins prononcée que sur les surfaces de classe 3, plus hétérogènes. Au final, c'est la répulsion des cellules pour les surfaces purement composées de groupes CH_3 (de classe 1) qui les empêchent d'adhérer. Sur une surface composée de terminaisons NH_2 , de classe 1 également, mais plus favorable à l'adhésion d'un point de vue strictement chimique, les cellules adhèrent sans pour autant se différencier (cf. figure 8.1).

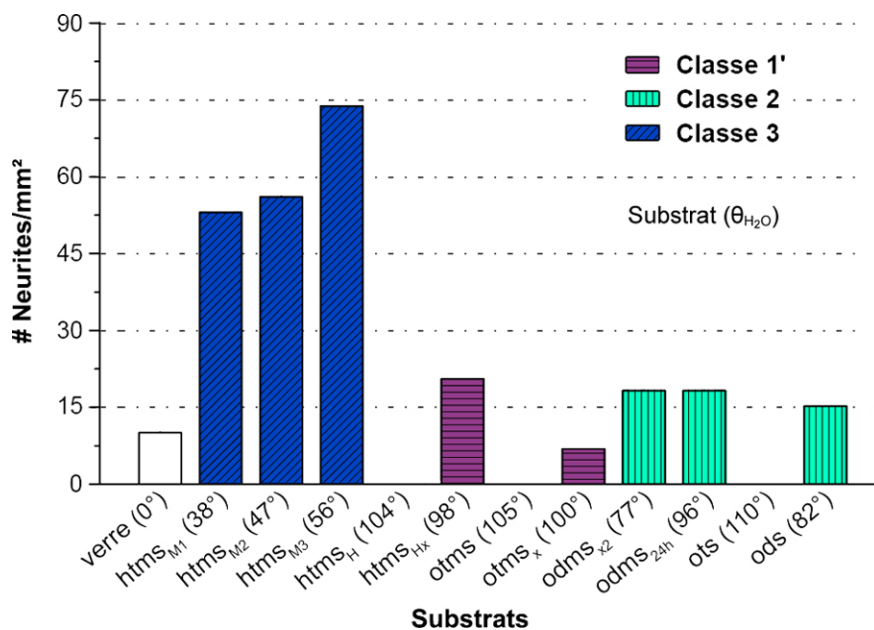


FIGURE 9.2: Propension des cellules à initier des neurites suivant la classe de surface (1, 1', 2 ou 3). Les valeurs indiquées sont tirées d'une expérience significative d'au moins trois expériences indépendantes.

9.1.2 Identification du paramètre critique

Outre les informations dévoilées précédemment, les résultats indiquent que les cellules PC12 ne sont pas hautement sensibles à la nanorugosité générée par certains des substrats. La propension des cellules à adhérer ou à initier des neurites est similaire pour l'ots ($\text{rms} \approx 0,3 \text{ nm}$) et l'htms_H ($\text{rms} \approx 1,4 \text{ nm}$). Elle est également similaire en ce qui concerne l'htms_{M1} ($\text{rms} \approx 0,9 \text{ nm}$) et l'htms_{M3} ($\text{rms} \approx 0,3 \text{ nm}$). Une explication potentielle de ce résultat, qui semble contredire la littérature [23–25] est de considérer que la nanorugosité des substrats fabriqués est ici trop faible pour influencer de façon critique sur l'adhésion et la différenciation des cellules PC12. De plus, ni le degré d'hydrophobicité, ni la concentration surfacique des groupes CH_3 , ne semblent devoir affecter profondément le comportement des cellules. La propension des cellules à adhérer et à

se différencier n'est pas significativement différente lorsqu'elles sont cultivées sur des surfaces de classe 1 telles que l'ots ($\gamma_{\text{H}_2\text{O}} \approx 110^\circ$) ou l'htms_H (104°) ou sur des surfaces de classe 2 telles que l'odms_{x2} (77°) ou l'odms_{24h} (96°), alors que les différences deviennent significatives entre la surface de classe 1 htms_H (104°) et la surface de classe 1' htms_{Hx} (98°), ou entre la surface de classe 2 odms_{x2} (77°) et la surface de classe 3 htms_{M3} (56°).

Logiquement, le paramètre critique, à l'œuvre dans la génération des gradients locaux auxquels les cellules se montrent capables de réagir, semble devoir se résumer aux hétérogénéités chimiques. Autrement dit, à l'alternance des groupes CH₃ et OH à l'échelle nanométrique. Le seul substrat « manquant » qui pourrait encore renforcer cette interprétation est l'odms_{x1} (classe 2'), qui n'a malheureusement pu être testé dans des conditions de culture cellulaire similaires à celles présentées ici. Nous pouvons cependant émettre l'hypothèse que, à la lumière des résultats obtenus jusqu'à présent, les probabilités sont élevées pour que des cellules cultivées sur ce substrat se comportent de la même manière qu'elles le font sur des surfaces de classe 3.

9.1.3 Corrélations entre adhésion et différenciation

Morphologie des cellules et des agrégats cellulaires

Bien que les cellules PC12 adhèrent sur les surfaces de classe 2, modérément désordonnées, elles tendent à se regrouper pour former des colonies (figures 9.1 et 9.3). L'adhésion fournie par ce type de substrat ne semble donc pas optimale, et les interactions cellule-cellule semblent donc favorisées par rapport aux interactions cellule-substrat. Cette observation est typique des cellules PC12 [92], et rejoint également certaines des observations déjà mentionnées au cours du chapitre précédent (figures 8.1 et 8.4). Inversement, sur les substrats très désordonnés de classe 3, les cellules apparaissent plus dispersées sur toute la surface, et les cellules isolées semblent beaucoup plus étalées (figures 9.1 et 9.3). Cela indique une adhésion plus forte pour les surfaces de classe 3 par rapport aux surfaces de classe 2, ainsi qu'une tendance des cellules à montrer des signes de polarisation, qui préfigurent parfois l'extension neuritique chez les cellules PC12 [212, 213]. Ces observations peuvent être corrélées à la tension de surface totale γ_s des surfaces de classe 3 ($\geq 47,9 \text{ mN m}^{-1}$) par rapport à celle des surfaces de classe 2 ($\leq 35 \text{ mN m}^{-1}$), en accord avec la dépendance de l'étalement des agrégats de cellules vis-à-vis de la force d'adhésion du substrat, reportée au cours d'une étude publiée en 2001 par le groupe de STEINBERG [214].

Expression et localisation de MAP1B dans les cellules

La synthèse de MAP1B, marqueur de la différenciation neuronale, est, avec la polymérisation des microtubules, le support de la croissance neuritique. Comme attendu, des intensités de fluorescence particulièrement élevées, reflétant la concentration de MAP1B, sont détectées dans les cellules produisant des neurites et cultivées sur des surfaces de classes 2 et 3 (figures 9.3 et 9.4). Typiquement, ces cellules sont isolées ou situées en périphérie des colonies de cellules, plutôt que piégées à l'intérieur des agrégats. L'adhésion étant plus favorable sur les surfaces de classe 3, un nombre plus important de cellules isolées (figure 9.3, flèches) est repéré sur cette classe de surface, dont l'habilité à promouvoir l'adhésion et la génération de neurites est par suite plus importante que pour les surfaces de classe 2.

La localisation de MAP1B dans les cellules différenciées est similaire, que les cellules soient cultivées sur des surfaces de classe 2 ou de classe 3 (figure 9.4). Comme c'était le cas pour Tau (cf. figure 8.5), MAP1B est majoritairement détectée dans les corps cellulaires. En outre, MAP1B est aussi détectée juste en amont des cônes de croissance (figure 9.4, flèches pleines), ainsi que dans les points de branchements des neurites (figure 9.4, pointes de flèches), c'est-à-dire là où les microtubules sont très dynamiques [215]. Nous en concluons donc une fois encore que les interactions cellule-substrat enclenchent des mécanismes dont l'effet est comparable à celui que peut provoquer le NGF, menant les cellules sur une voie de différenciation.

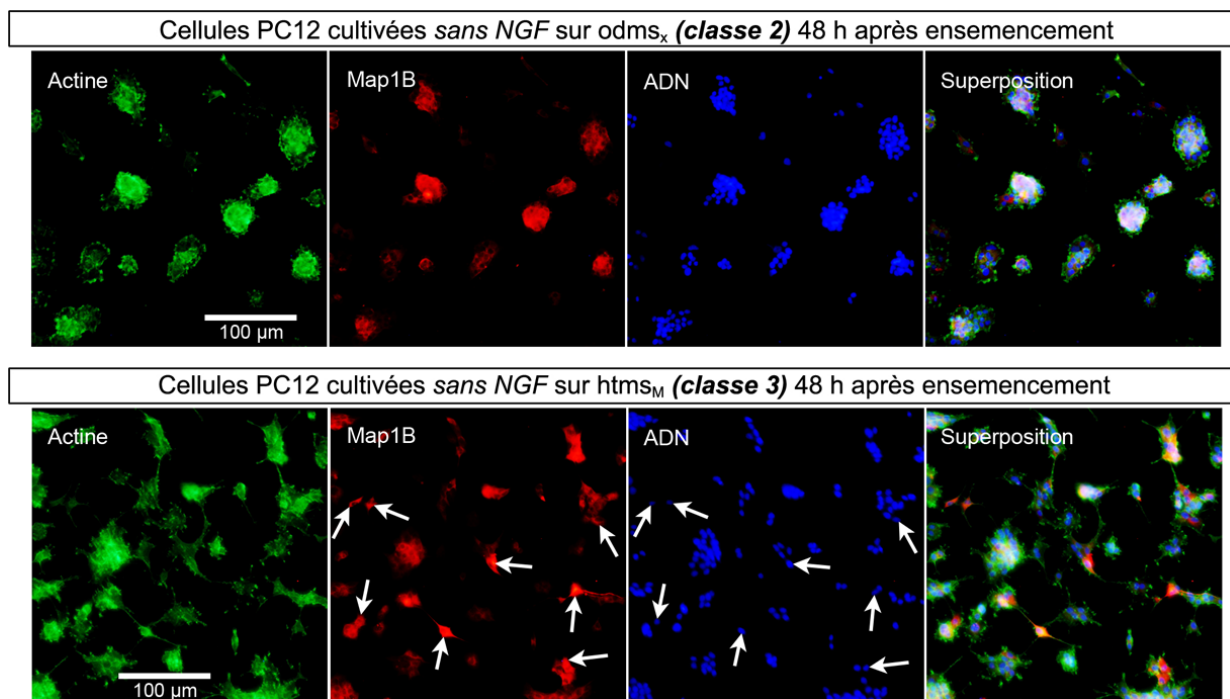


FIGURE 9.3: Expression de MAP1B dans les cellules PC12 cultivées sur des surfaces de classe 2 ou 3. Les flèches indiquent des cellules isolées où des concentrations élevées de MAP1B sont reflétées par des intensités de fluorescence élevées.

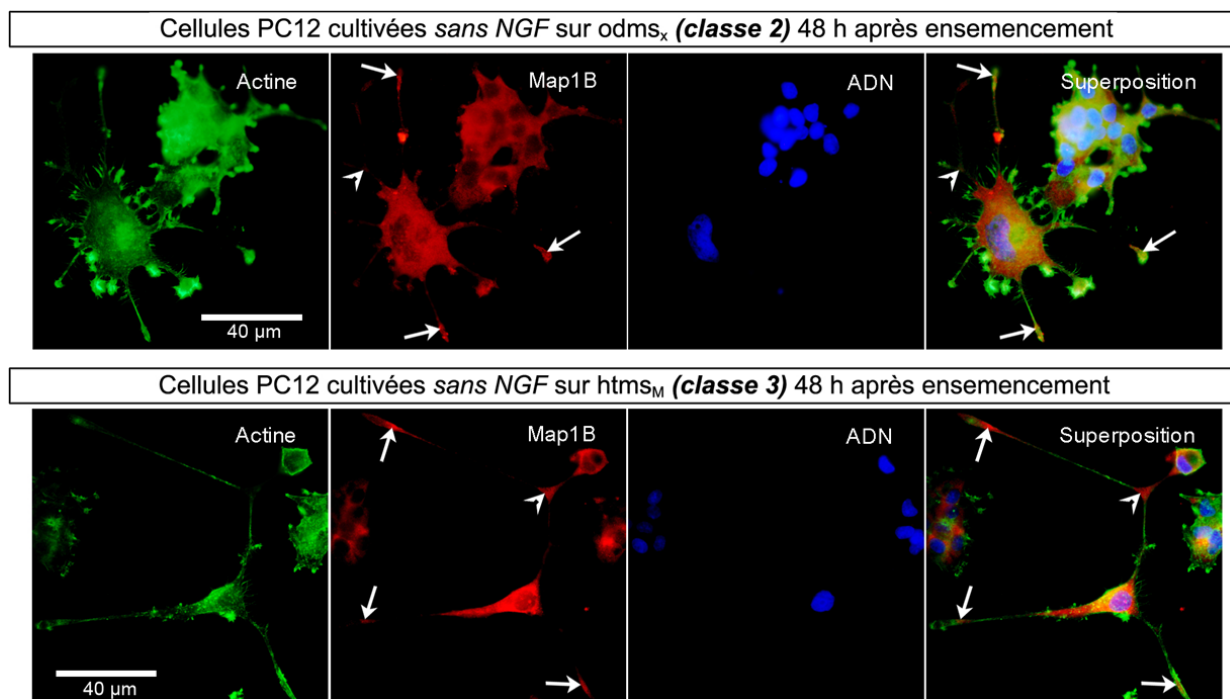


FIGURE 9.4: Localisation de MAP1B dans les cellules évoluant sur des surfaces de classe 2 ou 3. Les flèches indiquent des concentrations élevées de MAP1B au sein des neurites (par opposition au soma) dans les cônes de croissance (flèches pleines) et aux points de branchement (pointes de flèches).

Par ailleurs, il est intéressant de constater que la localisation de MAP1B au niveau des cônes de croissance est légèrement différente de celle que nous observions pour Tau au cours du [chapitre 8](#). En effet, là où Tau apparaissait à l'extrémité des cônes de croissance (cf. [figure 8.5](#)), MAP1B a plutôt tendance à apparaître en amont de ces derniers ([figure 9.4](#), flèches pleines). Cette différence de localisation a probablement à voir avec les particularités respectives des deux protéines vis-à-vis

des fonctions qu'elles remplissent. Tau se situe prioritairement dans les régions en aval du cône, lui permettant, en s'associant aux filaments d'actine [159], de coordonner la croissance des filopodes avec la croissance des microtubules, orientant la polymérisation de la tubuline vis-à-vis de certains de ces filopodes. MAP1B est situé plus en retrait, concentrant vraisemblablement l'essentiel de ses fonctions dans la stabilisation des microtubules néoformés en amont du cône de croissance [198].

Opérons une remarque d'ordre général sur tous ces résultats : alors que dans les expériences précédentes, les cellules mettaient au minimum 4 jours pour générer des neurites pouvant atteindre une longueur de l'ordre de 100 μm (cf. chapitre 8), elles n'ont ici besoin que de seulement 48 h. Outre le non-changement de milieu, éliminant ainsi un facteur potentiel de déstabilisation, rappelons que le volume de milieu utilisé lors de l'ensemencement des cellules est minime ($V \approx 335 \mu\text{l}$, contre $V \approx 2 \text{ ml}$ pour les expériences précédentes). En émettant l'hypothèse que les cellules pourraient réagir aux gradients locaux d'énergie de surface en sécrétant des facteurs neurotrophiques, leur concentration dans l'environnement immédiat des cellules deviendrait plus élevée dans ces conditions expérimentales. Des concentrations plus élevées de facteurs neurotrophiques, tel que le NGF, faciliteraient l'activation de voies de signalisation menant à la génération de neurites.

9.2 Culture sur surfaces à terminaison NH_2

Les expériences de culture cellulaire décrites ci-avant ont été reproduites dans les mêmes conditions, en utilisant cette fois les cinq types de substrats silanisés à terminaison NH_2 , à savoir : adms (classe 2), eda et peda (classe 3), aptms (classe 3', i.e. formée suivant une classe 3, mais partageant les propriétés des surfaces de classe 2), et deta. Pour plus de clarté, nous assimilerons la classe 3' à la classe 2. Le deta, formé comme une classe 3, mais que les analyses ne permettent pas de ranger définitivement dans la classe 2 ou dans la classe 3 (cf. chapitre 5), constitue un cas particulier. Ces expériences doivent nous permettre, non seulement de confirmer les résultats obtenus précédemment, mais aussi de lever indirectement le voile sur les propriétés de surface générées par la chimisorption du DETA sur du verre propre.

9.2.1 Observation et quantification de la croissance axonale suivant les surfaces

Cas des substrats préalablement identifiés comme étant de classe 2 ou 3

Après 24 h de culture, les cellules PC12 démontrent une excellente capacité à s'étaler sur les substrats eda et peda (figure 9.5). Nombre d'entre elles se polarisent et initient des neurites. Tant la densité des cellules que leur allure générale présentent une forte ressemblance avec celles des cellules observées sur les substrats htms_M après 48 h de culture. Nous en concluons donc que les surfaces de classe 3 fabriquées à partir d'aminosilanes sont plus favorables à l'adhésion des cellules que celles élaborées à partir de méthylsilanes. Plus généralement, on constate la plus forte affinité des cellules pour le groupe NH_2 par rapport au groupe CH_3 . L'analogie des observations effectuées pour les cellules en culture sur eda et sur peda correspond à la similarité de leurs propriétés de surface. Elles exhibent un γ_c relativement élevé par rapport aux autres substrats, ainsi qu'une distribution similaire des γ^d et γ^p (figure 9.6). Ces similarités se retrouvent dans l'analyse quantitative du nombre de neurites déployées par les cellules par unité de surface (figure 9.7). Après 24 h de culture, cette densité D est d'environ 45 mm^{-2} pour l'eda, et d'environ 55 mm^{-2} pour le peda. Nous pouvons mettre ces valeurs en parallèle avec celles concernant les surfaces htms_M après 48 h de culture ($50 \text{ mm}^{-2} \leq D \leq 75 \text{ mm}^{-2}$; cf. figure 9.2).

Contrairement aux surfaces du peda ou de l'eda, les surfaces de l'adms et de l'aptms démontrent une faible capacité à permettre un étalement des cellules comparable à celui observé précédemment, et donc à provoquer leur polarisation (figure 9.5). La génération de neurites est également bien moindre, étant proche de 3 mm^{-2} pour l'adms, et d'environ 8 mm^{-2} pour l'aptms (figure 9.7). Ces observations et quantifications sont conformes à la distribution de la tension de surface de ces substrats. En effet, celle-ci est beaucoup plus homogène que celle des surfaces de

classe 3, comme l'indiquent les valeurs relativement faibles de leur γ_c respectifs (figure 9.6). La similarité des distributions des γ^d et γ^p de l'adms et de l'aptms se retrouve également dans la densité comparable de neurites générées par ces deux surfaces.

Néanmoins, et même si les cellules produisent, sur les surfaces de classe 2, un nombre de neurites très inférieur par rapport aux surfaces de classe 3, la différence constatée entre l'adms ($\sim 3 \text{ mm}^{-2}$) et l'aptms ($\sim 8 \text{ mm}^{-2}$) est potentiellement significative d'une différence d'organisation entre les deux surfaces. En effet, l'aptms étant en réalité une surface de classe 3', et pas exactement une surface de classe 2, il est possible de concevoir qu'une partie de la surface, mais une partie seulement, emprunte les propriétés des surfaces de classe 3 plus « classiques » telles l'eda ou le peda. Autrement dit, le processus de polymérisation chaotique que subit le triméthoxysilane APTMS préalablement à sa chimisorption sur le verre propre, aboutirait majoritairement à une structure assimilable à celle des surfaces de classe 2, et partiellement à une structure NH_2/OH proche de celle des surfaces de classe 3. Cela expliquerait que d'une part, les cellules s'étalent moins et développent moins de neurites que sur les surfaces de classe 3, mais qu'elles en initient néanmoins plus qu'une surface strictement apparentée à la classe 2, comme l'est celle fabriquée à partir d'ADMS, monométhoxysilane de son état.

Cas particuliers de la surface de verre propre et du substrat deta

L'observation des images de la figure 9.5 confirme ce que nous écrivions au début de ce chapitre : la surface de verre propre montre une faible propension à stimuler l'adhésion et la neuritogénèse des cellules PC12, bien que sa tension de surface soit sans commune mesure avec celle de tous les substrats fabriqués ($\gamma_c \geq 150 \text{ mN m}^{-1}$). Après 24 h de culture, les cellules ont semble-t-il peu adhéré, comme en témoigne la faible densité cellulaire, apparaissant plus faible encore que celle des cellules sur adms (figure 9.5). En outre, certaines des cellules sont observées flottant juste au-dessus du substrat, donc détachées de ce dernier, et les cellules commencent déjà à s'agréger les unes aux autres (encadré en haut à droite de la figure 9.5). Cette agrégation leur permet de prolonger leur survie sur une surface peu favorable à l'adhésion, et c'est sans doute ce qui explique que des cellules continuent d'être observées durant les jours suivants, le plus souvent sous la forme d'agrégats comparables à ceux que nous observions déjà pour des surfaces de classe 2 à terminaison CH_3 (figure 9.1). Que des cellules arrivent à maintenir leur adhésion au substrat s'explique probablement aussi par l'adsorption au verre propre de protéines contenues dans le milieu de culture, créant l'apparition d'une matrice extracellulaire plus favorable à la survie des cellules que le verre propre, considéré séparément. Il est en effet démontré que le verre propre permet l'adsorption de protéines telles que la BSA ou la fibronectine [209, 210] contenues dans le sérum des milieux de culture. Au bout de 48 h, cette matrice extracellulaire forme selon toute vraisemblance un substrat qui permet aux cellules de produire quelques neurites (figure 9.2).

L'observation des cellules évoluant sur le deta fait état d'une surface ayant des effets similaires à ceux de l'aptms. Globalement, les cellules adhèrent correctement au substrat, et développent des neurites dans des proportions identiques à l'aptms (figures 9.5 et 9.7). Nous avons vu que la classification du deta pose problème : les expériences de mouillage ne permettent pas de trancher entre la classe 2 et la classe 3. Bien qu'il soit difficile d'établir exactement pourquoi, ces expériences semblent toutefois indiquer que la structure du deta emprunte autant des propriétés des surfaces de classe 2 que de classe 3. Le γ_c du deta ($\sim 38 \text{ mN m}^{-1}$) est même plus proche du γ_c des surfaces de classe 3 ($\sim 43 \text{ mN m}^{-1}$) que du γ_c des surfaces de classe 2 ou 3' ($\sim 27 \text{ mN m}^{-1}$). Au final, le comportement des cellules tendrait à nous faire ranger le deta dans les surfaces de classe 2, ou plus précisément de classe 3'. Remarquons le renversement de la démarche conceptuelle, qui consiste ici, non à expliquer la différenciation des cellules par les propriétés de surface des substrats sur lesquels elles sont cultivées, mais à déduire des propriétés de surface, pour lesquelles l'analyse strictement physico-chimique présente quelques difficultés, à travers l'observation de l'évolution du matériel biologique.

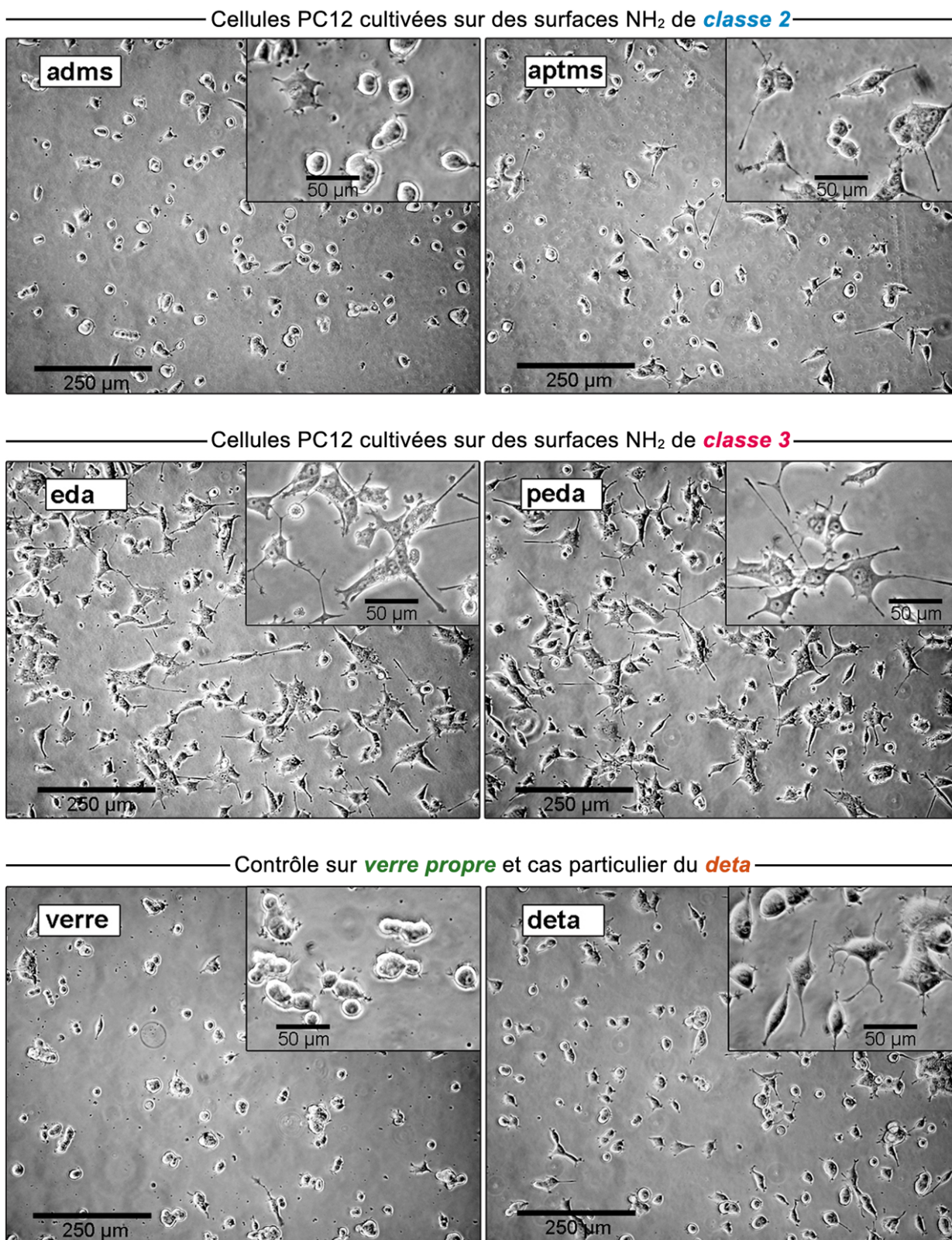


FIGURE 9.5: Photographies des cellules PC12 sur des surfaces NH₂ après 24 h de culture sans NGF. Les cellules adhèrent peu sur le verre propre. Elles adhèrent convenablement sur les surfaces de classe 2, et plus fortement sur les surfaces de classe 3. Dans ce dernier cas, elles génèrent aussi un nombre important de neurites (cf. figure 9.7).

L'analyse du deta indique donc une surface dont la structure semble proche de celle des surfaces de classe 3, là où l'observation des cellules indiquerait plutôt une surface de classe 2. Afin d'expliquer ce phénomène, émettons l'hypothèse suivante : il est possible que la tension de surface du deta présente, tout comme pour l'aptms, des gradients locaux, mais auxquels les cellules

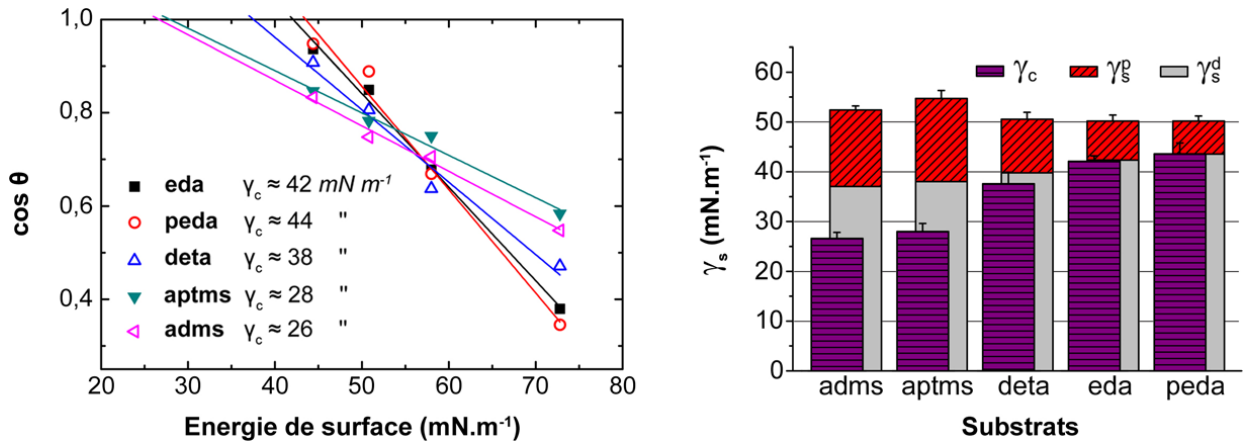


FIGURE 9.6: Rappel des propriétés énergétiques des surfaces silanisées à terminaison NH_2 . γ_c est l'énergie critique de surface, γ_s^p et γ_s^d respectivement les composantes polaires et dispersives de l'énergie de surface des substrats. $\gamma_s = \gamma_s^p + \gamma_s^d$ est l'énergie de surface totale.

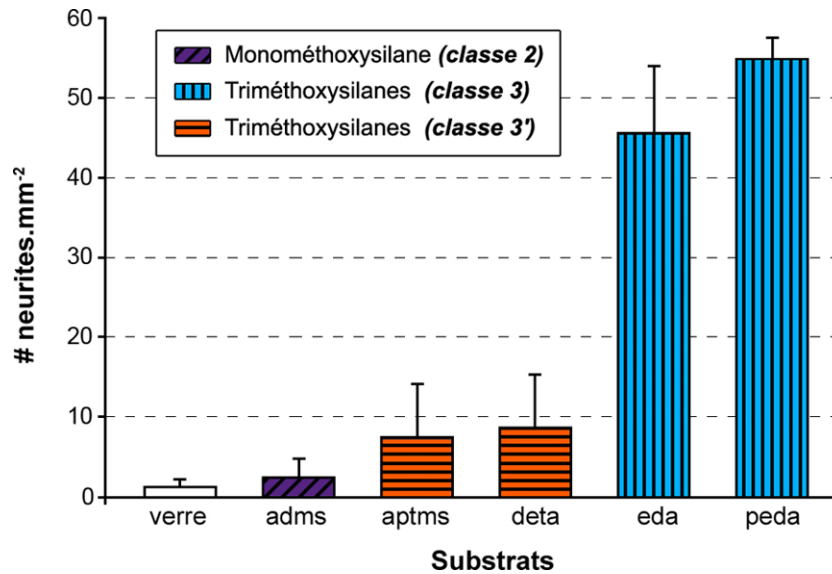


FIGURE 9.7: Propension des cellules PC12 à initier des neurites selon les substrats 24 h après ensemencement (culture sans NGF). Les barres d'erreur indiquent la variabilité des mesures sur trois manipulations indépendantes.

resteraient relativement insensibles. Dans ce cas, se pose la question de savoir pour quelle dimension seuil les gradients deviennent détectables par des cellules. Cette question est particulièrement pertinente dans la mesure où les gradients locaux sont susceptibles d'émerger à la surface dès lors que quelques groupes OH deviennent accessibles aux cellules. Quoiqu'il en soit, les lamellipodes et les filopodes émis par les cellules permettent à ces dernières de sonder la surface sur des échelles d'espace de l'ordre de 100 nm [176, 177], ce qui indique peut-être les distances pour lesquelles les gradients sont détectables et par conséquent intégrés par les cellules d'une façon ou d'une autre. Nous reviendrons sur cet aspect au cours de la section 9.3 (pages 161–164).

9.2.2 Cinétique de la croissance axonale sur eda

Les mesures décrites ci-après ont été effectuées au cours d'une expérience unique. Celle-ci reflète néanmoins correctement les observations que nous avons pu faire au cours de nombreuses expériences similaires. Cette précision est nécessaire dans la mesure où les barres d'erreurs présentées ne représentent pas une variabilité sur plusieurs expériences indépendantes, mais sur toutes les mesures effectuées au cours de cette expérience.

Observation aux temps courts (≤ 20 h)

Les résultats indiquent que les cellules cultivées sur eda émettent des neurites dont la longueur peut s'élever jusqu'aux environs de 70 μm , une vingtaine d'heures après l'ensemencement sur le substrat (figure 9.8). Cette valeur de 70 μm est difficilement comparable avec les données de la littérature, étant donné que celles-ci proviennent de surfaces très variées, différentes de celle utilisée ici, et que les cellules sont différenciées et stimulées par l'apport externe de NGF. Il est cependant possible, à titre indicatif de regarder si au moins les ordres de grandeur correspondent. Pour des expériences de croissance axonale sur poly-L-ornithine et sur palladium, LETOURNEAU obtient des valeurs moyennes qui vont de 148 à 158 μm après 24 h de traitement par le NGF [5, 6].

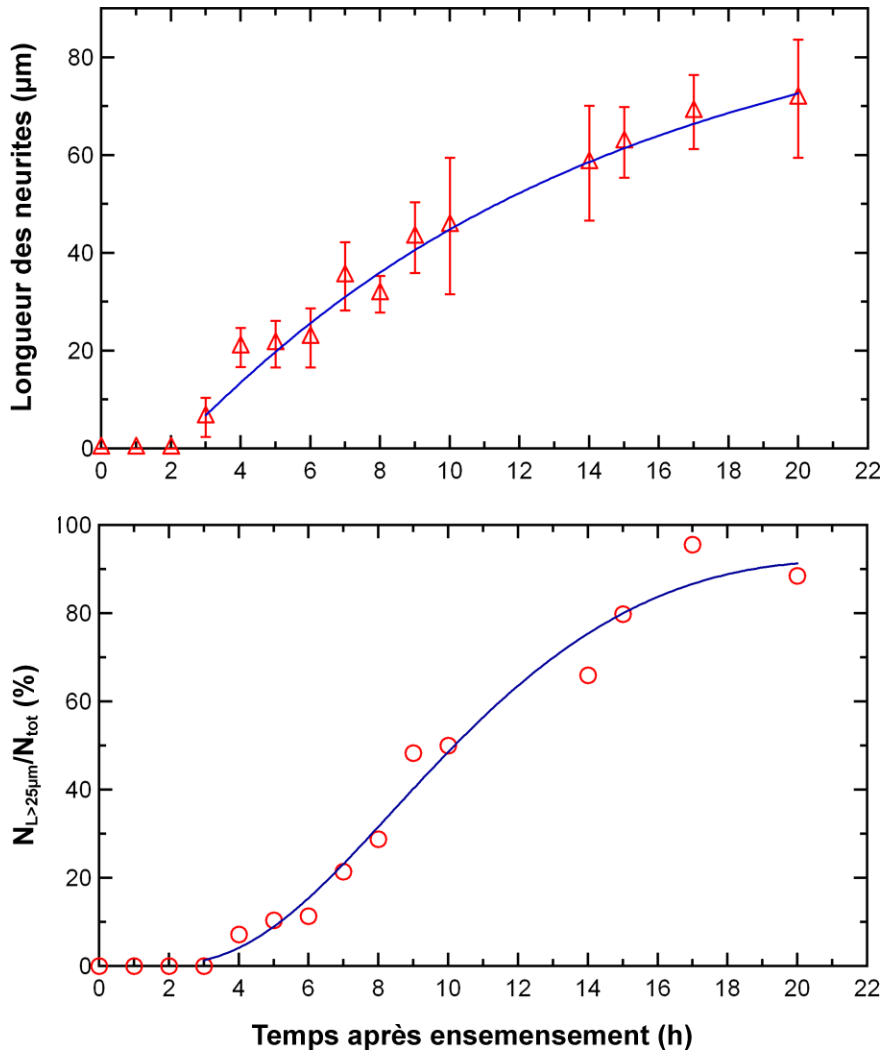


FIGURE 9.8: Cinétique de la croissance axonale des cellules PC12 sur eda (sans NGF). La vitesse de croissance neuritique est estimée à ~ 80 $\mu\text{m}/\text{jour}$, soit $\sim 3,3$ $\mu\text{m}/\text{h}$. Le graphique du bas indique le nombre de neurites mesurées ayant une longueur $l > 25$ μm par rapport au nombre total de neurites mesurées. Les lignes bleues sont des « guides pour les yeux ».

Rappel : la longueur des neurites fait état de moyennes réalisées sur les dix plus grandes valeurs mesurées (cf. page 135). Le nombre de neurites mesurées ayant une longueur supérieure à 25 μm (par rapport à toutes les neurites mesurées) fournit une information quantitative sur la croissance vis-à-vis de l'ensemble des neurites mesurées (ici : $\bar{N} \approx 65 \pm 35$ pour chaque heure). Grossièrement, ce nombre augmente linéairement jusqu'à la 10^{ème} heure, se stabilisant ensuite aux alentours de la centaine de neurites. Bien sûr, ce chiffre est à mettre en rapport avec le nombre de photographies prises, et ne reflète en aucun cas la densité de cellules produisant des neurites, ou encore le nombre de neurites comptées par unité de surface (pour cela, voir la figure 9.7).

Les mesures effectuées indiquent une croissance au cours du temps qui semble suivre une variation logarithmique (figure 9.6, voir la ligne bleue tracée manuellement ; cette ligne ne provient d’aucun modèle). L’adhésion au substrat se produit dans l’heure suivant le dépôt de cellules. Après la stabilisation de l’adhésion, et le développement des interactions cellule-substrat, les premières neurites sont initiées aux alentours de la 3^{ème} heure de culture. S’ensuit une croissance relativement rapide de type linéaire, puis la vitesse d’expansion semble ralentir dès lors que la neurite atteint une longueur comprise entre 40 et 60 μm . Même si les neurites semblent encore croître à la fin des mesures ($t = 20$ h), il apparaît vraisemblable que leur longueur se stabilise aux alentours d’une valeur asymptotique proche de 80 μm .

Modélisation de la différenciation et de la croissance axonale

La modélisation mathématique offre une perspective originale sur l’étude de la différenciation des cellules neuronales et de la croissance neuritique qui s’ensuit [216]. Du point de vue de la modélisation, se pose, par exemple, le problème de savoir comment des neurites peuvent se former à partir d’une cellule qui est à l’origine conçue comme une « sphère ». Certains auteurs ont ainsi étudié l’hypothèse selon laquelle l’initiation de neurites pourrait être établie par un mécanisme de rétrocontrôle positif, déclenché par des petites hétérogénéités qui se formeraient spontanément à la surface de la cellule [217–219]. Dans ce modèle, le calcium et le sodium tiendraient un rôle essentiel. En effet, dans un modèle de membrane excitable, les potentiels membranaires locaux sont modulés par des influx de sodium au travers de canaux ioniques, et le calcium traverse aussi les membranes suivant le même processus. De petites hétérogénéités surfaciques produisent des dépolarisations focales qui conduisent à une élévation locale de la pénétration de calcium et de sodium, entraînant l’initiation de la neurite. Des gradients de concentration en sodium et en calcium, ainsi que des gradients de charge, sont établis entre la base et l’extrémité de la neurite, en accord avec les données expérimentales, selon les auteurs du modèle.

Nous voyons donc bien l’intérêt que représente ce modèle vis-à-vis de l’interprétation de nos résultats, qui indiquent l’influence de gradients des énergies de surface des substrats sur l’initiation de neurites. Il serait ainsi envisageable de considérer que ces gradients pourraient, à l’échelle locale, stimuler l’apparition d’hétérogénéités à la surface de la cellule, et déclencher par le biais de l’activité calcique et sodique le rétrocontrôle positif évoqué ci-dessus.

D’autres théoriciens s’attachent à explorer, non pas comment s’effectue l’initiation des neurites, mais simplement comment elles s’étendent. Le problème consiste ici à mettre en relation les contraintes biophysiques qui s’exercent sur les neurites avec la longueur qu’elles sont susceptibles d’atteindre. Ce travail s’est concentré autour de la dynamique de construction du cytosquelette [220, 221], principalement basée sur l’assemblage des microtubules, comme nous avons pu le constater à maintes reprises. L’élongation est assumée comme étant une fonction de la quantité de tubuline libre située au niveau du cône de croissance, zone où s’assemblent les microtubules, permettant ainsi l’élongation du cytosquelette interne. Les contraintes exercées sur la croissance neuritique seraient le taux de production de la tubuline, et son transport du site de production (en général le soma de la cellule) jusqu’à l’extrémité de la neurite, par un couplage de phénomènes de diffusion et de transport actif. Un exemple de ce modèle et une illustration de ses paramètres sont fournies à la figure 9.9 [222]. Dans ce modèle, l’équation gouvernant la longueur neuritique en fonction de la concentration en tubuline $c(x, t)$ au point x et au temps t est :

$$\frac{\partial c}{\partial t} + a \frac{\partial c}{\partial x} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} - gc \quad (9.1)$$

où D est le coefficient de diffusion, a représente le transport actif, et g le taux de dégradation de la tubuline. Si bien que la neurite en extension est définie sur le domaine :

$$\Omega_{xt} := \{(x, t) : x \in [0, l], t \geq 0\} \quad (9.2)$$

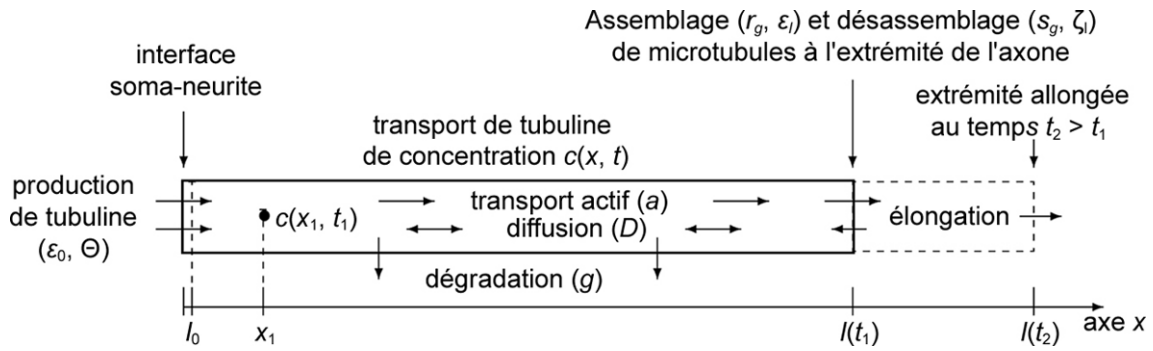


FIGURE 9.9: Diagramme schématisant les composants du modèle d'élongation neuritique et les notations mathématiques utilisées (adapté de la Réf. [222]). Voir le texte pour la définition des différents termes mathématiques employés.

où l'interface soma-neurite est positionnée en $x = 0$, et $x = l$ est l'extension maximale de la croissance neuritique au temps t . En $x = l$, il existe un flux de tubuline, à travers cette limite, due à l'assemblage de microtubules qui, au final, résulte dans l'élongation de la neurite. De sorte que l est une fonction du temps t définie par l'équation différentielle :

$$\frac{\partial l}{\partial t} = r_g c|_{x=l} - s_g, \quad l(0) = l_0. \quad (9.3)$$

Dans cette équation, r_g et s_g sont respectivement les taux d'assemblage et de désassemblage des microtubules. Le modèle admet que l'extension initiale de la neurite l_0 est faible comparée à $l(t)$ pour un temps $t > 0$ suffisamment grand.

Dans la figure 9.9, le taux de production de tubuline est représenté par $\epsilon_0 > 0$, $\Theta > 0$ est le gain d'autorégulation, et ζ_l et ϵ_l sont respectivement le flux de retour et le taux de chute (tous deux dus au désassemblage des microtubules). Nous ne montrerons pas la suite de ce raisonnement, le but n'étant pas ici de recopier des articles, mais simplement d'évoquer l'existence de ces modèles et d'illustrer leur apport dans l'interprétation des résultats ainsi que dans la proposition de mécanismes (pour plus de détails, se reporter à la référence [222]). La variation des concentrations de tubuline libre, dans le soma ou dans le cône de croissance, implique différentes solutions aux équations que nous venons d'évoquer (il en existe beaucoup d'autres). Ces différentes solutions se traduisent par différents régimes de croissance neuritique. Par exemple, soit de type exponentiel, soit de type logarithmique. Si nous faisons le parallèle avec la courbe exposée à la figure 9.8, il est donc théoriquement possible, à partir de l'allure de cette courbe, d'identifier le régime de croissance correspondant, puis au final de remonter à des estimations des concentrations en tubuline au niveau du soma, du cône de croissance, et tout au long de la neurite. C'est une des voies sur lesquelles pourrait s'orienter la suite de ce travail.

En outre, nous pouvons imaginer, à terme, établir une corrélation entre le régime de croissance neuritique observé et le potentiel énergétique des surfaces, que nous mesurerions suivant les procédés déjà décrits (Zisman plots par exemple). Une expérience possible consisterait à cultiver des cellules PC12 sur des surfaces NH_2 de classe 2 et 3, avec ou sans NGF, et de mesurer la croissance neuritique de façon à obtenir des courbes telles que celle présentée à la figure 9.8. Ensuite, nous pourrions identifier des régimes de croissance éventuellement différents suivant les surfaces, puis tenter de les corrélérer avec l'énergie critique γ_c des surfaces considérées, suivant des paramètres à définir, et des équations à établir.

Cependant, plutôt que d'énergie critique, nous avons vu que ce sont plutôt des hétérogénéités de surface qui enclenchent la neuritogénèse des cellules PC12. Les mécanismes cellulaires de détection de ces hétérogénéités ne sont pas identifiés. Par contre, la cellule dispose de moyens de détection, tels que les filopodes, identifiés il y a près de vingt ans comme vecteurs de transduction de signaux provenant de la matrice extracellulaire [223]. Nous allons donc examiner les filopodes de nos cellules et discuter de leurs éventuelles fonctions.

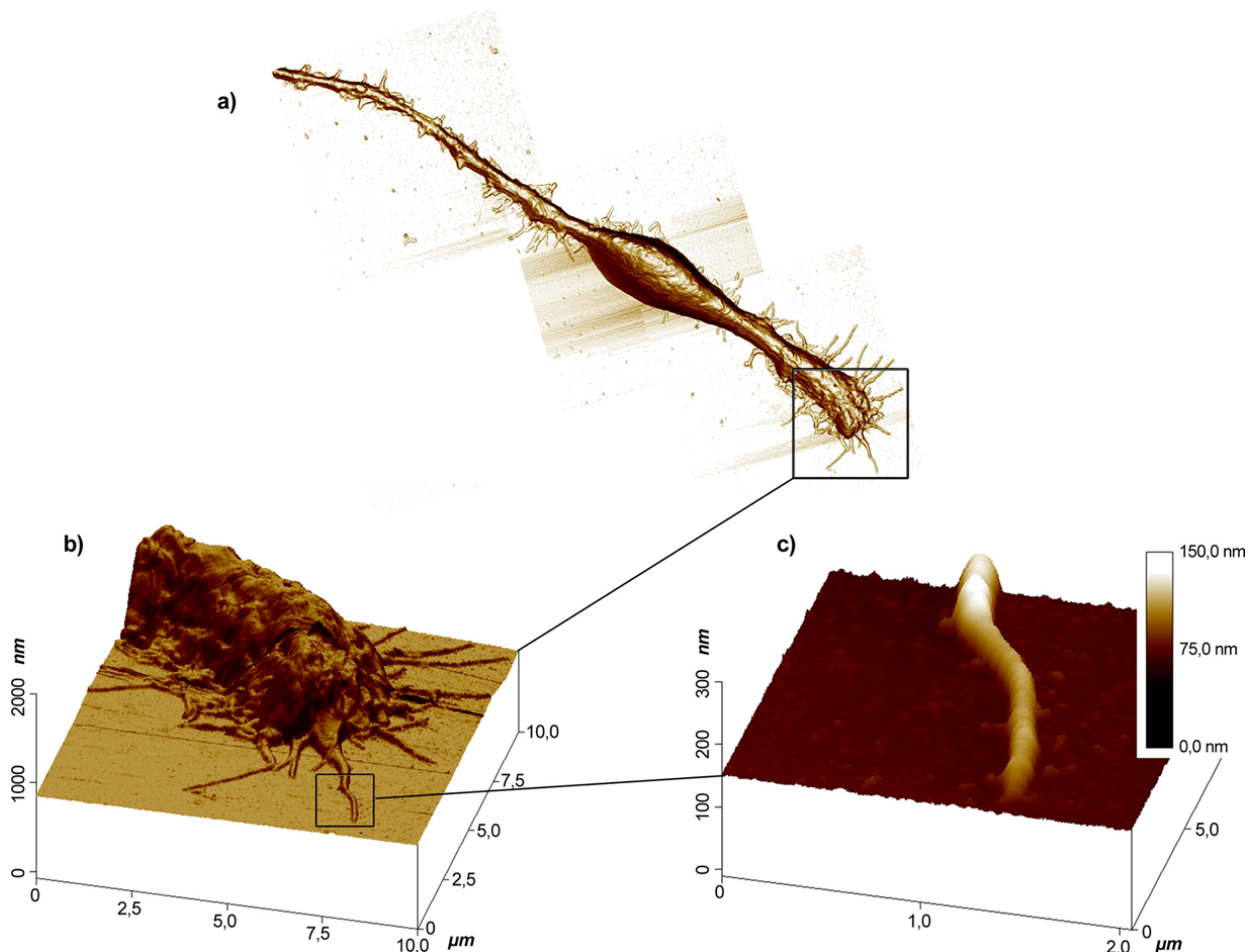


FIGURE 9.11: Imagerie AFM d'une neurite fixée sur eda'. Les trois images sont des zooms successifs opérés tour-à-tour sur un cône de croissance, puis sur un filopode.

A l'aide du logiciel d'analyse dont l'AFM est équipé (Veeco Nanoscope), nous constatons que les filopodes imagés ont des largeurs généralement comprises entre 150 et 250 nm. Ces dimensions rejoignent celles décrites par ailleurs [176, 177]. Ces valeurs sont du même ordre que celles que nous mesurons pour les agrégats d'aminosilanes (figure 9.12), les surfaces des substrats n'étant pas sujettes à un greffage optimal (cf. figure 5.12). Cela indique peut-être la distance pour laquelle les gradients locaux présents en surface deviennent détectables par les cellules.

En outre, les filopodes ont une hauteur sur la surface d'environ 30–50 nm (valeurs mesurées sur une dizaine de filopodes, provenant d'échantillons de surface différents), ce qui réduit les distances surfaciques éventuellement détectables par le filopode, d'autant plus qu'*in vivo*, le filopode évolue dans un milieu à trois dimensions. Sachant que les cellules émettent des filopodes sitôt les premiers liens avec la surface créés lors de l'adhésion (cf. figure 7.6), il est possible que les gradients locaux soient rapidement traduits en signal de différenciation par le biais du filopode et de sa mobilité.

Par ailleurs, si nous regardons le filopode imagé à la figure 9.12, nous distinguons des sortes de rainures transverses : une rainure assez nette semble parcourir tout le filopode dans le sens de la longueur, et de multiples rainures d'apparence plus diffuse semblent traverser le filopode dans le sens de la largeur. Ces dernières apparaissent à intervalles relativement réguliers, espacés d'environ une centaine de nanomètres. Dans les deux cas, ces marques ne peuvent être dues au passage de la pointe de l'AFM. Si c'était le cas, elles seraient orientées selon une direction parallèle ou perpendiculaire par rapport aux côtés du carré que constitue l'image. S'il est difficile d'établir une hypothèse quant à la rainure longitudinale, les rainures transversales constituent peut-être une empreinte de l'ondulation du filopode sur la surface, dont nous allons discuter à présent.

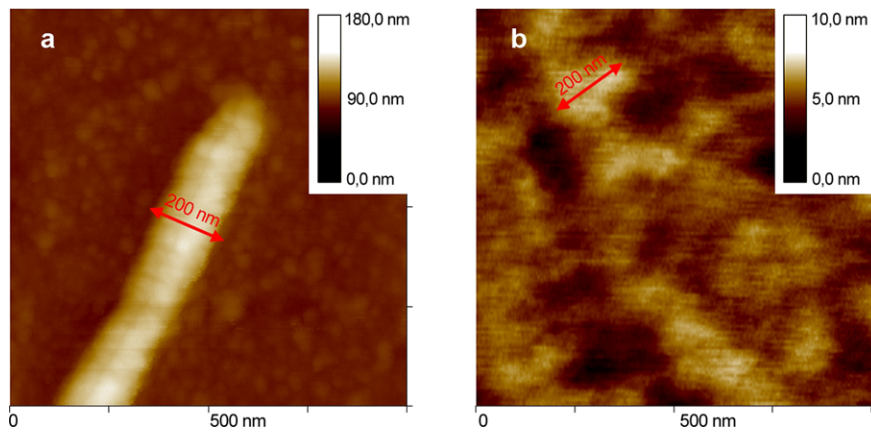


FIGURE 9.12: Analogie dimensionnelle entre la structure de l'eda' et celle d'un filopode (images AFM). La surface de l'eda' présente des agrégats d'EDA (cf. chapitre 5).

9.3.2 Adhésion et mobilité des filopodes

La mesure des dimensions des filopodes indique que ces derniers pourraient être capables d'intégrer des gradients locaux de tension de surface du substrat, dont l'échelle se situe en deçà du micron. Cependant, les mécanismes moléculaires des cascades de signalisation déclenchées ne sont pas clairement identifiés. À vrai dire, le seul élément concret dont nous disposons est l'expression par la cellule de protéines caractéristiques de la différenciation, telles que Tau et MAP1B. Tout le reste ne relève que d'hypothèses. Une de ces hypothèses parmi les plus crédibles est que les cellules PC12 réagiraient aux surfaces en exprimant d'autres types de protéines contribuant à créer un environnement favorable à l'initiation de neurites. Une de ces protéines pourrait être le NGF. Cependant, dans nos conditions expérimentales, le NGF éventuellement sécrété ne serait pas en concentration suffisante pour permettre à la fois la neuritogénèse initiale et la survie à long terme des cellules.

Une autre hypothèse s'appuie sur la modulation des signaux calciques [226] passant au travers des membranes *via* les filopodes [227]. D'après les travaux de GOMEZ et coll. [20], les filopodes peuvent, selon le substrat, générer une élévation temporaire de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , propagée suivant une certaine fréquence de la matrice extracellulaire vers la région-C du cône de croissance. Ce processus participe à la croissance axonale. Il est donc envisageable que les hétérogénéités chimiques présentes en surface déclenchent un signal calcique spécifique *via* l'activité du filopode. Les images interférométriques de cellules respectivement cultivées sur verre/PLO et sur eda' indiquent que les filopodes n'ondulent pas exactement de la même manière sur les deux surfaces (figure 9.13). En effet, la partie des filopodes en contact rapproché avec la surface (apparaissant en noir sur les images) semble s'attacher sur une distance plus longue lorsque les cellules évoluent sur des surfaces de classe 1 (ici, verre/PLO) plutôt que sur des surfaces de classe 3 (ici, eda'). Cette distinction est peut-être corrélée au fait que les surfaces de classe 3 stimulent la différenciation des cellules, contrairement aux surfaces de classe 1. Dans ce cas, l'ondulation du filopode selon la surface pourrait également être corrélée à des signaux calciques spécifiques, et en retour, stimuler ou ne pas stimuler la neuritogénèse.

La traduction des hétérogénéités chimiques du substrat pourrait aussi impliquer l'activité de nombreuses protéines autres que Tau ou MAP1B. Ces protéines pourraient inclure Rac1, les GTPases RhoA et Cdc42, FAK+, les β -intégrines, la paxiline ou encore la vinculine. En réponse à des facteurs de croissance et/ou à des signaux provenant du substrat, ces protéines modulent l'activité des filopodes et/ou des lamellipodes, ainsi que la formation et la stabilisation des points focaux d'adhésion à leurs extrémités [21, 22, 228–231]. Une perspective du présent travail pourrait donc consister à déterminer si ces protéines sont effectivement impliquées dans la traduction des hétérogénéités chimiques du substrat, et si oui mettre en lumière les mécanismes qui leur permettraient d'y répondre de manière adéquate.

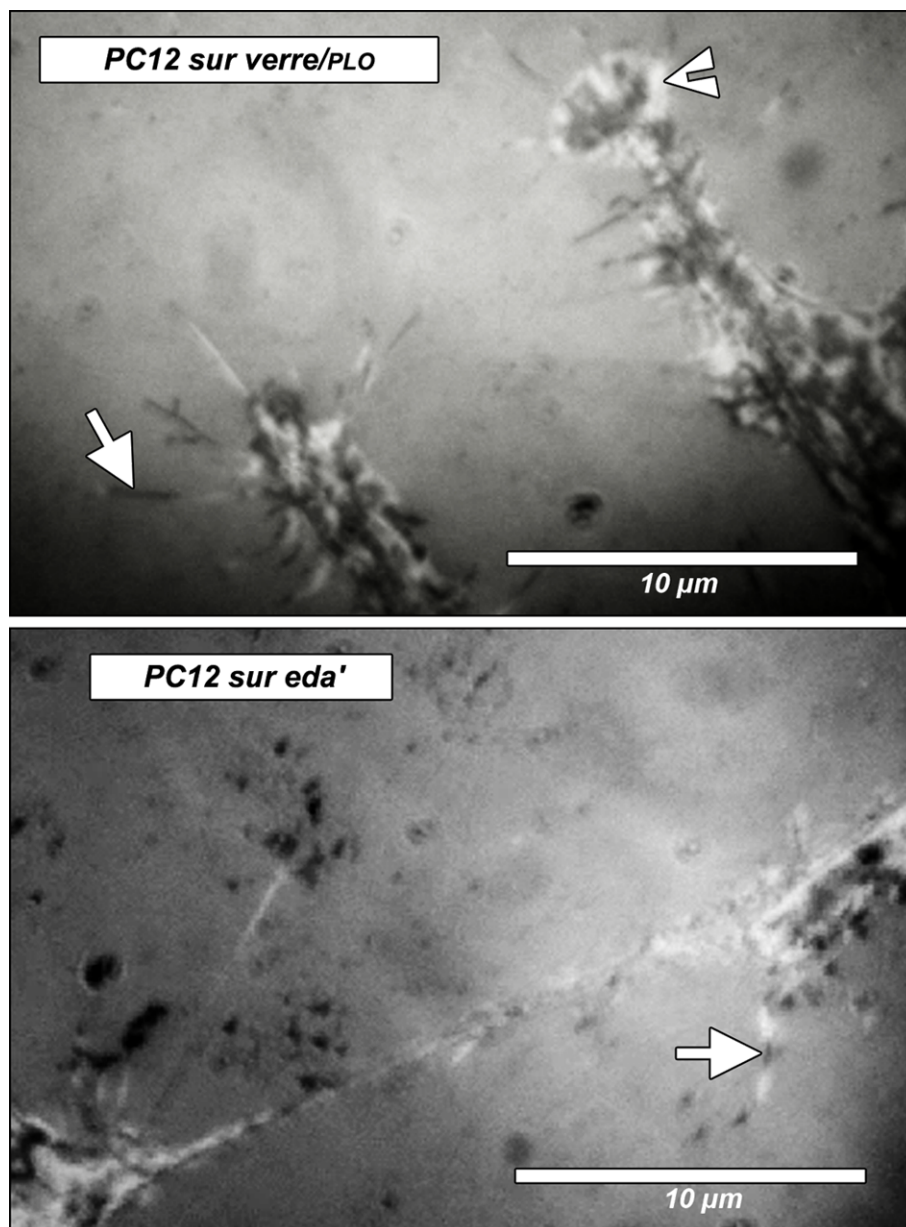


FIGURE 9.13: Adhésion des filopodes sur les surfaces de verre/PLO et d'eda' observée par interférométrie (RICM). Les flèches blanches indiquent des zones de contact rapproché entre les substrats et les filopodes. La pointe de flèche sur l'image du haut indique un lamellipode sur la surface de verre/PLO.

9.3.3 Conclusions

L'analyse des surfaces, présentée au cours de la première partie de cette thèse, nous a permis de classer les substrats élaborés selon leur organisation nanostructurale, et donc selon la distribution des énergies de surface propre à chaque classe de substrat. Cette description précise nous a permis d'identifier le paramètre critique stimulant l'adhésion et la différenciation des cellules PC12. Les différents paramètres de surface passés au crible de nos analyses sont : la nanorugosité, la mouillabilité, l'affinité chimique, la densité des terminaisons des alkylsiloxanes, et les hétérogénéités chimiques aux échelles nanométriques. Parmi tous ces paramètres, nous démontrons que ce sont les hétérogénéités chimiques aux échelles nanométriques qui exercent une influence critique sur la faculté des cellules PC12 à adhérer et à se différencier sur un substrat donné. En outre, les résultats nous permettent de comparer l'évolution des cellules sur des surfaces à terminaison NH_2 par rapport à des surfaces à terminaison CH_3 . Ainsi, on estime le degré d'affinité du groupe NH_2 , pour les cellules, comme environ deux fois supérieur à celui du groupe CH_3 .

La comparaison du comportement des cellules en culture sur les surfaces NH_2 et CH_3 confirme le résultat suivant : l'énergie de surface totale (γ_s) des substrats n'est pas critique en matière de stimulation des cellules à générer des neurites. En effet, bien que l'on constate, pour les surfaces CH_3 , que l'adhésion et la différenciation des cellules sont favorisées sur les surfaces présentant le γ_s le plus élevé, nous observons le résultat inverse en ce qui concerne les surfaces NH_2 . En outre, même si cela semble évident, soulignons qu'une surface composite constituée d'énergies polaires/apolaires (ou non-dispersives/dispersives) ne suffit pas à stimuler la différenciation des cellules. Si c'était le cas, la neuritogénèse serait observée dans les cultures sur les surfaces présentant un tapis homogène de terminaisons NH_2 (groupe possédant les deux types de composantes — dispersive et polaire). Nos résultats s'expliquent donc bien plus par une nanostructuration spécifique de ces composantes énergétiques, et donc de la façon dont elles sont organisées en surface.

Ce chapitre a permis d'entrevoir quelques pistes de réflexion au sujet de la transmission à la cellule des gradients locaux dans les énergies d'adhésion. Ainsi, comme le suggèrent les modèles de différenciation neuronale, il est possible que les hétérogénéités à la surface du substrat se traduisent par des hétérogénéités à la surface de la cellule, ce qui induirait la croissance neuritique par un mécanisme de rétrocontrôle positif, impliquant les ions calcium par exemple. Le rôle éventuel des filopodes dans la détection des gradients locaux a également été abordé. Les expériences développées au cours du chapitre suivant nous permettront d'approfondir les questions précédemment soulevées à ce sujet.

Notons que l'hypothèse de l'autoproduction du NGF par les cellules a été examinée au travers d'une expérience ELISA (« Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay »). Dans cette expérience, nous avons cultivé un nombre relativement élevé de cellules (une dizaine de lamelles) sur des surfaces de *peda*, étant celles qui stimulent le plus la différenciation parmi toutes les surfaces élaborées. Puis nous avons récupéré les milieux de culture, concentré les protéines de l'ordre de dix à vingt fois. Aucune présence de NGF n'a été détectée, bien que le système utilisé soit sensible à des concentrations de l'ordre de 10 pg/ml. Cependant, il est aussi possible que les processus de purification et de concentration des protéines aient éliminé les éventuelles quantités de NGF présentes, sans compter les facteurs de perturbation dus aux protéines sériques, très nombreuses dans les milieux de culture. Les résultats obtenus ne peuvent donc pas être considérés comme significatifs. Signalons toutefois que la neuritogénèse induite par effets de surface a également été obtenue en utilisant des cellules PC12 issues d'une lignée spéciale (cf. chapitre suivant) et dont les expériences ont montré qu'elles demeuraient insensibles au traitement par le NGF. Il est donc peu probable que la différenciation des cellules, dans les expériences présentées ici, résulte de leur faculté potentielle à synthétiser du NGF.

Chapitre 10

Expériences additionnelles

Dans ce dernier chapitre, nous nous proposons de faire état d'expériences qui, si elles n'apportent pas de nouveautés fondamentales, permettent de compléter les informations exposées au cours des deux chapitres qui précèdent. Tout d'abord, nous revenons sur un point développé à la fin du [chapitre 9](#), et tentons d'apporter un éclairage nouveau sur l'implication potentielle du cytosquelette d'actine dans la détection des effets de surface. Pour cela, nous cultivons les cellules PC12 sur une surface induisant la différenciation et nous les traitons par une drogue : la cytochalasine-B (CB), connue pour déstabiliser les filaments d'actine. Ensuite, nous évoquerons des manipulations au cours desquelles la neuritogénèse d'une lignée alternative de PC12 (cellules « PC12 1.1 ») est provoquée par la déprivation en sérum du milieu de culture. Les images AFM des cellules nous permettront de revenir sur la capacité des neurites à générer des filopodes et des lamellipodes. Enfin, la dernière partie du chapitre sera consacrée à l'analyse du comportement des cellules PC12 cultivées sur des surfaces de hautes énergies, composées d'un mélange de verre ($\gamma_c \geq 150 \text{ mN m}^{-1}$) et de nanoplots d'or ($\gamma_c > 700 \text{ mN m}^{-1}$). Cette partie indiquera les perspectives possibles de ce travail en matière de modification de surface.

10.1 Déstabilisation du cytosquelette d'actine par traitement à la cytochalasine-B

L'objectif de cette manipulation consiste à déterminer dans quelle mesure la production de neurites par les cellules est sensible à la présence de filopodes et de lamellipodes. Autrement dit, il s'agit d'étudier si la dynamique des filaments d'actine du cytosquelette joue un rôle dans la détection des gradients locaux d'énergie d'adhésion. La cytochalasine-B est utilisée pour déstabiliser la polymérisation des filaments d'actine [159, 191, 192], et plus précisément, dans le but de bloquer la formation des processus tels que les filopodes et les lamellipodes. Par conséquent, si en inhibant la formation des filopodes et des lamellipodes, nous empêchons les cellules de produire des neurites, nous démontrerions leur implication active dans l'interaction au substrat permettant aux cellules de se différencier.

Les résultats décrits ci-après font tous état d'expériences réalisées en cultivant des cellules PC12 sur des surfaces de *peda*. Ce substrat a été choisi pour sa propension élevée à stimuler la croissance axonale des PC12. En effet, de tous les substrats utilisés, c'est celui qui permet aux cellules d'initier le plus de neurites sans apport de NGF (cf. [figure 9.7](#)). Rappelons que la cytochalasine est ajoutée aux milieux de culture entre 7 et 8 h après le dépôt des cellules sur le substrat, et que les milieux ne sont pas modifiés ensuite (la cytochalasine n'est donc pas renouvelée). Les détails du protocole de la manipulation sont indiqués au [chapitre 7](#) (page 127).

10.1.1 Effets sur la cinétique de croissance axonale

L'allure générale de la croissance des neurites en fonction du temps pour les cellules non-traitées (figure 10.1) est similaire à celle observée pour les expériences réalisées sur *eda* (figure 10.2). Les neurites semblent croître assez rapidement après l'adhésion au substrat, puis la vitesse de développement décroît, si bien que l'allure de la courbe reflète une croissance logarithmique. La longueur maximale des neurites initiées immédiatement après l'adhésion se stabilise aux alentours d'une valeur de 80 μm . Le nombre de neurites mesurées ayant une longueur supérieure à 30 μm (par rapport à toutes les neurites mesurées) augmente jusqu'à 70% 24 h après l'addition de cytochalasine au milieu, indiquant que le processus de production des neurites est continu. Le nombre de neurites initiées par unité de surface se stabilise quant à lui aux alentours de 50 mm^{-2} .

Les cellules traitées à la cytochalasine réagissent différemment suivant sa concentration. Plus elle est élevée, plus l'impact sur la vitesse de croissance et le nombre de neurites initiées est important. Le traitement à 50 μM inhibe complètement et de façon durable le nombre de neurites générées par les cellules. De plus, dans ces conditions, les neurites initiées se rétractent et ne semblent recommencer à se développer, modérément, qu'à partir de la 14^{ème} heure suivant l'addition de cytochalasine au milieu de culture. Les cellules traitées par une concentration de 5 μM subissent l'impact de la déstabilisation des filaments d'actine pendant une période d'environ 3–4 h. Ensuite, la croissance des neurites semble reprendre à une vitesse « normale » de développement. Les cellules traitées par la plus faible concentration utilisée (0,5 μM) ne semblent pas subir son influence, si l'on se fie à la vitesse de croissance neuritique. Cependant, celle-ci est sujette à caution, dans la mesure où seules les valeurs maximales relevées sont prises en compte (cf. page 135), et l'impact de la cytochalasine reste visible au niveau de la courbe représentant le nombre de neurites initiées par unité de surface en fonction du temps.

Étrangement, les cellules traitées à 0,5 μM et 5 μM développent à $t = 32$ h un nombre moyen de neurites initiées par unité de surface supérieur à celui des lamelles de contrôle ($\sim 75 \text{mm}^{-2}$ contre 50mm^{-2}). Pour expliquer ce fait, nous émettons l'hypothèse que l'activité de la cytochalasine, paralysant la polymérisation d'actine pendant les quelques heures suivant son addition, aurait corrélativement bloqué la prolifération des cellules. Cela étant, le nombre de cellules isolées susceptibles de se différencier serait devenu plus élevé que sur les lamelles de contrôle, si bien que le nombre de neurites initiées par unité de surface serait par suite devenu plus élevé. Toutefois, la variabilité des mesures, indiquée par l'amplitude des barres d'erreurs, nous prémunit de tirer des conclusions hâtives à ce sujet. Cette variabilité constatée indiquerait en revanche que les cellules seraient restées d'une façon ou d'une autre sensibles à l'action de la cytochalasine, puisque la variabilité des mesures est bien moindre en ce qui concerne les lamelles de contrôle.

Tout bien considéré, les cellules traitées dans des concentrations de 0,5 μM et 5 μM semblent affectées pendant quelques heures suivant l'addition de la cytochalasine au milieu. Une fois ce « choc » initial passé, elles semblent également récupérer leur aptitude normale à développer des neurites, tant sur le plan de la quantité de neurites produites que sur la vitesse de croissance des neurites. Logiquement, une concentration de 5 μM affecte plus les cellules qu'une concentration de 0,5 μM , dont l'impact n'est cependant pas négligeable, surtout dans les heures suivant le traitement. Ces résultats suggèrent donc que les cellules ont consommé la cytochalasine présente dans les milieux (à 0,5 μM ou à 5 μM), avant de reprendre une activité normale. Voyons à présent si la reprise de cette activité correspond également à une reprise de la formation des filopodes et des lamellipodes et de leur activité.

10.1.2 Stabilité des filaments d'actine suivant la concentration en cytochalasine

Les analyses AFM révèlent que les cellules non-traitées possèdent une moyenne d'environ 9,5 filopodes/CC (CC = cône de croissance), et 100% des CC possèdent un lamellipode (figure 10.2 et tableau 10.1). L'effet du DMSO est relativement négligeable (7,9 filopodes/CC, et 83% des CC

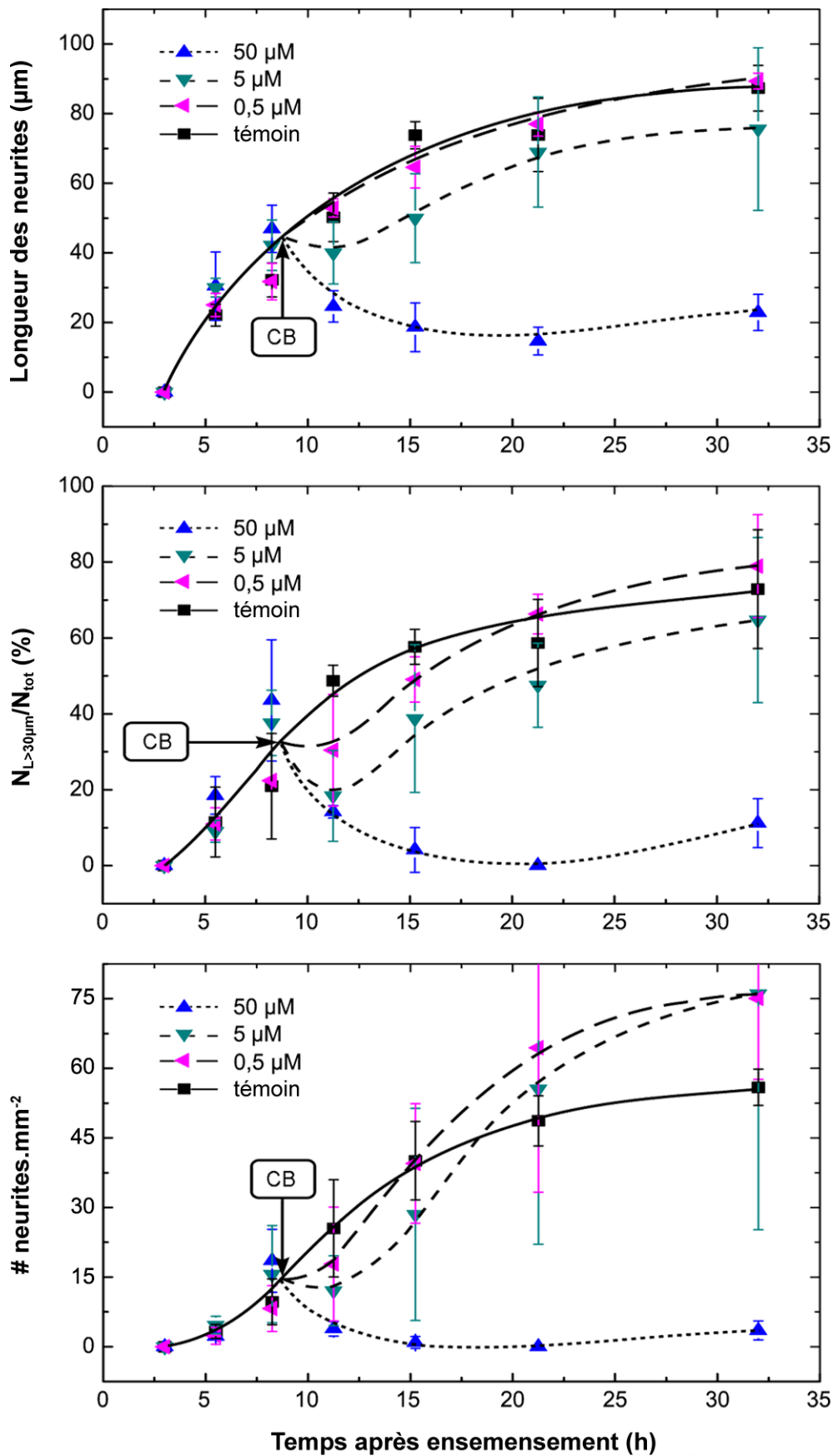


FIGURE 10.1: Influence de la cytochalasine-B sur la cinétique de croissance axonale sur peda. Le graphique du milieu indique le nombre de neurites mesurées ayant une longueur supérieure à 30 μm rapporté au nombre total de neurites mesurées. Les lignes continues ou pointillées sont des guides pour les yeux.

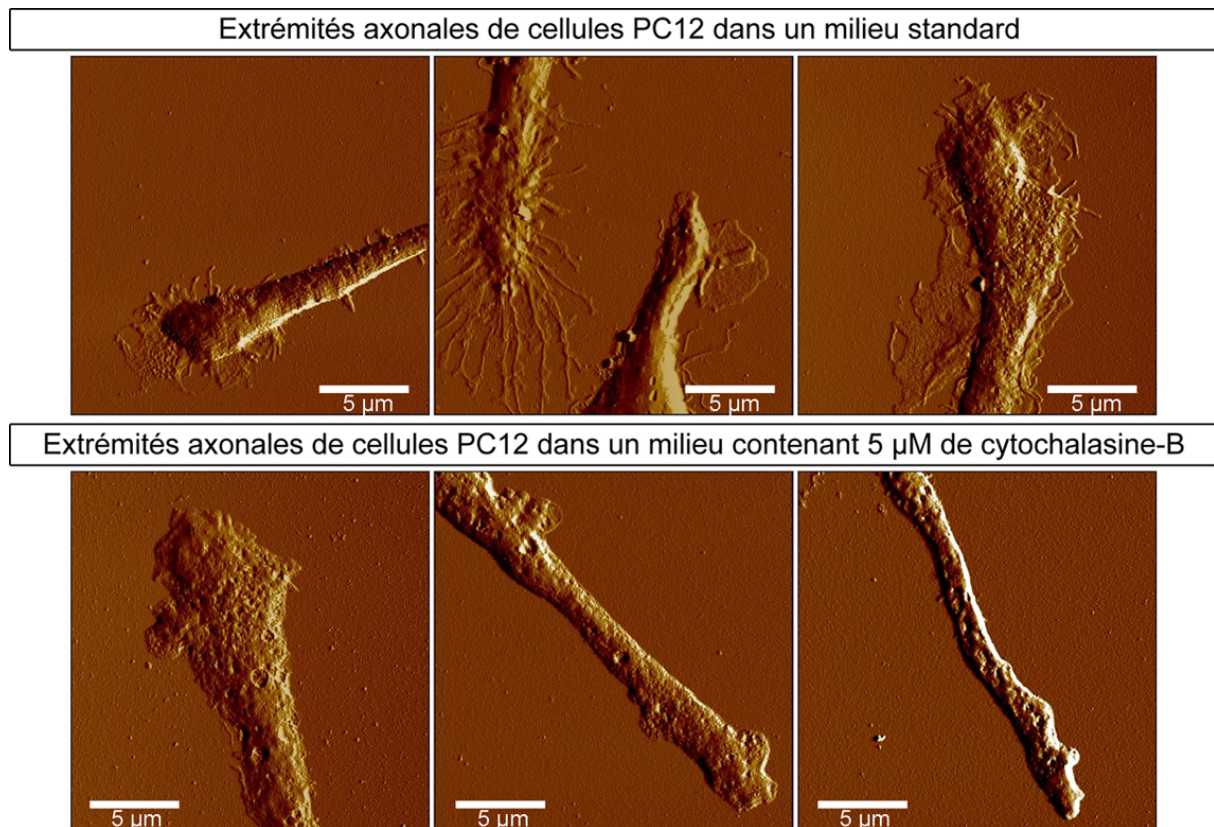


FIGURE 10.2: Influence de la cytochalasine sur la génération de filopodes et/ou de lamellipodes. Les cellules sont imagées par AFM suite à une fixation au glutaraldéhyde intervenue après 32 h de culture sur des surfaces de peda.

possèdent un lamellipode). À l'inverse, les cônes de croissance des neurites évoluant dans les milieux contenant 5 μM de cytochalasine ne possèdent ni filopode ni lamellipode 24 h après addition de la cytochalasine aux milieux. Ce résultat suggère que les neurites préexistants à l'addition de cytochalasine ont continué à croître (figure 10.1) malgré l'absence de filopodes et de lamellipodes, conformément à d'autres observations effectuées par ailleurs [191, 232], indiquant que les neurites ne requerraient pas forcément la présence de filopodes et de lamellipodes pour croître, mais plutôt pour orienter leur croissance dans des directions spécifiques.

De plus, au moins une partie des cellules initient des neurites après avoir subi le traitement, et ce en n'ayant nul besoin ni de filopode ni de lamellipode. En effet, si seules les neurites existantes antérieurement au traitement continuaient de croître, le nombre total de neurites mesurées par unité de surface (sans considération de seuil de longueur) demeurerait constant avant et après l'addition de cytochalasine. Or cette situation ne correspond ni aux observations, ni aux mesures effectuées. Pour prendre un seul exemple, concernant une lamelle unique traitée par une concentration de 5 μM , et qui a fait l'objet des analyses AFM (figure 10.2) ce nombre passe de ~ 17 à ~ 54 neurites mm^{-2} d'immédiatement avant à 24 h après le traitement, soit un rapport d'environ un à trois.

L'effet de la cytochalasine-B sur la formation des filopodes et des lamellipodes est, comme on pouvait s'y attendre, moins prononcé pour les cellules soumises à une concentration de 0,5 μM (en moyenne : $\sim 3,3$ filopodes/CC, et $\sim 67\%$ des CC imagés possèdent un ou des lamellipodes visibles, cf. tableau 10.1). En outre, le cortex d'actine situé sous la membrane des cellules n'apparaît pas déstabilisé par le traitement, comme le laissent supposer les observations en fluorescence des cellules, fixées sur le substrat 24 h après le traitement (figure 10.3, flèches pleines, indiquant des zones stables du cortex d'actine, prises au hasard). Dans les cellules soumises à une concentration de 5 μM , le marquage est discontinu (figure 10.3, pointes de flèches), ce qui suggère que le cortex a été désorganisé. Néanmoins, ce cortex semble globalement préservé, même dans ces conditions.

TABLEAU 10.1: Propension des extrémités axonales des cellules PC12 à générer des filopodes ou des lamellipodes selon la concentration de cytochalasine-B utilisée. Voir l'annexe B pour le détail des résultats échantillon par échantillon.

[CB] (μM)	Contrôle 1*	Contrôle 2†	Test 1	Test 2	Test 3
	0	0	0,5	5	50
# filopodes‡	9,5	7,9	3,3	0,6	0,6
# lamellipodes§ (%)	100	83	67	0	0

* Milieu standard (sans cytochalasine-B).

† Milieu standard contenant du DMSO avec $[\text{DMSO}] = 0,1\%$ (v/v).

‡ Nombre moyen de filopodes générés par extrémité axonale imagée (11 ou 12 pour chaque condition).

§ Ratio d'extrémités axonales ayant des lamellipodes apparents.

Seul le traitement à 50 μM ne semble pas permettre à l'actine de créer des réseaux de polymères favorables au développement des neurites, sans même évoquer la formation de filopode ou de lamellipode. Dans ce cas, la différence est flagrante, tant en matière de croissance neuritique (figure 10.1), qu'en matière de stabilité (ou en l'occurrence, d'instabilité) des filaments d'actine (figure 10.3). Les observations en fluorescence font état de la présence de sortes d'agrégats de filaments d'actine (figure 10.3, triangles), et en aucun cas de la présence d'un quelconque cortex actinique. Cette forte déstabilisation est vraisemblablement à l'origine de la très faible propension des cellules à initier des neurites. En outre, le nombre de cellules adhérentes apparaît, dans ces conditions, considérablement réduit. Cette observation met en lumière le rôle essentiel joué par les réseaux constitués par les filaments d'actine, et plus particulièrement, par le cortex d'actine sous-membranaire, non seulement dans la génération et l'extension de neurites, mais aussi et plus simplement dans l'adhésion au substrat des cellules PC12.

Hormis les corps cellulaires, il apparaît que Tau est, conformément aux résultats présentés au cours du chapitre 8, concentré dans les cônes de croissance (figure 10.3, flèches creuses), y compris dans le peu de neurites conservées dans les conditions de concentration élevée de cytochalasine (50 μM). Il est possible que, dans ce cas précis, l'impossibilité pour Tau de s'associer avec des filaments d'actine à ce niveau soit l'une des raisons expliquant le faible nombre de neurites initiées, même pour des cellules ayant préservé leur adhésion au substrat. Inversement, dans des conditions de culture plus appropriées, l'association de Tau au cortex d'actine, et donc pas seulement aux filopodes et aux lamellipodes, semble, sinon nécessaire, du moins supposée contribuer à un degré d'initiation neuritique à peu près normal.

Tous ces résultats indiquent que l'activité, séparée ou combinée, des filopodes et des lamellipodes, n'apparaît pas strictement nécessaire aux processus permettant à la cellule PC12 de transcrire les gradients locaux d'énergie d'adhésion en signal de différenciation. La question de l'identification des mécanismes permettant de passer de l'un à l'autre reste donc ouverte. En conclusion, seule la présence d'un cortex d'actine sous-membranaire semble nécessaire à l'initiation de neurites par les cellules PC12. Toutefois, l'implication de ce cortex dans les processus de transcription des gradients locaux reste à démontrer.

10.2 Culture des cellules PC12 1.1 dans un milieu déprivé en sérum

Au cours de cette étude, une autre lignée de cellules dérivée de PC12 a été utilisée, que l'on nomme « PC12 1.1 ». Cette lignée est différente de celle dont nous nous sommes servis jusqu'à présent pour mener nos expériences. Elle exprime le récepteur X aux rétinoïdes [233]. De nombreuses observations ont permis d'établir que les cellules PC12 1.1 ne répondaient plus au NGF, et survivaient à la déprivation en sérum. Ces deux caractéristiques laissent supposer que ces cellules ont perdu la capacité de contrôler le cycle cellulaire [234]. Par ailleurs, l'absence de sérum permet d'inhiber la prolifération et de stimuler la croissance neuritique des PC12 dans un

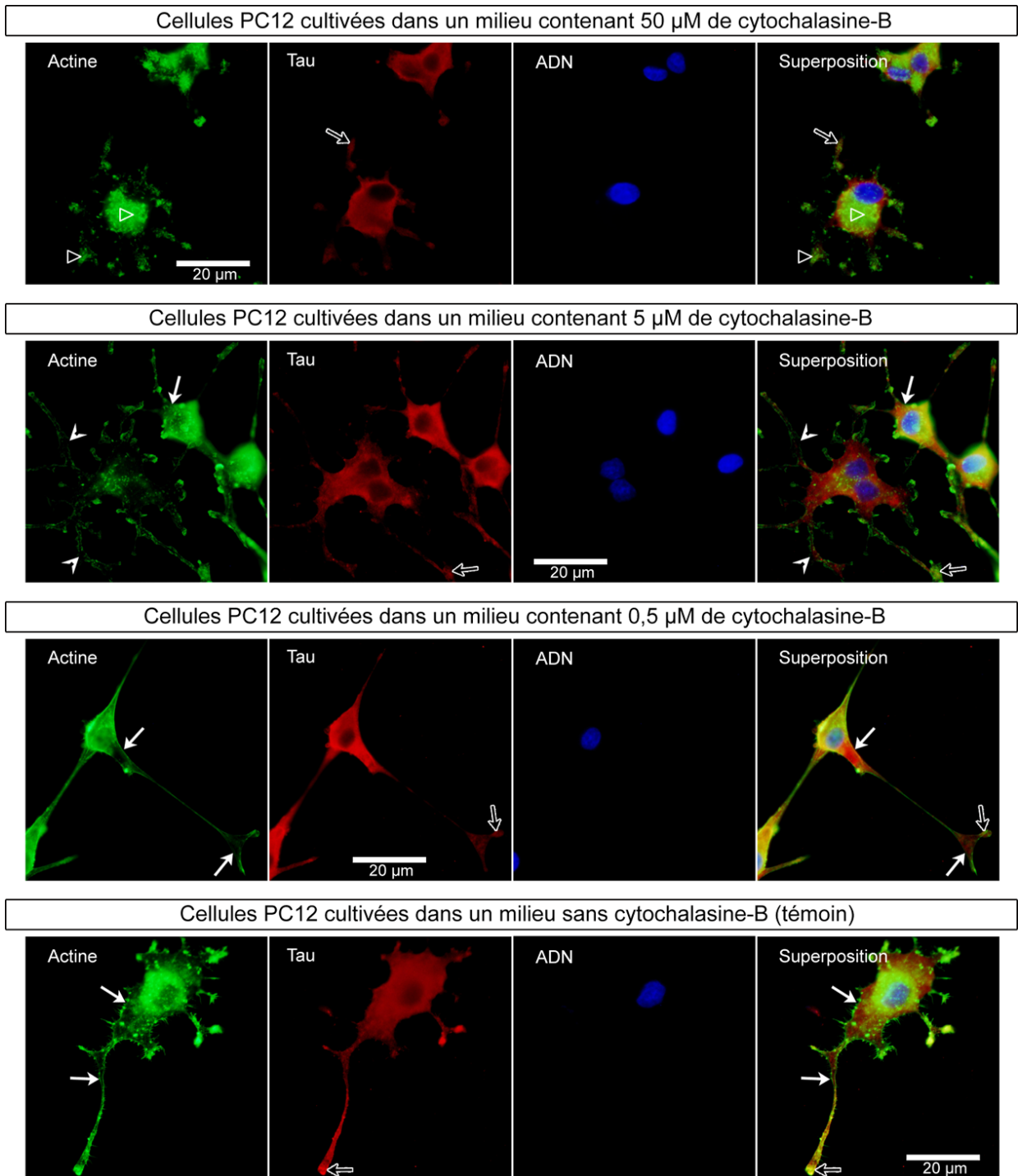


FIGURE 10.3: Influence de la cytochalasine-B sur la stabilité des filaments d'actine observée par immunofluorescence. Les flèches pleines pointent des zones où le cortex d'actine sous-membranaire est apparemment stable. Les pointes de flèches cassées indiquent des zones discontinues où le cortex d'actine apparaît déstabilisé. Les flèches creuses pointent les zones neuritiques (hors soma) pour lesquelles Tau est colocalisé avec des filaments d'actine. Les triangles indiquent des agrégats de filaments d'actine.

milieu contenant du NGF [188, 235]. Nous allons voir que pour la lignée de cellules PC12 1.1, le retrait de sérum (effectué 24 h après ensemencement) est aussi en mesure d'induire l'initiation de neurites dans un milieu sans NGF, sur des fibres de collagène de type I, et sur des surfaces de classe 1 (verre/PLL et verre/PLO). Ce retrait de sérum n'est pas à proprement parler un retrait complet, puisque la proportion volumique du sérum de veau est maintenue à 0,5% (contre 5% dans des conditions usuelles). Le sérum de cheval est totalement omis du milieu de culture.

10.2.1 Culture sur collagène de type I

Après 5 jours de déprivation en sérum du milieu de culture (soit 6 jours après ensemencement des lamelles modifiées), les cellules PC12 1.1 étendent des neurites dont la longueur atteint parfois 100 μm (figure 10.4). Outre son rôle supposé dans la génération de neurites, le stress que semblent éprouver les cellules PC12 1.1 dans ces conditions s'exprime également par une affinité réduite au substrat. Ce caractère est observable sur l'image de gauche de la figure 10.4, où l'on distingue parfois des cellules qui paraissent peu étalées et très regroupées sur elles-mêmes (figure 10.4, flèches). Il est possible que quelques-unes des cellules, éprouvant des difficultés à adhérer convenablement au substrat, n'aient pas trouvé d'autre possibilité que de s'accoler à des cellules ayant été, quant à elles, en mesure d'y adhérer. Cela fournirait un motif d'explication crédible à cette densité ponctuelle élevée des cellules.

La disposition des cellules sur le substrat semble s'effectuer d'une façon totalement différente de ce que nous avons pu observer jusqu'à présent au cours des chapitres passés. Là où les cellules avaient auparavant tendance à se regrouper suivant des colonies d'apparence relativement circulaire, ou tout du moins elliptique, elles semblent ici s'aligner les unes derrière les autres suivant des directions spécifiques. Tout se passe comme si les cellules étaient maintenues dans des réseaux de canaux s'entrecroisant les uns les autres, et que tant le mouvement des cellules que les neurites générées étaient contraints de suivre les directions prises par ces canaux.

En fait de canaux, il s'agit de fibres de collagène (figure 10.5), fournissant un bon support d'adhésion pour le développement des cellules PC12 [92]. La matrice de collagène utilisée ici diffère sensiblement de celle servant généralement de support aux cellules dans les expériences y ayant recours. Sa concentration est très faible ($\sim 50 \mu\text{g ml}^{-1}$ dans du PBS), ce qui a pour effet d'induire une matrice que l'on suppose très peu élastique en raison de sa fine épaisseur supposée et de sa rugosité peu élevée ($\text{rms} \approx 3,5 \text{ nm}$) une fois déposée sur une lamelle de verre propre. Il ne s'agit pas ici de discuter des influences respectives des interactions chimiques entre les fibres et les cellules, ou bien de la déprivation en sérum des milieux dans l'initiation des neurites observées, mais plutôt de constater la sensibilité des cellules PC12 à la nanorugosité du substrat, bien que les cellules proviennent d'une lignée différente. Même si les résultats du chapitre 9 nous avaient conduit à exclure la nanorugosité des paramètres influant la faculté des cellules à générer des neurites (cf. page 151), il semble cependant que cette nanorugosité soit en mesure d'influencer la morphologie des cellules et des neurites associées. Toutefois, il est possible que l'influence de la nanorugosité s'explique plus par le caractère morphologique du substrat (autrement dit, l'agencement des fibres de collagène les unes par rapport aux autres, considérée à une échelle submicrométrique [236]), qu'à travers la stricte valeur physique caractérisant la rugosité, à savoir le rms.

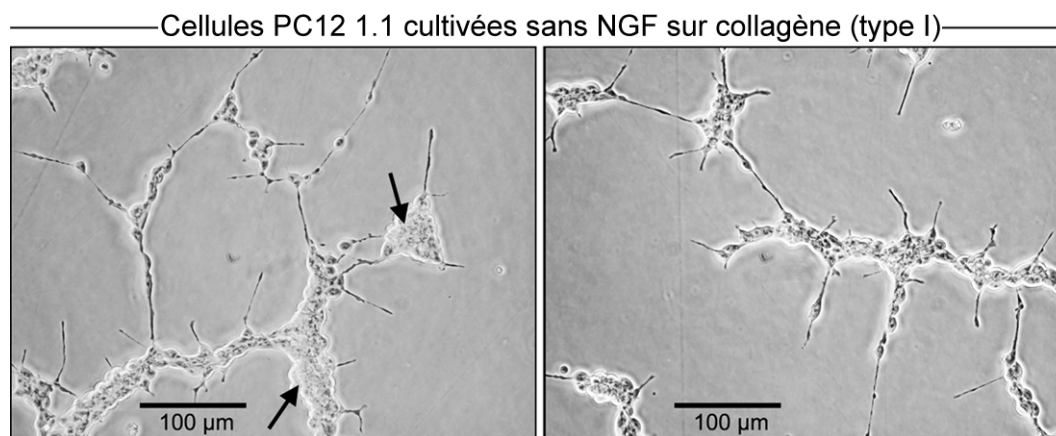


FIGURE 10.4: Génération de neurites par les cellules PC12 1.1 cultivées sur collagène dans un milieu déprivé en sérum. Les flèches indiquent des agrégats de cellules, lesquelles paraissent très regroupées sur elles-mêmes. L'observation est faite au microscope optique.

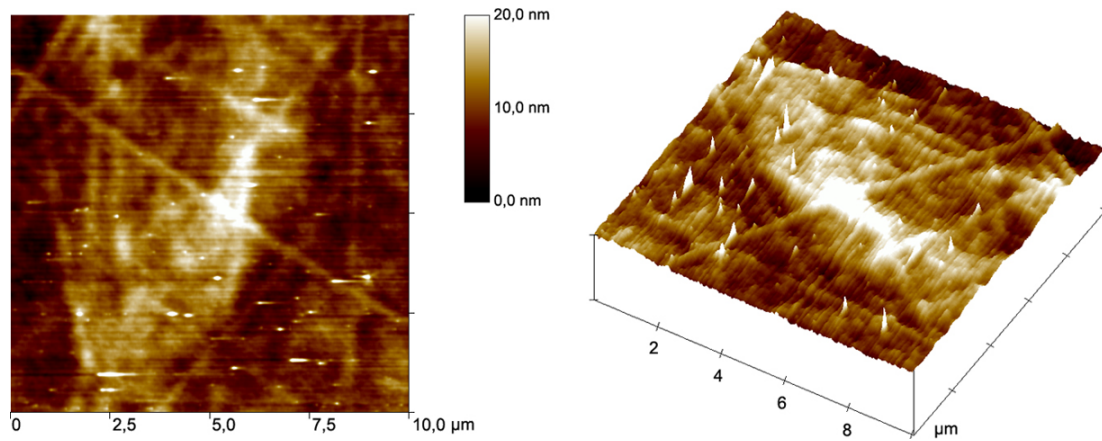


FIGURE 10.5: Imagerie AFM de fibres de collagène adsorbées sur du verre propre.

10.2.2 Culture sur verre/PLL et sur verre/PLO

De même que sur collagène et dans les mêmes conditions de déprivation en sérum des milieux, les cellules PC12 1.1 produisent des neurites sur des surfaces de classe 1 (figure 10.6), bien que ces surfaces, en soi, ne stimulent pas la neuritogénèse spontanée chez les cellules PC12 (cf. chapitre 8). Il est néanmoins possible que la détérioration progressive de la matrice constituée par la PLL ou la PLO, observée pour des cultures s'étendant au-delà de 3 jours [92, 147, 188], participe à ce processus en générant des gradients locaux d'énergie d'adhésion. Notons qu'un substrat de PLL permet la survie et la maturation de neurones primaires dans un milieu sans sérum [237].

L'imagerie AFM indique, d'une part, que les lamellipodes semblent se former plus facilement sur les surfaces de verre/PLO que sur verre/PLL. Cela pourrait constituer un indice des effets entraînés par la charge contenue (cas de la PLL) ou pas (cas de la PLO) par chacune des deux surfaces, qui sont par ailleurs très similaires (cf. figure 2.3). D'autre part, elle met en lumière l'intense activité des filopodes et des lamellipodes tant au niveau des cônes de croissance (figure 10.7, flèches bleues) que le long des neurites (figure 10.7, flèches orangées). Cette observation suggère que la détection des paramètres du milieu environnant ne s'effectue pas uniquement à travers le cône de croissance, comme observé par ailleurs [6, 238]. De toute évidence, l'initiation de branchements et la diffusion de molécules de signalisation s'effectue aussi à partir du corps de neurites constituées.

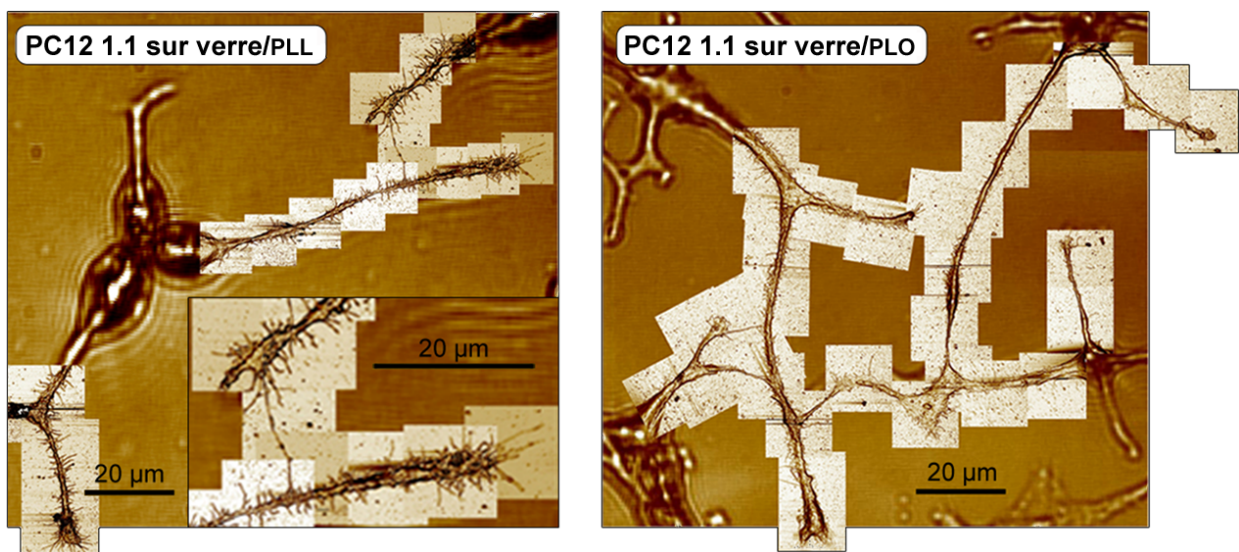


FIGURE 10.6: Génération de neurites par les cellules PC12 1.1 cultivées sur verre/PLL et verre/PLO dans un milieu sans NGF et déprivé en sérum. Les images présentées montrent une combinaison d'images réalisées au microscope optique et à l'AFM.

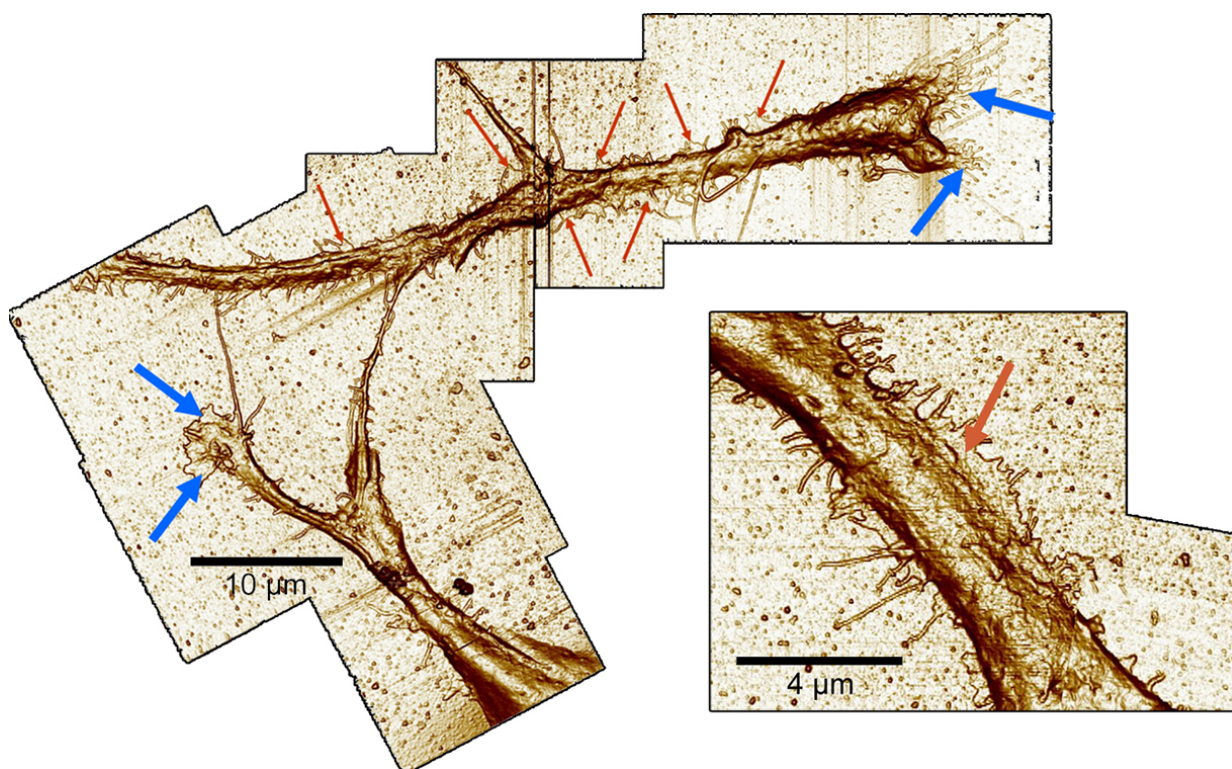


FIGURE 10.7: Filopodes et lamellipodes observés le long du corps des neurites sur verre/PLO (images AFM). Les flèches indiquent la présence de lamellipodes au niveau des cônes de croissance (flèches bleues) ou au niveau du corps des neurites (flèches oranges).

10.3 Culture sur nanoplots d'or sur du verre et sur de l'or pur

Les expériences décrites ci-après résultent d'une collaboration entreprise avec Nathalie BARDOU, Émilie COLLART et Stéphane COLLIN, du laboratoire de Photonique et de Nanostructures (LPN, CNRS-UPR20, Marcoussis). Les procédés de haute-technologie dont dispose le LPN nous ont permis de reproduire la nanostructure fournie par un substrat d'eda', en imitant les agrégats d'aminosilanes par des nanoplots d'or dont nous contrôlons le diamètre et la périodicité sur une surface de verre (figures 10.8 et 10.9). L'objectif de ces expériences était, en premier lieu, de confirmer l'influence des gradients locaux d'énergie d'adhésion sur la différenciation des cellules PC12, et en second lieu, de déterminer l'existence d'un éventuel seuil spatial pour lequel ces gradients deviennent effectifs vis-à-vis du devenir des cellules en termes de différenciation. Les résultats que nous présentons font état de manipulations préliminaires, au cours desquelles les cellules sont directement cultivées sur les nanoplots d'or. Afin de mener ces expériences à terme, il conviendrait de fonctionnaliser ces nanoplots, en utilisant par exemple des alcanethiols [40, 239], de manière à abaisser la tension de surface de l'or ($\gamma_c > 700 \text{ mN m}^{-1}$) à des valeurs de l'ordre de celles rencontrées pour des greffages d'alkylsiloxanes ($25 \text{ mN m}^{-1} \leq \gamma_c \leq 60 \text{ mN m}^{-1}$) stimulant la croissance neuritique des cellules PC12.

10.3.1 Dimensions des nanoplots et conditions expérimentales de culture

Les nanoplots ont une hauteur d'environ 20 nm quelle que soit leur diamètre et leur périodicité (figure 10.9). Afin de renforcer l'adhésion de l'or au verre, une couche de titane, d'environ 5 nm d'épaisseur, est intercalée entre chaque plot et la surface de verre. Le titane est une matière biocompatible, partie prenante de la structure de nombreux biomatériaux [240, 241]. L'or est lui-aussi biocompatible [25, 242]. Deux lames contenant des zones de nanoplots greffés sur du verre ont été utilisées (figure 10.10). Les zones de plots représentées sur la figure 10.10 ne sont pas à l'échelle

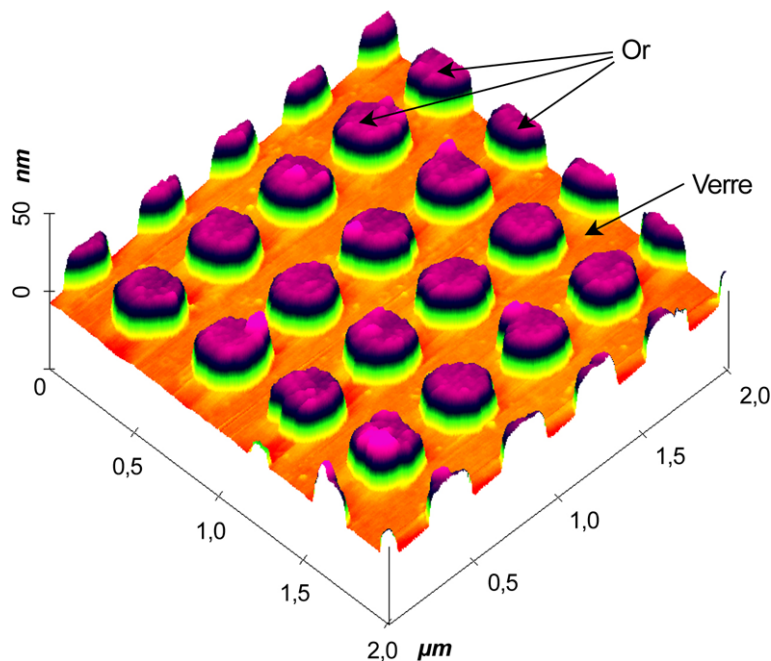


FIGURE 10.8: Image AFM de nanoplots d'or sur une surface de verre propre.

pour plus de clarté. La lame #1 (figure 10.9) contient des nanoplots dont le diamètre est identique (200 nm), mais de périodicité variable (300, 400, 800, et 1600 nm). La densité surfacique de l'or atteint une valeur de 38% de la surface totale pour la zone #4, la plus « fournie » en nanoplots. La lame #2 contient deux types de nanoplots dont le diamètre est respectivement de 400 et 800 nm, pour une périodicité respective de 600 et 800 nm, et une densité de nanoplots occupant respectivement 33 et 50% de la surface totale. Outre les dimensions des nanoplots constituant les deux lames, ces dernières se distinguent par la nature du substrat situé aux alentours des zones de nanoplots. Sur la lame #1, le substrat « hors-zones » est constitué de verre propre. Sur la lame #2, la surface hors-nanoplots est constituée d'or pur.

L'ensemencement des cellules est effectué dans des conditions similaires aux expériences décrites dans le chapitre 9 (cf. tableau 7.1) : le volume de milieu est réduit à $\sim 335 \mu\text{l}$, de façon à piéger les cellules sur les zones de nanoplots, et éviter ainsi le glissement des cellules en-dehors des lames sur lesquelles sont greffées les zones de nanoplots. Les lames sont disposées dans des boîtes de pétri de 50 mm de diamètre. 24 h après le dépôt de cellules, une fois que ces dernières ont pu adhérer convenablement aux surfaces, un volume de 5 ml de milieu standard (sans NGF, et contenant une proportion volumique de sérum de veau de 5%) est ajouté dans les boîtes. Les observations sont effectuées au 6^{ème} jour de culture (figure 10.11). Signalons enfin que la manipulation a été effectuée deux fois afin de tester la reproductibilité des résultats. Entre les deux manipulations, les lames ont été nettoyées par un bref lavage ($t < 1 \text{ min}$) dans une solution de piranha (cf. chapitre 2, page 47), auquel le verre et l'or sont résistants. La conservation des nanoplots suite au nettoyage a été vérifiée par des analyses AFM (les images de la lame #2 présentées à la figure 10.9 ont d'ailleurs été obtenues suite à ce nettoyage).

10.3.2 Observation des cellules

Culture sur les zones de nanoplots

Globalement, les cellules adhèrent de manière convenable quelle que soit la zone de nanoplots considérée de la lame #1 (figure 10.9). Tout juste observe-t-on une propension plus élevée des cellules à adhérer et à générer des neurites sur la zone #4 (par rapport aux zones #1, #2, et #3), c'est-à-dire celle dont la densité d'or en surface est la plus importante ($\sim 38\%$). Cependant, cette faculté d'initiation de neurites n'apparaît pas aussi marquée que sur des surfaces d'alkylsiloxanes

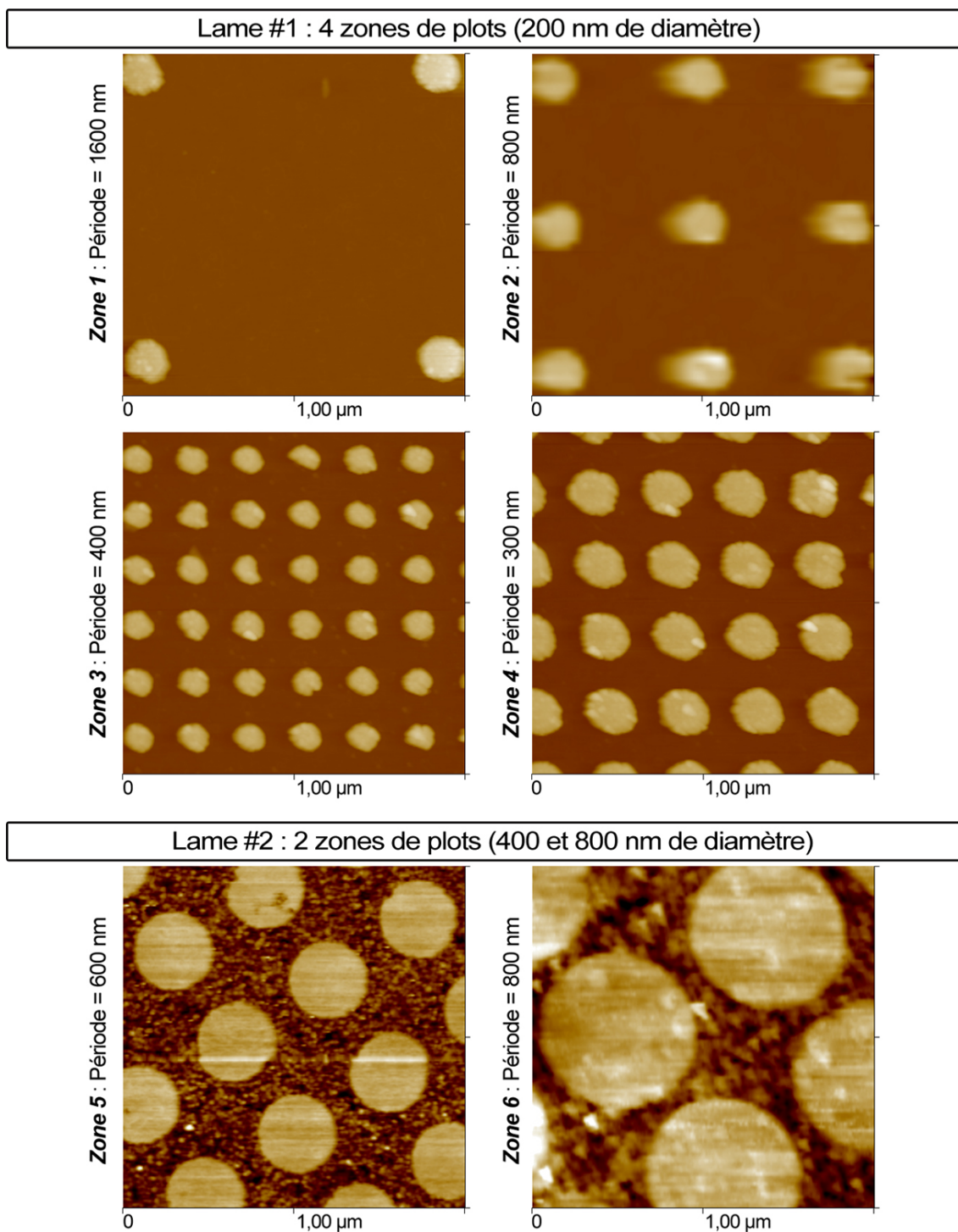


FIGURE 10.9: Descriptions par AFM des différentes zones de nanoplots d'or sur du verre utilisées pour la culture cellulaire. La dimension des plots varie seulement suivant leurs diamètres et leurs périodes à la surface du verre. Les plots ont tous une hauteur d'environ 20 nm.

à terminaison amine, telle l'eda' ou le peda', dans des conditions de culture similaire. Les cellules cultivées sur les zones de nanoplots de la lame #2 ne présentent pas de différences significatives avec celles cultivées sur la zone #4 de la lame #1. La seule conclusion que l'on puisse tirer de cette manipulation est que les cellules adhèrent et se différencient d'autant mieux que la proportion d'or en surface est importante. Cela apparaît logique compte-tenu du peu d'affinité des cellules pour le verre propre (cf. chapitre 9), et le degré d'affinité beaucoup plus élevé que les cellules semblent développer pour la surface d'or (figure 10.12).

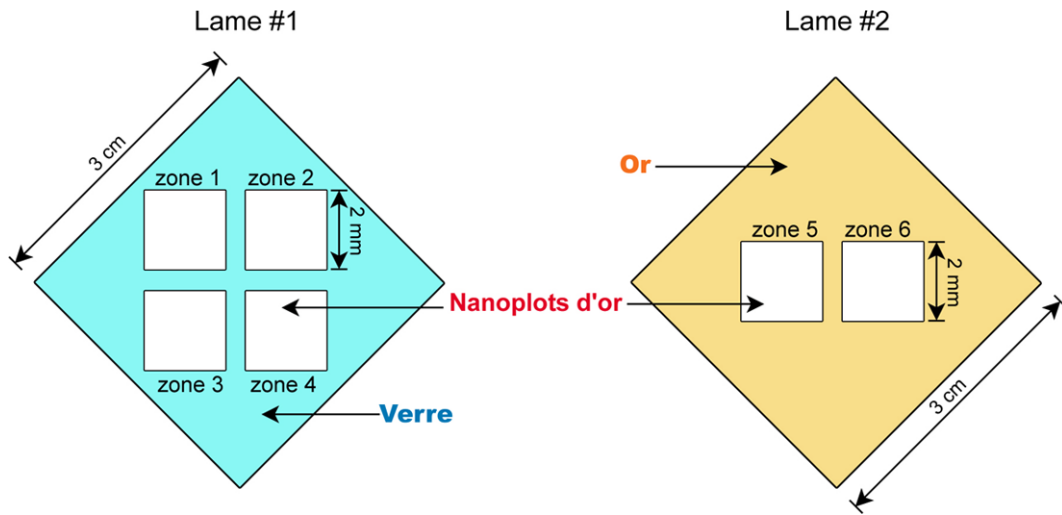
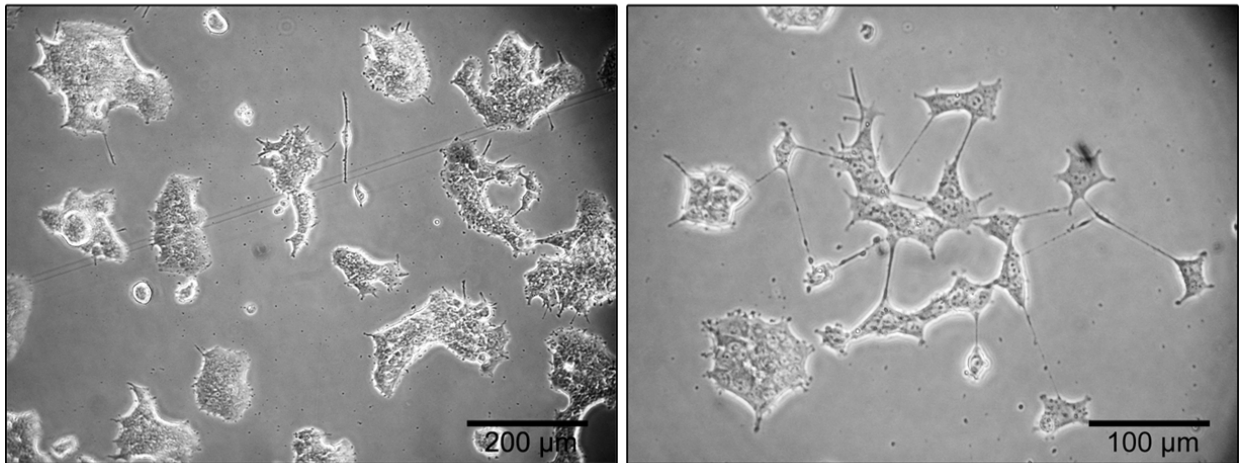


FIGURE 10.10: Illustration de la configuration des lames modifiées par greffage de nanoplots.

Cellules PC12 cultivées sans NGF sur les zones de nanoplots de la **lame #1**



Cellules PC12 cultivées sans NGF sur les zones de nanoplots de la **lame #2**

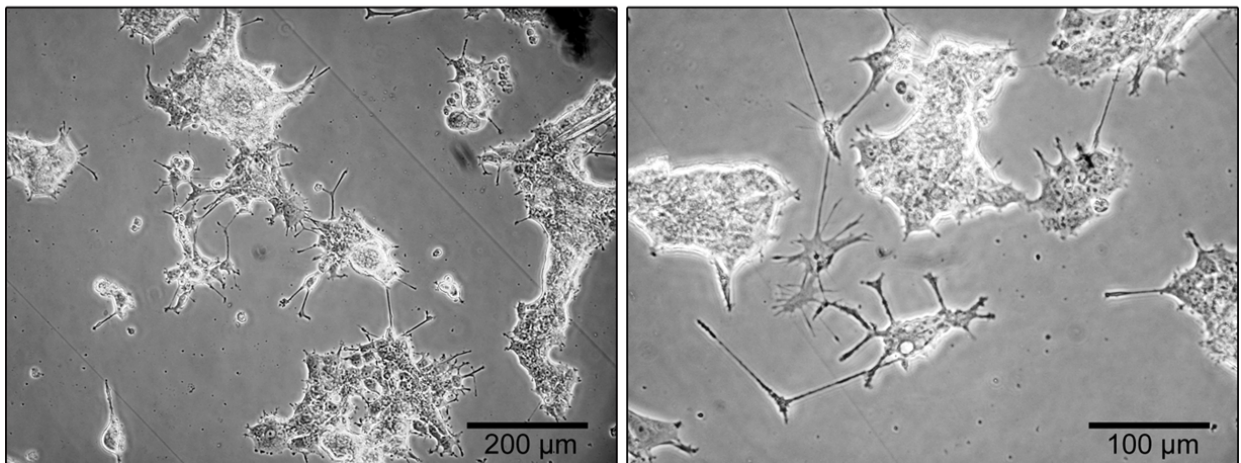


FIGURE 10.11: Cellules observées au microscope optique sur les zones de nanoplots après 6 jours de culture. Les cellules adhèrent correctement sur toutes les zones de nanoplots (images de gauche, haut et bas). Elles semblent développer une tendance supérieure à produire des neurites sur les zones pour lesquelles la concentration surfacique d'or est la plus importante (en haut à droite : zone 4 de la lame #1, en bas à droite : zone 6 de la lame #2).

Cellules PC12 sur les zones d'or pur

Les cellules dont l'adhésion s'effectue à la frontière des zones de nanoplots d'or sur du verre et des zones d'or pur se stabilisent préférentiellement sur ces dernières (figure 10.12). Ce phénomène s'explique sans doute par le degré d'affinité élevée des cellules pour l'or par rapport au verre. De plus, le degré d'initiation de neurites par les cellules semble augmenter lorsqu'elles adhèrent sur ces zones ou à proximité, par rapport aux cellules qui adhèrent sur les zones de nanoplots dans des régions éloignées des zones d'or pur. Ces résultats indiquent que l'interaction entre l'or et les cellules est de nature à stimuler la neuritogénèse des cellules PC12. En outre, la neuritogénèse élevée des cellules situées à proximité des zones d'or pur s'explique peut-être par la diffusion de molécules neurotrophiques émises par les cellules qui adhèrent sur l'or pur.

Cellules PC12 cultivées sans NGF sur la **lame #2 : nanoplots et or pur**

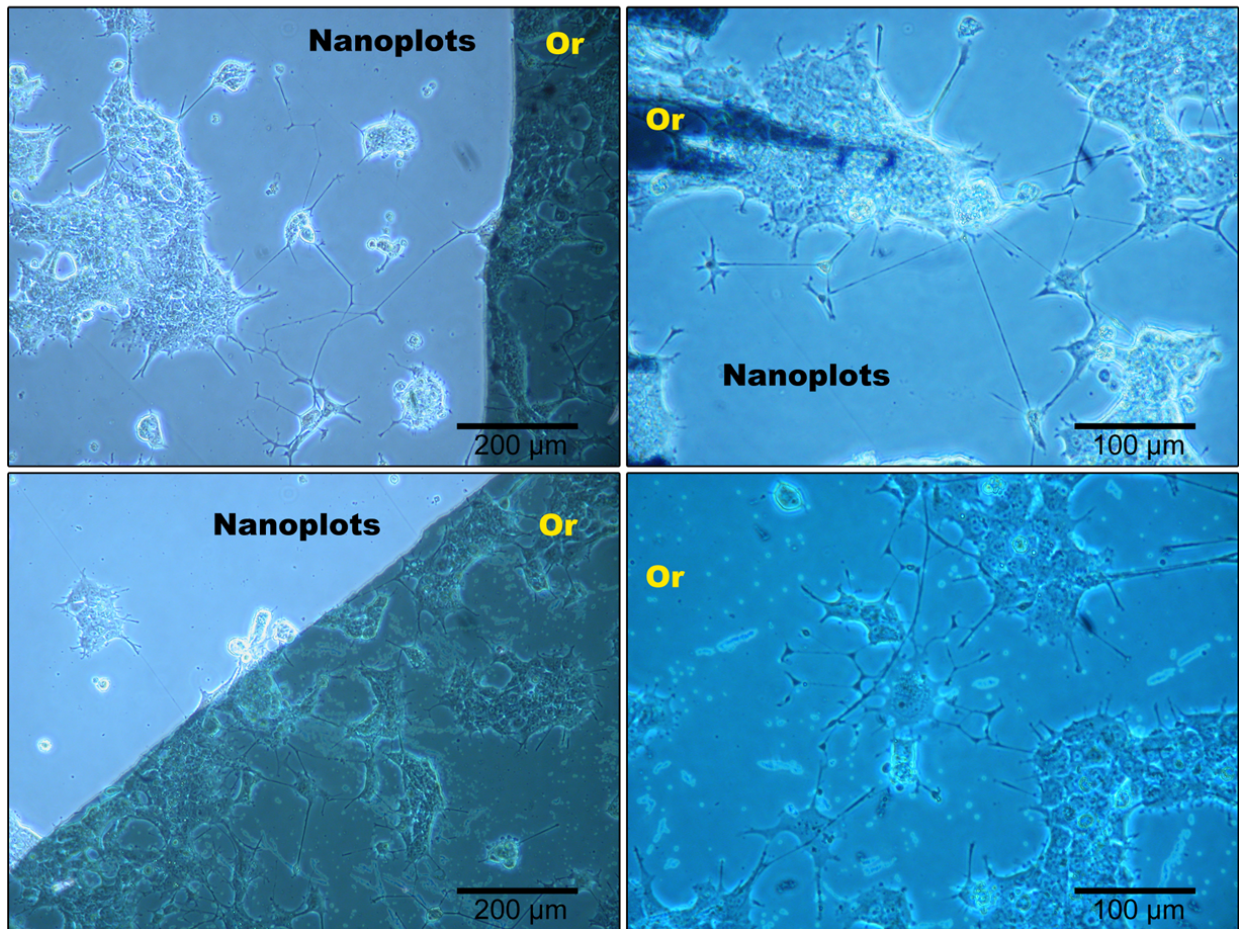


FIGURE 10.12: Cellules observées au microscope optique sur la lame #2 après 6 jours de culture. Les cellules adhèrent préférentiellement sur les zones couvertes d'or pur, plutôt que sur les zones contenant les nanoplots d'or sur du verre.

10.3.3 Conclusions

Les expériences décrites au cours de ce chapitre indiquent les voies dans lesquelles pourrait s'orienter la suite de ce travail.

Premièrement, si la déstabilisation du cytosquelette d'actine suite au traitement des cellules par la cytochalasine-B a permis de réduire l'importance du rôle supposé des filopodes et des lamellipodes dans les mécanismes d'intégration des gradients locaux d'énergie d'adhésion par les cellules PC12, ces mécanismes n'ont pour l'heure pas encore été identifiés. Les résultats semblent indiquer que le cortex d'actine sous-membranaire est essentiel au développement des neurites, mais

pour autant, ce cortex et sa dynamique ont-ils un rôle critique dans la détection et la transduction des gradients locaux ? Seules de nouvelles manipulations, abordant le problème suivant un angle différent, permettront éventuellement de fournir la réponse à cette question. L'interférométrie semble la technique la plus appropriée pour faire face à ce type de problématique, dans la mesure où elle permet à l'observateur de focaliser son attention sur l'interface cellule-substrat. Nous pouvons par exemple suggérer l'expérience suivante, inspirée de nos propres manipulations ou d'autres effectuées par ailleurs [243] : la déstabilisation contrôlée du cytosquelette d'actine de la cellule, couplée à l'observation en continu de l'interface cellule-substrat. La dynamique des filaments d'actine pourrait être suivie en temps réel, non seulement par RICM, mais aussi par fluorescence, en transfectant les cellules avec de l'actine-GFP. Une telle expérience permettrait de corrélérer plus précisément l'activité filopodique et lamellipodique avec la mobilité des neurites, qu'elle soit de nature extensive ou rétractive.

Deuxièmement, les expériences de culture sur des fibres de collagène et sur des nanoplots d'or semblent indiquer, conformément à la littérature, que les cellules PC12 sont à la fois sensibles à la nanorugosité et à la densité surfacique des terminaisons chimiques du substrat. Ces résultats n'apparaissent cependant pas en contradiction avec ceux des chapitres 8 et 9. Ils sont plutôt de nature à les conforter, en ce sens que les cellules sont susceptibles de réagir à ce type de stimuli (nanorugosité, densité surfacique des terminaisons chimiques), mais qu'au final, c'est bien la distribution spatiale de la tension de surface des substrats qui induit la neuritogénèse des cellules PC12, lorsqu'elles sont cultivées sur des surfaces d'alkylsiloxanes auto-assemblées. La fonctionnalisation des nanoplots d'or, visant à leur faire acquérir un caractère physico-chimique comparable à celui des alkylsiloxanes, constitue une voie d'exploration possible. Une expérience combinant une telle fonctionnalisation avec une variation de la dimension ou de la périodicité des plots, tout en conservant leur densité constante, permettrait peut-être de lever le voile sur la dimension exacte pour laquelle les gradients d'énergie d'adhésion ont un effet critique sur l'adhésion et/ou sur la différenciation des cellules PC12.

Conclusion générale

Au cours de cette thèse, nous avons étudié l'impact de la distribution des énergies du substrat sur l'adhésion et sur la différenciation des cellules PC12. Ces cellules ont été choisies car elles constituent un modèle très connu pour étudier les mécanismes de différenciation neuronale, et parce qu'usuellement, elles nécessitent un traitement au facteur de croissance nerveux (NGF) pour se différencier. Or, nos expériences indiquent que les cellules PC12 peuvent atteindre un état de différenciation stable, en seulement 24 h de culture, sur des surfaces rigides spécifiques et sans traitement au NGF. Si plusieurs études ont démontré la faculté qu'ont les cellules PC12 d'initier des neurites sans NGF sur des substrats mous (en utilisant des matrices extracellulaires de différentes natures en guise de substrats), nos résultats constituent le premier exemple de différenciation neuronale des cellules PC12 obtenue sans NGF sur des surfaces rigides. De plus, les analyses pratiquées démontrent clairement que ce sont les interactions entretenues par les cellules avec leurs substrats d'adhésion qui sont responsables de la différenciation observée.

Le choix des substrats s'est principalement porté sur des monocouches d'alkylsiloxanes sur du verre. Ces monocouches constituent, entre autres, des substrats modèles pour la culture cellulaire, et leurs propriétés de surface (nanorugosité, mouillabilité, concentration surfacique des groupements chimiques terminaux, distribution des énergies de surfaces) sont très contrôlables. L'exploitation de traitements chimiques distincts destinés à modifier la surface du verre nous a donc permis d'exercer un contrôle précis sur les propriétés physico-chimiques susceptibles d'être ressenties et intégrées par les cellules. Ce contrôle nous a conduit à redéfinir les monocouches auto-assemblées (SAMs) suivant l'organisation nanostructurale de la surface qu'elles exposent. Ainsi, nous classifions les différents films moléculaires d'alkylsiloxanes sur du verre, et certains films moléculaires composés de biopolymères, suivant leur organisation : très ordonnée (classe 1), modérément ordonnée ou désordonnée (classe 2), et très désordonnée (classe 3). Nos résultats indiquent que parmi ces surfaces, ce sont les surfaces de classe 3 qui disposent du plus fort potentiel de stimulation de la neuritogénèse des cellules PC12.

En plus des techniques usuelles telles que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) ou la microscopie à force atomique (AFM), des techniques hautement spécifiques des surfaces ont été employées pour caractériser les substrats élaborés. La première de ces techniques est la génération de somme de fréquences (SFG), processus d'optique non-linéaire dévoilant la cohérence organisationnelle des groupes chimiques situés aux interfaces. La deuxième consiste en des expériences de mouillage. C'est-à-dire : l'utilisation appropriée du modèle Owens–Wendt, qui distingue les composantes polaires et dispersives de l'énergie de surface, la construction de Zisman plots, permettant la détermination des énergies critiques de surface, et enfin la mesure des angles de contact statiques d'avancée et de recul, fournissant un indice du degré d'hétérogénéité des surfaces. Notons que ce travail constitue, dans la mesure de nos connaissances, le premier exemple d'un appareil de caractérisation de surface combinant deux des techniques mentionnées ci-dessus (SFG et Owens–Wendt). Il montre également la nécessité, en ce qui concerne les substrats dotés de terminaisons méthyle, d'effectuer cette combinaison dans le but d'assigner chaque substrat élaboré à chaque classe de surface précédemment définie. Chacune de ces classes a ainsi fait l'objet d'une caractérisation précise, permettant d'établir une organisation nanostructurale distincte, générant pour chacune une distribution spécifique des énergies de surface.

Grâce à cela, nous avons pu mettre en lumière l'impact et les paramètres critiques de la distribution des énergies d'adhésion dans l'adhésion et dans la différenciation des cellules PC12. Les surfaces de classe 3 présentent une distribution très hétérogène des composantes polaires et dispersives des énergies d'interactions non-spécifiques, créant de forts gradients dans les énergies d'adhésion aux échelles nanométriques. Nous avons identifié quel paramètre tient une importance fondamentale dans la génération des gradients locaux influant sur les cellules. Parmi tous les paramètres analysés (nanorugosité, mouillabilité, affinité chimique, concentration surfacique des groupements chimiques terminaux, hétérogénéités chimiques), nous démontrons que, dans nos expériences, ce sont les hétérogénéités chimiques aux échelles nanométriques qui exercent une influence critique sur l'adhésion et sur la différenciation des cellules PC12. De ce fait, les données expérimentales de la littérature, considérant l'influence de facteurs de surface tels que les signaux chimiques, spatiaux et mécaniques, sur les fonctions des cellules neuronales, gagneraient à être réévaluées à la lumière de ce nouveau critère (i.e., les hétérogénéités chimiques du substrat aux échelles nanométriques). De plus, les futures expériences dans ce domaine devront prendre en compte ce paramètre dans l'évaluation de leurs résultats.

Il paraît opportun d'envisager que d'autres systèmes, en plus des cellules PC12, puissent être profondément affectés par l'organisation nanostructurale de la surface des substrats. Nous pensons en particulier aux cellules neuronales primaires ou à d'autres cellules du système nerveux, telles que les astrocytes ou encore les oligodendrocytes. Par conséquent, la conception future de biomatériaux pourrait intégrer des gradients locaux dans leurs énergies de surface. Cela constituerait éventuellement un moyen de stimuler la régénérescence axonale de neurones primaires, tels que les neurones du système cortical ou du système corticospinal par exemple.

Les suites possibles de ce travail pourraient s'articuler autour de trois axes, plus ou moins dépendants : le premier concernerait la mobilité des cellules, le deuxième les surfaces modifiées, et le troisième l'interface entre les cellules et la surface des substrats. En ce qui concerne les cellules, il s'agirait de comprendre véritablement comment s'effectue la détection des gradients d'énergies d'adhésion. Même si nous confirmons qu'un cortex d'actine sous-membranaire suffisamment stable est nécessaire à l'extension des neurites, nos résultats indiquent que ce n'est vraisemblablement pas au travers des filopodes et des lamellipodes que s'effectue le processus de détection des gradients locaux. Du point de vue de la modification des surfaces, l'élaboration de gradients contrôlés dans l'espace pourrait indiquer un seuil éventuel à partir duquel les cellules deviendraient sensibles aux gradients. Pour cela, on peut envisager l'utilisation de nanoplots fonctionnalisés dont la taille et la période seraient contrôlées à l'échelle nanométrique.

Enfin, nous pourrions étudier le rôle éventuel des médiateurs externes qui seraient impliqués dans la détection et la transmission des gradients locaux à la cellule. En particulier, il s'agirait de déterminer si les cellules PC12 peuvent répondre directement aux signaux physiques du substrat, ou si les processus qui conduisent à leur détection dépendent de composants du milieu de culture. Par exemple, il est envisageable que ces processus soient modulés par le calcium et/ou par les protéines contenues dans le sérum des milieux. En outre, la modélisation ou la mise en perspective mathématique des interactions entre les potentiels énergétiques des surfaces et d'un côté, le phénomène de différenciation, et de l'autre, la cinétique de croissance axonale, constituerait un développement aussi logique que pertinent aux travaux exposés dans ce document.

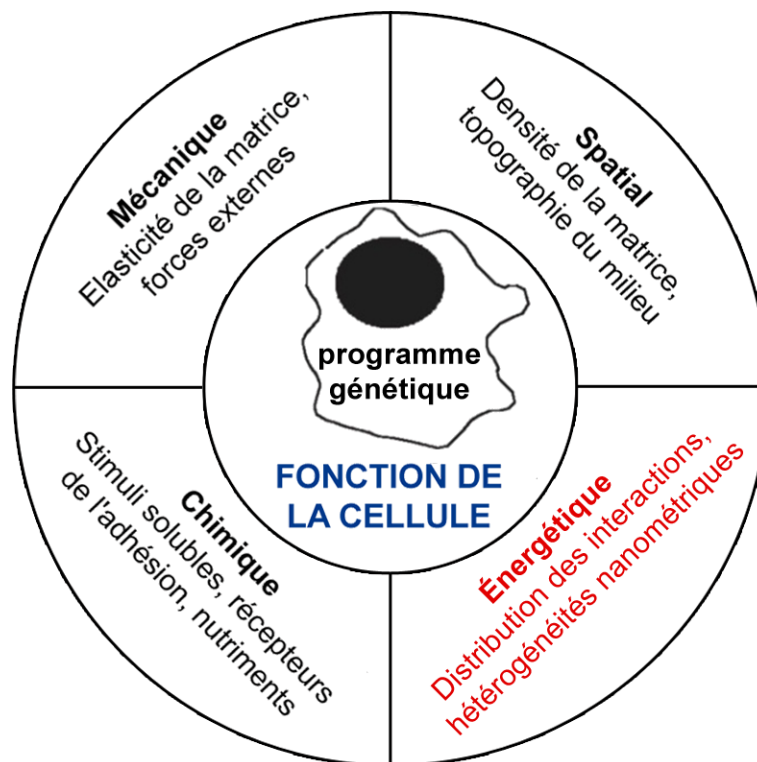


FIGURE 11.1: Schéma situant notre contribution à l'identification des paramètres de surface modulant la fonction des cellules (adapté de la Réf. [49]). Les paramètres connus préalablement à notre travail sont écrits en couleur noire. Le paramètre que nous avons décrit au cours de cette thèse est inscrit en rouge.

Troisième partie

ANNEXES

Annexe A

Détection de micro-aspérités en surface des lamelles de verre

La [figure A.1](#) (page suivante) montre des images de la ligne de contact d'une goutte d'eau s'évaporant sur une surface d'otms. En se retirant, la ligne de contact est parfois distordue (là où pointent les flèches blanches), révélant l'existence de micro-aspérités sur lesquelles elle bloque. On suppose que ces micro-aspérités, qui ne dépendent *a priori* pas des processus de modification du verre, sont responsables des valeurs non-négligeables mesurées pour le θ_{AR} ($\sim 10-12^\circ$) des substrats de classe 1 (tel que l'otms), bien que la surface de ces substrats soit par ailleurs très homogène (cf. pages 83–84). Environ une dizaine de secondes séparent l'image photographiée à l'instant t_1 de celle photographiée à l'instant t_6 .

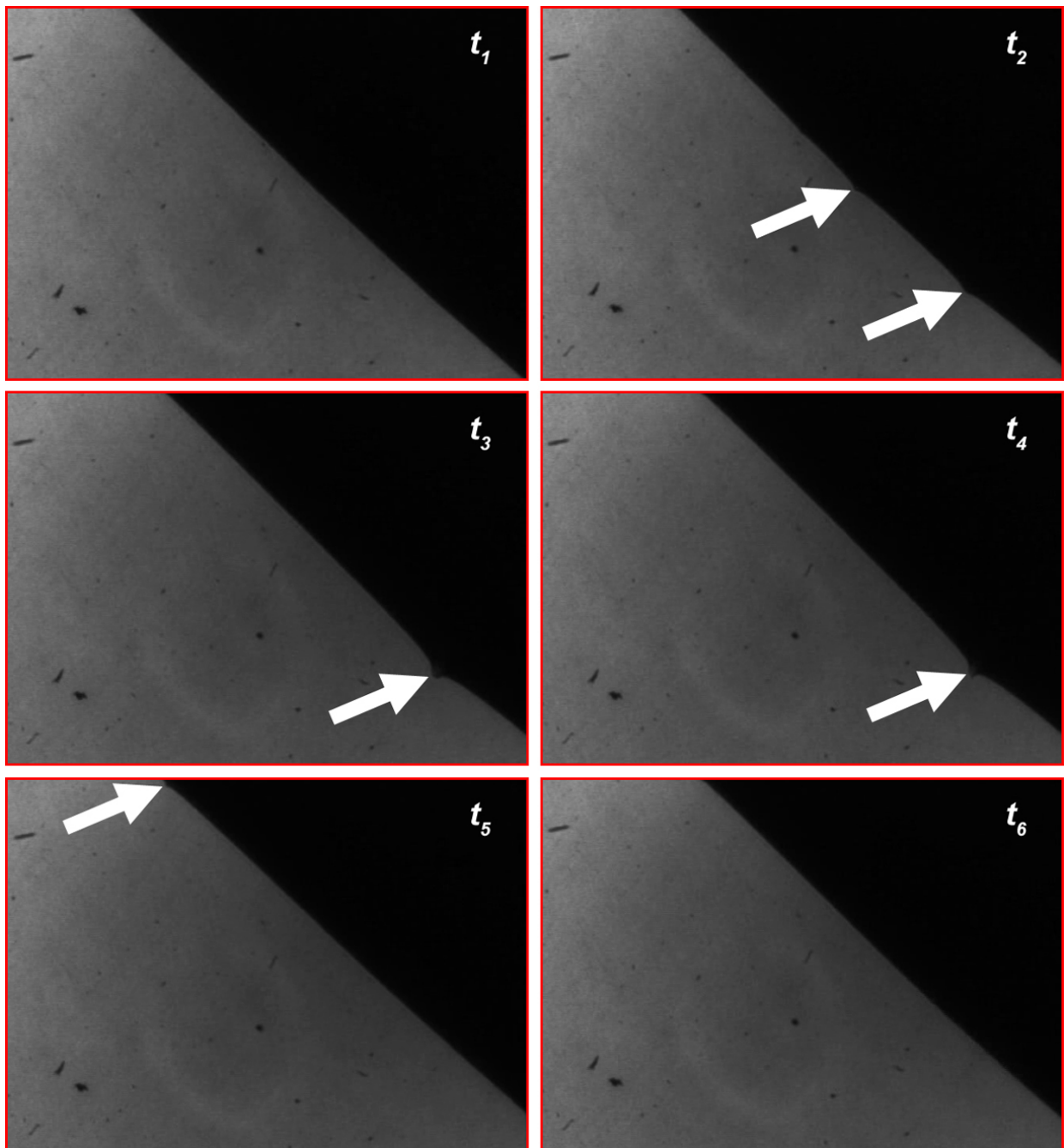


FIGURE A.1: Détection de micro-aspérités à la surface de l'otms. L'imagerie est réalisée en microscopie à contraste de phase, à l'aide d'un objectif de grandissement $\times 100$. Les flèches blanches indiquent ces aspérités, révélées lorsqu'elles retiennent brièvement la ligne de contact d'une goutte d'eau qui s'évapore. Les marques sombres disséminées sur l'image (hormis la goutte de liquide) proviennent de l'objectif du microscope, et non de la lamelle : elles ne correspondent pas aux aspérités détectées à la surface du verre modifié.

Annexe B

Complément d'analyse AFM, cf. section 10.1

Les tableaux B.1 et B.2 exposent les résultats bruts du comptage des filopodes et des lamellipodes suivant le degré de déstabilisation des filaments d'actine par la cytochalasine-B, évoqués à la section 10.1 et résumés dans le tableau 10.1 (page 171).

TABLEAU B.1: Comptage des filopodes et des lamellipodes suivant les concentrations en cytochalasine-B et en DMSO contenues dans les milieux de culture (1).

	Neurite N°	# de Filopodes		Lamellipode [‡]	Distance [§] (µm)
		CC*	Neurite [†]		
Contrôle 1 ([CB]=0 µM, [DMSO]=0%)	1	2	3	oui	~15
	2	12	7	oui	~20
	3	3	2	oui	~15
	4	8	2	oui	~30
	5	10	0	oui	~40
	6	4	3	oui	~10
	7	22	2	oui	~10
	8	2	0	oui	~5
	9	6	0	oui	~30
	10	5	5	oui	~25
	11	6	1	oui	~30
Contrôle 2 ([CB]=0 µM, [DMSO]=0,1%)	1	5	0	non	>50
	2	2	0	non	>50
	3	4	1	oui	contact
	4	4	4	oui	~25
	5	6	2	oui	~30
	6	11	0	oui	~50
	7	0	9	oui	~30
	8	0	10	oui	~30
	9	5	0	oui	~20
	10	7	0	oui	~35
	11	17	5	oui	~40
	12	2	1	oui	~5

* CC = cône de croissance.

[†] Nombre de filopodes repérés non pas au niveau de la zone identifiée comme le CC, mais plutôt comme faisant partie du corps de la neurite.

[‡] Présence ou absence de structure(s) identifiée(s) comme lamellipode(s) (présence : oui, absence : non).

[§] Distance séparant la zone neuritique évaluée de la plus proche structure appartenant à une autre cellule (soma ou neurite).

Constatons simplement que pour les neurites générant un nombre conséquent de filopodes, ces derniers sont majoritairement repérés dans les cônes de croissance plutôt que le long du corps des neurites, c'est-à-dire là où les microtubules sont dans un état stable. Par ailleurs, la distance séparant les zones neuritiques évaluées des cellules voisines sur le substrat semble ne pas avoir d'influence déterminante sur le nombre de filopodes générés, ainsi que sur la présence ou l'absence de lamellipode au niveau du cône de croissance.

TABLEAU B.2: Comptage des filopodes et des lamellipodes suivant les concentrations en cytochalasine-B et en DMSO contenues dans les milieux de culture (2).

	Neurite N°	# de Filopodes		Lamellipode [‡]	Distance [§] (µm)
		CC*	Neurite [†]		
Test 1 ([CB]=0,5 µM [DMSO]=0,001%)	1	1	6	oui	>50
	2	1	6	oui	~5
	3	1	1	non	~40
	4	0	0	oui	~20
	5	1	3	oui	~30
	6	0	2	oui	~10
	7	0	0	oui	contact
	8	8	0	non	~15
	9	1	0	oui	~15
	10	1	1	non	~35
	11	1	1	non	~50
	12	1	3	oui	~35
Test 2 ([CB]=5 µM [DMSO]=0,01%)	1	1	0	non	~25
	2	0	0	non	~15
	3	2	0	non	~20
	4	0	0	non	>50
	5	0	1	non	~20
	6	0	0	non	>55
	7	0	0	non	~20
	8	2	0	non	contact
	9	0	0	non	~40
	10	0	0	non	~20
	11	0	1	non	~15
	12	0	0	non	>40
Test 3 ([CB]=50 µM [DMSO]=0,1%)	1	0	0	non	>50
	2	0	0	non	>50
	3	0	0	non	>50
	4	0	0	non	~70
	5	2	0	non	~40
	6	0	0	non	~10
	7	0	0	non	>50
	8	1	2	non	~40
	9	1	1	non	~30
	10	0	0	non	>50
	11	0	0	non	~50

* CC = cône de croissance.

† Nombre de filopodes repérés non pas au niveau de la zone identifiée comme le CC, mais plutôt comme faisant partie du corps de la neurite.

‡ Présence ou absence de structure(s) identifiée(s) comme lamellipode(s) (présence : oui, absence : non).

§ Distance séparant la zone neuritique évaluée de la plus proche structure appartenant à une autre cellule (soma ou neurite).

Annexe C

Reproduction de l'article publié dans *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*

L'article inclus dans les pages qui suivent résume les développements initiaux de ce travail de thèse, à savoir la mise en évidence de l'influence de la variation locale des énergies de surfaces dans la morphogénèse des cellules PC12. Les analyses de surface évoquées dans cet article sont concises. Elles consistent à comparer les substrats d'eda' et de verre/PLL, dont les structures sont détaillées aux [sections 5.2](#) et [5.3](#) du [chapitre 5](#). L'essentiel de la publication est consacré à l'étude immunologique et morphologique des cellules PC12 cultivées sur les deux substrats évoqués, l'un présentant une distribution relativement homogène des énergies d'adhésion (verre/PLL), et l'autre une distribution plus hétérogène (eda').

Nous démontrons que les cellules PC12 adoptent un état de différenciation stable sur l'eda' en exprimant les protéines spécifiques des neurones que sont MAP1B et Tau. Nous discutons ensuite les résultats en fonction de paramètres tels que la force d'adhésion cellule-substrat, révélée par RICM, et le degré d'adsorption protéique sur les surfaces de verre modifiées, évalué par AFM. Toutes ces questions sont discutées au cours du [chapitre 8](#). Les figures contenues dans cet article et relatives aux immunomarquages correspondent à celles de la [section 8.2](#). Les figures relatives aux expériences d'interférométrie et à l'adsorption protéique correspondent à celles de la [section 8.3](#). La discussion sur le rôle éventuel des filopodes dans la détection par la cellule des gradients locaux dans les énergies d'adhésion correspond à l'analyse effectuée à la [section 9.3](#) du [chapitre 9](#).



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Influence of surface energy distribution on neuritogenesis

Guillaume Lamour^a, Nathalie Journiac^a, Sylvie Souès^b, Stéphanie Bonneau^a, Pierre Nassoy^c, Ahmed Hamraoui^{a,*}^a Laboratoire de Neuro-Physique Cellulaire (LNPC), EA 3817, UFR Biomédicale, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06, France^b Régulation de la Transcription et Maladies Génétiques, CNRS UPR2228, UFR Biomédicale, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France^c Unité Physico-Chimie Curie (PCC), CNRS UMR 168, Institut Curie, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2009

Received in revised form 18 March 2009

Accepted 3 April 2009

Available online 11 April 2009

Keywords:

PC12 cells

Neurite outgrowth

Surface energy

Surface chemistry

Self-assembled monolayers

Atomic force microscopy

ABSTRACT

PC12 cells are a useful model to study neuronal differentiation, as they can undergo terminal differentiation, typically when treated with nerve growth factor (NGF). In this study we investigated the influence of surface energy distribution on PC12 cell differentiation, by atomic force microscopy (AFM) and immunofluorescence. Glass surfaces were modified by chemisorption: an aminosilane, *n*-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylendiamine (C₈H₂₂N₂O₃Si; EDA), was grafted by polycondensation. AFM analysis of substrate topography showed the presence of aggregates suggesting that the adsorption is heterogeneous, and generates local gradients in energy of adhesion. PC12 cells cultured on these modified glass surfaces developed neurites in absence of NGF treatment. In contrast, PC12 cells did not grow neurites when cultured in the absence of NGF on a relatively smooth surface such as poly-L-lysine substrate, where amine distribution is rather homogeneous. These results suggest that surface energy distribution, through cell–substrate interactions, triggers mechanisms that will drive PC12 cells to differentiate and to initiate neuritogenesis. We were able to create a controlled physical nano-structuration with local variations in surface energy that allowed the study of these parameters on neuritogenesis.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Neuronal differentiation is critical to nervous tissue regeneration after injury. The initiation and guidance of a neurite rely on extracellular signals, especially on cell adhesion substrates. Hence, it is of particular interest to unveil the substrates characteristics that are effectively sensed and translated into neurite extension. The pioneering studies of Letourneau and others showed that adhesion on a substrate is critical for neurite extension [1–3]. These studies gave rise to a model in which interaction of transmembrane proteins with molecules of the extracellular matrix (ECM) is translated, through a set of actin-binding proteins, into effects on the microfilamentous cytoskeleton. This molecular mechanism leads to the generation of a tension exerted against the cell membrane, which allows neurite outgrowth with the formation and stabilization of point contacts in the growth cone of primary neurons [4] and of PC12 cells [5].

PC12 cells, though not being primary neuronal cells, express the transmembrane TrkA and p75 receptors to nerve growth factor (NGF) [6], and differentiate into a neuronal phenotype when challenged by appropriate NGF concentrations [7]. This ability makes them a good model to study neuronal differentiation mechanisms,

and thus axonal regeneration. Different kinds of stimuli can trigger PC12 cell differentiation. First, NGF-addition to the culture medium elicit differentiation either by activating the synthesis of proteins, which associate with the actin/microtubule cytoskeleton, including Tau [8,9] and MAP1B [9], or by activating a signalling cascade pathway, including IκB kinase complex [10]. Second, in NGF-free medium: ECM proteins used as culture substrates induce differentiation, either a combination of different collagen types associated with proteoglycans, glycosaminoglycans, fibronectin and laminin [11] or ECM derived from astrocytes [12]. Third, in NGF-free medium as well, PC12 cells were observed to grow neurites either after electric stimulation [13] or when cultured on electroactive surfaces [14].

Gradients of soluble molecules, including calcium [15] and neurotrophic factors [16], influence neurite outgrowth through the growth cone, which recognizes and transduces a combination of signals into a specific trajectory towards target cells. Yet the contribution of the physical cues on PC12 cell differentiation remains poorly understood and few studies addressed substratum physical influence. The influence of a gradient at large scale (4.24 mm × 4.24 mm) in surface energy was studied by Murnane et al. [17], and showed that neurites of PC12 cells are preferentially initiated in directions of changing adhesion, under NGF treatment. Other studies showed that the topography of the underlying culture substrate, at smaller scales (<1 μm), acts in cooperation with NGF to modulate neuritogenesis in PC12 cells [18,19]. In addition,

* Corresponding author. Tel.: +33 0142862130; fax: +33 0142862085.
E-mail address: ahmed.hamraoui@parisdescartes.fr (A. Hamraoui).

biomaterials, such as modified silicon nanoporous membranes, induce changes in PC12 cell morphology, in presence of NGF [20]. Thus, PC12 cells seem spatially aware of nanoscale structures onto which they are plated. It has been suggested that filopodia may be the “sensors” of the substrate nanotopography [19].

In our study PC12 cells were cultured on physically modelled surfaces, by modifying chemically glass coverslips using NH_2 - and CH_3 -terminated trialkoxysilanes. These molecules form covalent bonds with the silica surface [21] thus providing relatively stable surfaces, known as self-assembled monolayers (SAMs) or silanized surfaces. These surfaces have proved [22] to be an alternative to biopolymers like poly-L-lysine (PLL), a standard neuronal cell-adhesion substrate [23]. PLL is adsorbed on glass coverslips by physisorption and it is generally assumed to promote a “non-specific” interaction with the external surface of the cells, since specific lock-and-key mechanisms are absent. SAMs form a class of surface whose properties can be monitored at the molecular scale, and thus serve as model surfaces for cell–surface and protein–surface interactions. For example NH_2 -terminated SAMs modulate morphological development of hippocampal neurons [24] and of endothelial cells [25].

Here, we present a new kind of stimulus that triggers PC12 cell differentiation: specific physical properties of the substrate, at sub-micrometer scale. We compare surface properties of biopolymers-coated and of silanized glass coverslips and we show that, beyond surface chemistry, the distribution of physical cues has a clear impact on neuritegenesis in PC12 cells in NGF-free medium. In addition, immunofluorescence was conducted to assess the changing effects of the different substrates on PC12 cell cytoskeleton. The strength of the adhesion that PC12 cells established with the substrates was evaluated by interferometry, to characterize cell–substratum interfaces in cell culture conditions. Then we evaluated the possible influence of serum proteins adsorption on surface properties, using the fluid mode of the atomic force microscope (AFM).

2. Materials and methods

2.1. Surface modifications

Prior to use, glass coverslips (30 mm-diameter and $100\ \mu\text{m}$ -thick, from Menzel-Glazer) were treated as follow. They were cleaned by ultrasound, 20 min in ultrasonic bath of CHCl_3 , followed by immersion in piranha solution (3:1 (v/v) concentrated sulphuric acid/40% hydrogen peroxide) (caution: piranha solution is extremely corrosive and can react violently with organic compounds), then thoroughly rinsed with deionized water and dried under a nitrogen stream. Modified surfaces were obtained by immersing clean glass coverslips into a solution 2% *n*-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine (EDA) (Acros Organics, 97%), 94% methanol (Carlo Erba Reagents, 99.9%), 4% deionized water, 1 mM acetic acid (Carlo Erba Reagents, 99.9%) [24], during approximately 24 h, at room temperature in an ambient atmosphere. They were then rinsed in methanol and either dried under a nitrogen stream, prior to surface characterisation by atomic force microscopy (AFM), or allowed to dry under a laminar flow hood, prior to cell culture. EDA modifies glass coverslips through chemical bonds. In our hands, surface modification process also leads to a surface on which EDA forms “patches” by self-polymerization, due to an amount of water, here 4% in solution, that is in excess compared to what the reaction between the molecule and the silica surface would require [21]. In addition to EDA, two other trialkoxysilanes, (aminoethylaminomethyl)phenyltrimethoxysilane (PEDA) (ABCR, 90%) and hexyltrimethoxysilane (HTMS) (ABCR, 97%), were used to modify clean glass coverslips, by the same method. Control surfaces were prepared by coating glass coverslips with biopolymers:

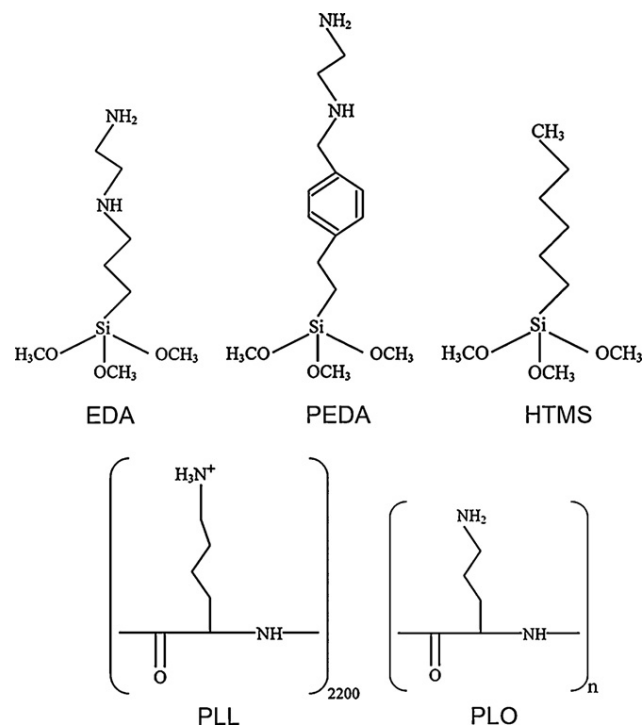


Fig. 1. Sketches of molecules used to modify the surfaces. EDA, PEDA and HTMS were grafted onto clean glass surfaces (coverslips of 35 mm in diameter) by chemisorption in liquid phase. Each of these three molecules contains three hydrolysable functions that allow polycondensation, thus giving the surface a specific physical nanostructure, responsible for a surface energy distribution that is heterogeneous. Contrary to these silanes, PLL and PLO do not form covalent bonds on glass. Hydrogen bonds (plus putative electrostatic bonds for PLL) allow for covering of glass surfaces in a more homogeneous manner.

PLL (PLL solution, 0.01% in water, Sigma) or poly-L-ornithine (PLO) (PLO solution, 0.01% in water, Sigma). Coating was performed on clean glass coverslips, sterilized in a UV chamber, by immersion in PLL or PLO solution, for 1 h at 37°C . Coated coverslips were then either rinsed in sterile water prior to cell culture, or quickly rinsed in deionized water and dried under a nitrogen stream prior to air-imaging AFM experiments. EDA, PEDA, HTMS, PLL and PLO molecules are represented in Fig. 1. Non-modified clean glass surfaces proved to be unsuitable experimental control as cells did not attach on such surface: although plated at the same density as on silane-modified or biopolymers-coated glass coverslips, PC12 cells adhered poorly and then detached from the surface by 48 h. Therefore, we used as experimental control the standard protocol of PC12 cells seeding on PLL-coated coverslips, treated or not by NGF.

2.2. Surface characterization

2.2.1. Contact angle measurements

To measure the contact angle at a liquid/solid interface, the most direct method is to capture, with a camera, an image of the profile of a drop on a solid surface. Images were captured with a high-resolution black and white video camera mounted on a microscope and monitored by a PC. Then, the images were processed with an edge detection algorithm to determine the profile of the drop. Comparison of the profile with the Laplace equation, which is valid for all free interfaces, allowed to calculate the contact angle.

2.2.2. AFM imaging

All surfaces prepared as described above were analyzed using a Digital Instruments AFM in air tapping mode, with the sur-

faces freshly prepared, rinsed with main solvent (methanol for trialkoxysilanes, deionized water for biopolymers) and dried under a nitrogen stream. Experiments were performed with a RTESP tip cantilever, of which spring constant is 40 N m^{-1} . To evaluate possible modifications of surfaces topographic properties after cells were plated in culture medium containing fetal bovine serum (FBS), we also analysed these surfaces in our experimental conditions, after 5–6 days of culture, using the fluid tapping mode of the AFM. In this case, we used MLCT tip cantilevers, of which spring constant are 0.01 N m^{-1} , 0.02 N m^{-1} and 0.03 N m^{-1} . The root-mean-square (rms) roughness of the surfaces, evaluated for regions of $\sim 1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$, was measured by AFM software Nanoscope (Digital Instruments).

2.3. Cell culture

PC12 cells, a standard model for neuronal differentiation analysis [7], were obtained from ATCC (CRL 1721). PC12 cells were routinely maintained in T25 tissue culture flasks (Falcon) coated with PLL, in DMEM + glutamax medium supplemented with 5% FBS (Hyclone), 10% horse serum (HS) (Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Invitrogen) and 1% antibiotic (penicillin, streptomycin) (Invitrogen) (medium 1) at 37°C in a 5% CO_2 cell incubator. Medium was renewed every 2–3 days. Subculturing was done when 90% of confluence was reached, after trypsin-EDTA treatment (Invitrogen). In experiments, PC12 cells were cultured using passage numbers 7–17, in medium without HS (medium 2) to reduce cell proliferation, plated at a density of $\sim 5 \times 10^3 \text{ cm}^{-2}$ on glass coverslips modified by trialkoxysilanes (EDA, HTMS, or PEDA) or on glass coverslips coated with PLL or PLO. Coverslips were laid down in plastic Petri dishes (35 mm-diameter Falcon 350001 boxes), making a total of $\sim 5 \times 10^4$ cells per dish at the time of plating. In control experiments, culture medium was supplemented with 100 ng mL^{-1} NGF (NGF-7S, from mouse submaxillary glands, Sigma): medium 3 (i.e. medium 2 + NGF). In this case, PC12 cells were allowed to attach to substratum in medium 1, replaced by medium 3 after 24 h. Medium 2 and medium 3 (2 mL/dish) were renewed every 2 days. Renewing medium of PC12 cells cultured on glass coverslips was done very gently, because these cells easily untied from substratum when submitted to a mechanical stress.

2.4. Cell imaging

2.4.1. AFM

PC12 cells cultured on EDA-modified glass coverslips were fixed using glutaraldehyde (2% in PBS) at room temperature during 20 min. Then cells were washed twice with PBS for 5 min, quickly rinsed with deionized water to remove salts and then dried under a nitrogen stream. AFM air-tapping mode was performed with a RTESP tip cantilever. The system includes an integrated optical microscope, allowing prepositioning of the AFM tip over the cells. Section analyses were made using the AFM software.

2.4.2. Immunofluorescence

PC12 cells were cultured on glass coverslips modified with EDA, PEDA, HTMS or PLL. Cells seeded on a PLL substrate were cultured with or without NGF. After 6 days of culture, cell populations were stained with anti-MAP1B (Sigma) and with Tau5 (Merck Chemicals, UK). Cells were fixed using 3.7% formaldehyde in PBS for 15 min and then permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS/0.1% bovine serum albumin (BSA) for 20 min. All washes, blocking steps, and antibody dilutions were performed using 0.1% BSA, 0.01% Triton X-100 in PBS. After cell fixation and permeabilization processes, primary antibodies, Tau5 (diluted 1:100) and anti-MAP1B (diluted 1:600) were incubated overnight at 4°C , secondary Cy3-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch, UK) was incubated for 2 h

at room temperature. DNA was stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) at $1 \mu\text{g/mL}$ for 30 min. F-actin was stained with phalloidin coupled to Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) at 5 units/mL for 1 h. Cells were finally extensively washed in PBS and mounted in a Mowiol solution. Observation was done with a Nikon Eclipse E600 epifluorescence microscope coupled to a camera.

2.4.3. Interferometry

The reflection interference contrast microscopy (RICM) [26] is the most satisfactory technique to visualise cell adhesion areas [27]. The image is formed by interference of light reflected from the surface of the adhering cells and of light reflected from the functionalized substrate. Thus adhesion zone is defined by a dark patch. The attachment of cells on EDA and on PLL was evaluated after 5 days of culture by RICM (inverted Olympus IX 71 equipped with $100\times$ apochromat objective, interference filter at 546 nm, and digital camera [Roper HQ]). RICM images were taken within 30 min after cells were brought out of the cell incubator.

3. Results

3.1. Surface physical properties of EDA-modified and of PLL-coated glass coverslips analysed by AFM and by contact angle measurements

Chemisorption of trialkoxysilanes on a silica surface is made by polycondensation, leading to a heterogeneous surface phase, when the solvent solution contains more than the traces amount of water necessary for adsorption reaction to occur. This excess of water allows for quick hydrolysis of methoxy groups catalysed by acetic acid, that occurs before and during chemical adsorption on the silica surface. As a result, the molecule self-polymerizes through Si–OH groups, condensed into siloxane bonds, and chemically binds the silica surface through the same reaction. As shown in Fig. 2a, the AFM analysis of a glass surface modified by EDA indicates the presence of scattered "patches" formed by aminosilane aggregates, reflecting the heterogeneity of the adsorption. Due to both the highly disordered state of the aminosilane on the surface and the hydrolysis of non-bonded terminal methoxy groups, it is probable that the surface presents a chemical pattern that is mostly a glass-like structure (Si–OH) with heterogeneous distribution of terminal amines. This pattern is represented by a sketch on Fig. 3a.

Wetting experiments on this surface were performed using water and polydimethylsiloxane (PDMS). We found that the contact angle was 55° for water and complete wetting for PDMS. For water, advancing and receding contact angles were 63° and 41° , respectively, in agreement with the roughness observed by AFM. Assuming that the clean glass is completely wetted by water, it is clear that we have a heterogeneous distribution of surface energies, oscillating between 22 mN m^{-1} (PDMS surface tension) and 72.8 mN m^{-1} (water surface tension). In other words, local values of the critical surface energy [28] are:

$$22 \text{ mN m}^{-1} < \gamma_c^{\text{EDA}} < 72 \text{ mN m}^{-1}.$$

As a result the surface exhibits nanoroughness combined to local gradients in surface energy, whether lowest areas (Fig. 2a; in dark) correspond to bare glass or lower EDA-layer. In the latter case, the concentration of NH_2 groups would likely be higher in the upper EDA-aggregates than in the lower EDA-layer (see the appendix that provides further analysis on surface characterization).

Fig. 2b shows a topographic AFM image of a glass coverslip cleaned with piranha and coated with PLL. Clean glass surfaces, with both Si–O[−] and Si–OH groups, are partially negatively charged, allowing PLL, a positively charged polymer, first to form electro-

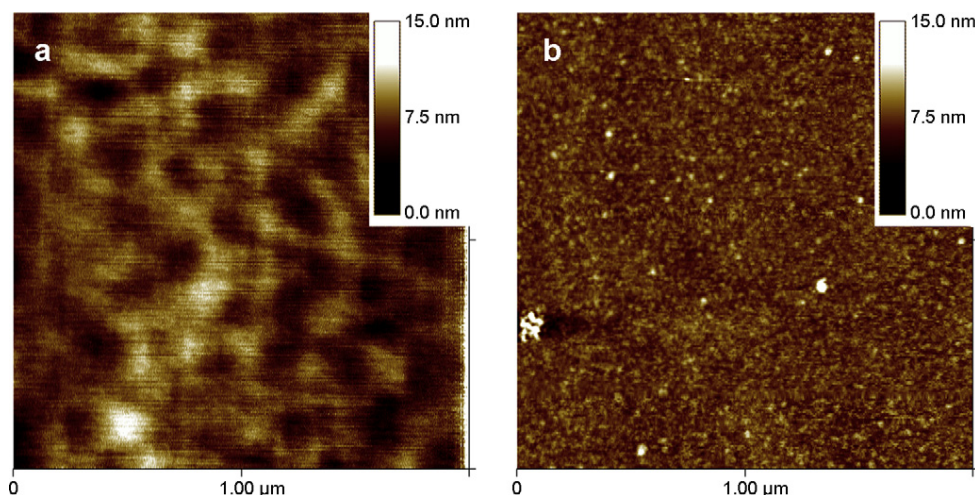


Fig. 2. (a) AFM imaging of a glass surface modified with EDA. Noticeable nanoroughness results from the heterogeneous adsorption of EDA. (b) AFM imaging of a silica surface coated with PLL. The surface is smoother than the EDA-surface, suggesting that the distribution of NH_2 groups is more homogeneous.

static bonds in addition to hydrogen bonds with the silica surface, and second to act as a repulsive for other PLL chains, preventing PLL multilayer formation. Consequently PLL forms a very thin monolayer (around 15 Å-thick [24]) when coated on a clean glass coverslip, with evenly distributed terminal-amine groups pointing outward from the surface. As shown on Fig. 2b the PLL surface is smoother than the EDA one (Fig. 2a), suggesting that the distribution of NH_2 groups is more homogeneous in the PLL surface.

We found a contact angle of 0° for a PLL-coated glass coverslip, using a drop of water. This is in agreement with a close packing of hydrophilic terminal amines, as represented on Fig. 3b.

3.2. Differential behaviour of PC12 cells on EDA-modified surfaces versus PLL control surfaces

PC12 cells cultured on EDA-modified glass coverslip undergo neurites expansion in NGF-free medium (Fig. 4a). After 4–6 days of culture, neurite outgrowth is initiated in random directions from most of the isolated cells. Neurites extend up to 150 μm and over 25 μm in about 20% of isolated cells ($N=116$). After 12 days of culture, 60–80% isolated cells display neurites over 25 μm long. When PC12 cells are plated onto PLL-coated glass coverslips in a NGF-free medium, no significant neurite initiation process can be observed (Fig. 4b), indicating that cells did not start neuritogenesis and thus did not stop proliferating.

PC12 cells in culture tend to form small colonies that can be observed indistinctly on glass-EDA or on PLL. This comes from PC12 cell propensity to form more cell–cell contact than cell–substrate contact [29]. Even when plated at low density (here: $5 \times 10^3 \text{ cm}^{-2}$), cells tend to form colonies that increase in size over time. PC12 cells trapped in a colony do not have the same behaviour as isolated PC12 cells. Such cells do not grow neurites, whatever the substrate and whether NGF is added or not. In particular, PC12 cells in colonies formed on PLL substrate in presence of NGF, do not grow neurites, while isolated PC12 cells do. In agreement with the literature [7,30], PC12 cells extended neurites on a PLL substrate when medium was supplemented with appropriate NGF concentration, providing they are not trapped in a colony (Fig. 4c).

Altogether, our results indicate that silane-modified surfaces allow neuritogenesis, as does NGF when PC12 cells are seeded on bio-substrates; however, it seems not to impede cell division. Both PLL and EDA surfaces display similar chemical properties, with terminal amine groups pointing out of the surface, yet they differ in their physical properties. Heterogeneous EDA surface exhibits both nanoroughness and local gradients in surface energy that seem to be a critical criterion in initiation of neurite outgrowth. The surface being chemically modified and its thickness lower than 20 nm, the rigidity of the substrate should not affect the observed neuritogenesis considering that biopolymer control surfaces are very thin as well.

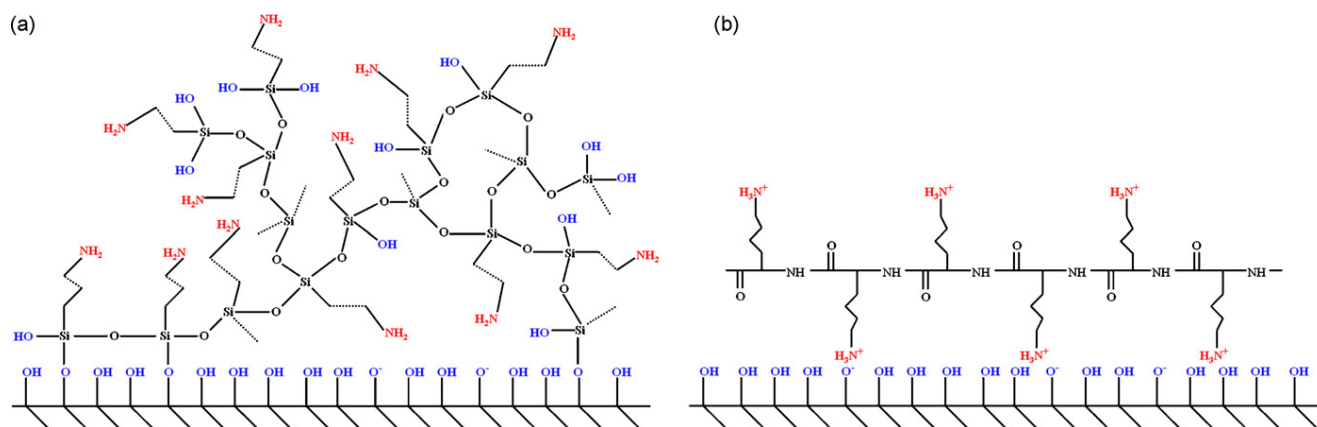


Fig. 3. (a) Sketch representing chaotic polymerization of EDA on a clean glass surface. (b) Sketch representing coating of PLL on a clean glass surface.

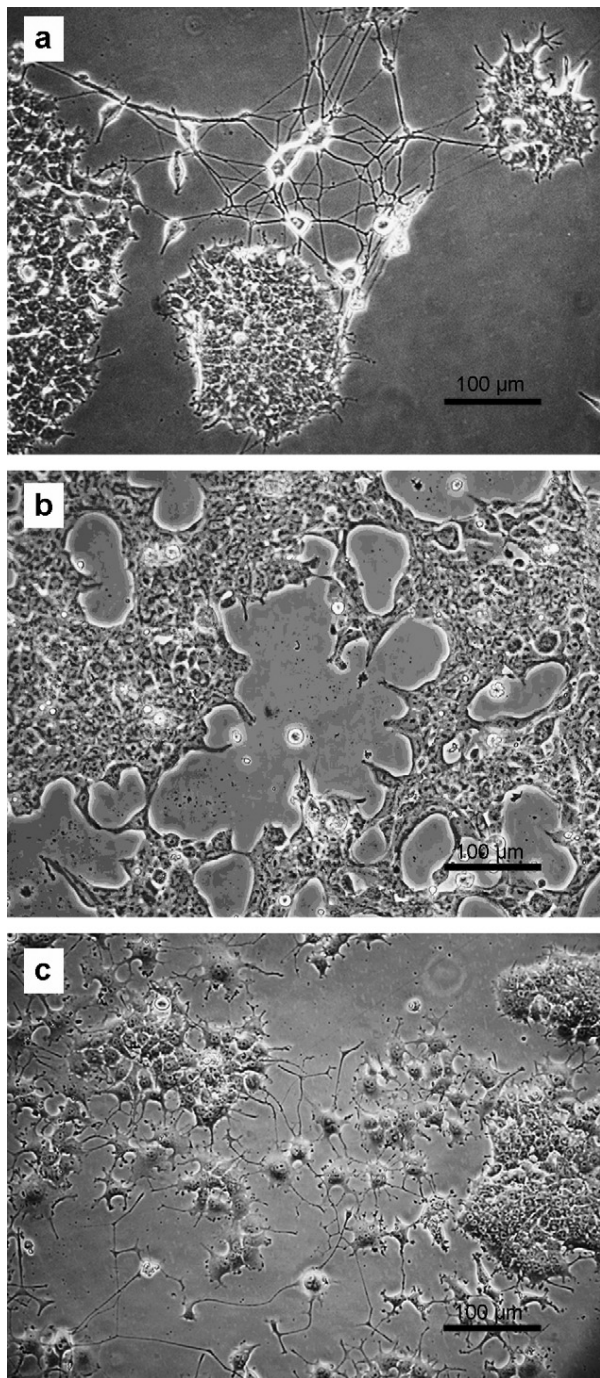


Fig. 4. Glass-EDA surface triggers neurites formation of PC12 cells in absence of NGF treatment (a), but PLL-coated glass coverslip do not (b). In a medium supplemented with NGF, PC12 cells initiate neuritogenesis when plated onto PLL-coated glass coverslip (c). All images were obtained 6 days after seeding.

3.3. PEDTA and HTMS-modified glass coverslips triggered neuritogenesis in PC12 cells; conversely PLO-coated glass coverslips did not initiate such outcome

To evaluate the influence of the chemical versus physical properties of the substratum toward neuritogenesis, and get further insights into physical properties importance, an additional set of surface modifier molecules were tested. Surface modification was performed with two hydrophobic silanes, EDA structurally-related

molecules: PEDTA and HTMS. Like EDA, these molecules contain three hydrolysable functions ($-OCH_3$) connected to a silicium element (Si), thus they can undergo the same polycondensation mechanism as EDA in 4% water solution. Consequently, modifying glass with PEDTA, HTMS or EDA results in the same type of nanoroughness, and gives rise to surfaces with heterogeneous distribution of surface energy. Yet, PEDTA and HTMS differ from EDA in their chemical properties: though not suppressing the local gradients, the phenyl group in PEDTA reduces the surface energy, and the methyl terminal group in HTMS should render the surface more hydrophobic, providing the quantity of adsorbed molecules is similar to that of EDA. In spite of these differences, PEDTA and HTMS modified surfaces triggered the same cellular behaviour, that is PC12 cells underwent neuritogenesis (data not shown).

Although surface charge might play a role in neuronal cell behaviour [31], it is unlikely to be the case in our experiments, as EDA and PLL expose almost the same ratio of protonated/unprotonated amines after coverslips soaking in DMEM [24]. Yet, a biopolymer that is not charged was also tested: PLO, which holds as side-chain three CH_2 groups preceding a terminal amine (Fig. 1). PC12 cell behaviour was similar on PLO modified surface to that on PLL (data not shown). Although we did not measure the actual width of the layer formed by PLO on a glass coverslip, we assume that the adsorption is likely to be as homogeneous as with PLL.

All in all, these results strengthen the hypothesis that physical nature of the substrate, that is specifically nanoroughness combined to local gradients in surface energy, is critical to differentiation onset.

3.4. Expression and distribution of microtubule-associated proteins (MAPs) in PC12 cells on silane-modified substrates and on PLL-coated substrates

A criterion to evaluate neuronal differentiation is a high level of expression of neuronal markers proteins like MAP1B or Tau. MAP1B is a neuron-specific protein involved in microtubule assembly. NGF treatment stimulates MAP1B expression together with PC12 cells differentiation [9], when cells are plated onto standard PLL-coated substrate. As expected, high level of fluorescence signal reflecting MAP1B concentration was detected in cells that underwent neurite outgrowth, typically in isolated cells and not in cells trapped in colonies (Fig. 5). Significantly high levels of MAP1B and neuritogenesis were triggered not only by NGF treatment on PLL substrate but also by glass-EDA substrate. Conversely fluorescence signal appears overall weaker in cells seeded on PLL substrate but not stimulated by NGF. These results provide further evidence that the surface properties of EDA-modified glass coverslips can trigger neuronal differentiation of PC12 cells. These results also confirm that NGF addition to the culture medium is not strictly required to observe neurite outgrowth, or enhanced levels of MAP1B expression, that is differentiation of PC12 cells.

Tau localisation was examined in PC12 cells seeded on various surfaces and treated or not by NGF (Fig. 6). As for MAP1B, NGF treatment stimulates Tau expression in PC12 cells. Tau stabilises microtubules, by shifting the microtubule polymerisation/depolymerisation kinetics in favour of addition of new subunits, thus stimulating microtubule growth [32]. Tau also associates with filamentous actin and is involved in growth-factor-induced actin remodelling in differentiating PC12 cells [8]. As previously reported, PC12 cells seeded on PLL and treated with NGF grow neurites and express Tau, as evidenced by the high level of fluorescence in the cell body and along neurites. A similar pattern of Tau localisation is depicted in PC12 cells, whether seeded on glass-

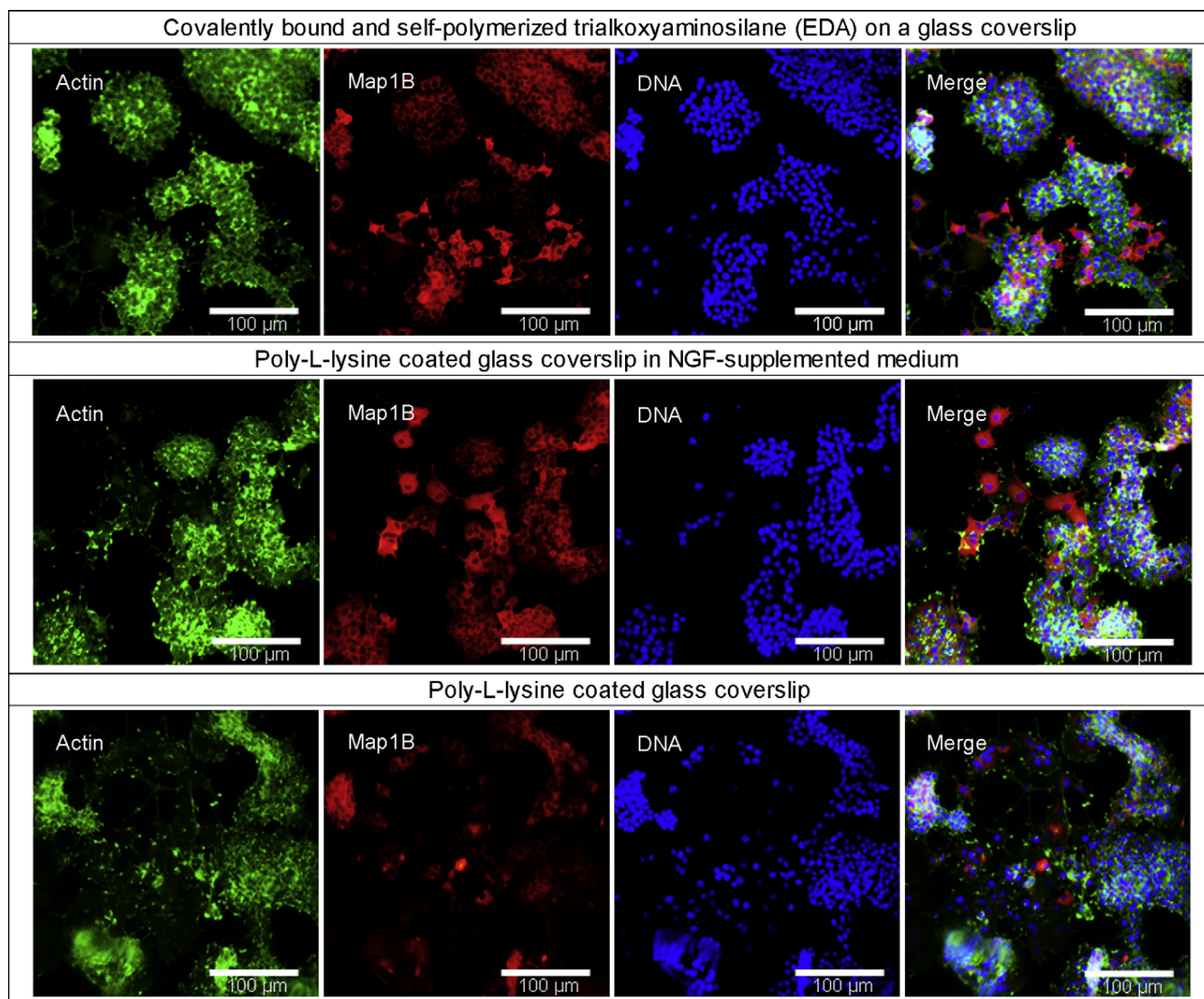


Fig. 5. MAP1B expression in PC12 cells cultured on glass-EDA substrate without NGF treatment, and on PLL substrate with and without NGF treatment. MAP1B signal is stronger in isolated cells and more cells display a strong signal, either on a glass-EDA surface in NGF-free medium or on a PLL surface in NGF-supplemented medium, than on a PLL surface in NGF-free medium. Observation was made with an epifluorescence microscope.

EDA, glass-PEDA, or glass-HTMS substrates, although not treated by NGF. Interestingly, Tau is displayed in growth cones (Fig. 6; plain arrows), and at branching/turning points of the neurites (Fig. 6; broken arrows), that is where microtubules are highly dynamic. These results indicate that cell–substrate interactions can mimic NGF effects, leading PC12 cells to start neuritogenesis. Yet, Tau fluorescence along neurites is higher and more evenly distributed in PC12 cells differentiated through NGF on a PLL substrate than on PC12 cells seeded on trialkoxysilanes-modified glass substrates (Fig. 6; oval). It might be inferred that although cell–substrate interactions can trigger neuritogenesis, it cannot fully substitute to NGF, that is not all the molecular mechanisms of cell differentiation are activated.

3.5. Filopodia are comparable in size to the aggregates of physically modelled surfaces that trigger neuritogenesis

We used AFM to image neurite edges and Digital Instruments software Nanoscope to analyse the sizes of filopodia. Fig. 7a shows a neurite tip of a PC12 cell growing on a glass-EDA substrate. This

image depicts a growth cone and a neurite local “bulb” which is three times the size (in height and in width) of the neurite immediately behind and ahead of it. This “bulb” corresponds to a spot of enhanced Tau fluorescence as depicted in immunofluorescence (Fig. 6; broken arrows). Fig. 7b shows a topographic image of the growth cone at the tip of the neurite. Numerous filopodia emerge from the growth cone. Fig. 7c shows one of these filopodia. Using the analysis functions of the AFM software we found that filopodia are comparable in size to the EDA domains of the substrate (Fig. 8). While filopodia have an approximate height of 40 nm on EDA-modified glass coverslips, the height of silane aggregates is typically comprised between 5 nm and 20 nm, with rms roughness oscillating between 1 nm and 3 nm (such variations are not surprising considering that adsorption is heterogeneous). Width of filopodia oscillates between 150 nm and 250 nm, that is comparable to the width of the silane aggregates, as observed on AFM images (Figs. 2a and 8b). Knowing that the cells emit filopodia as soon as they adhere to the underlying substrate, these results indicate that the local gradients in surface energy may be translated into neuronal differentiation signal through the motility of filopodia.

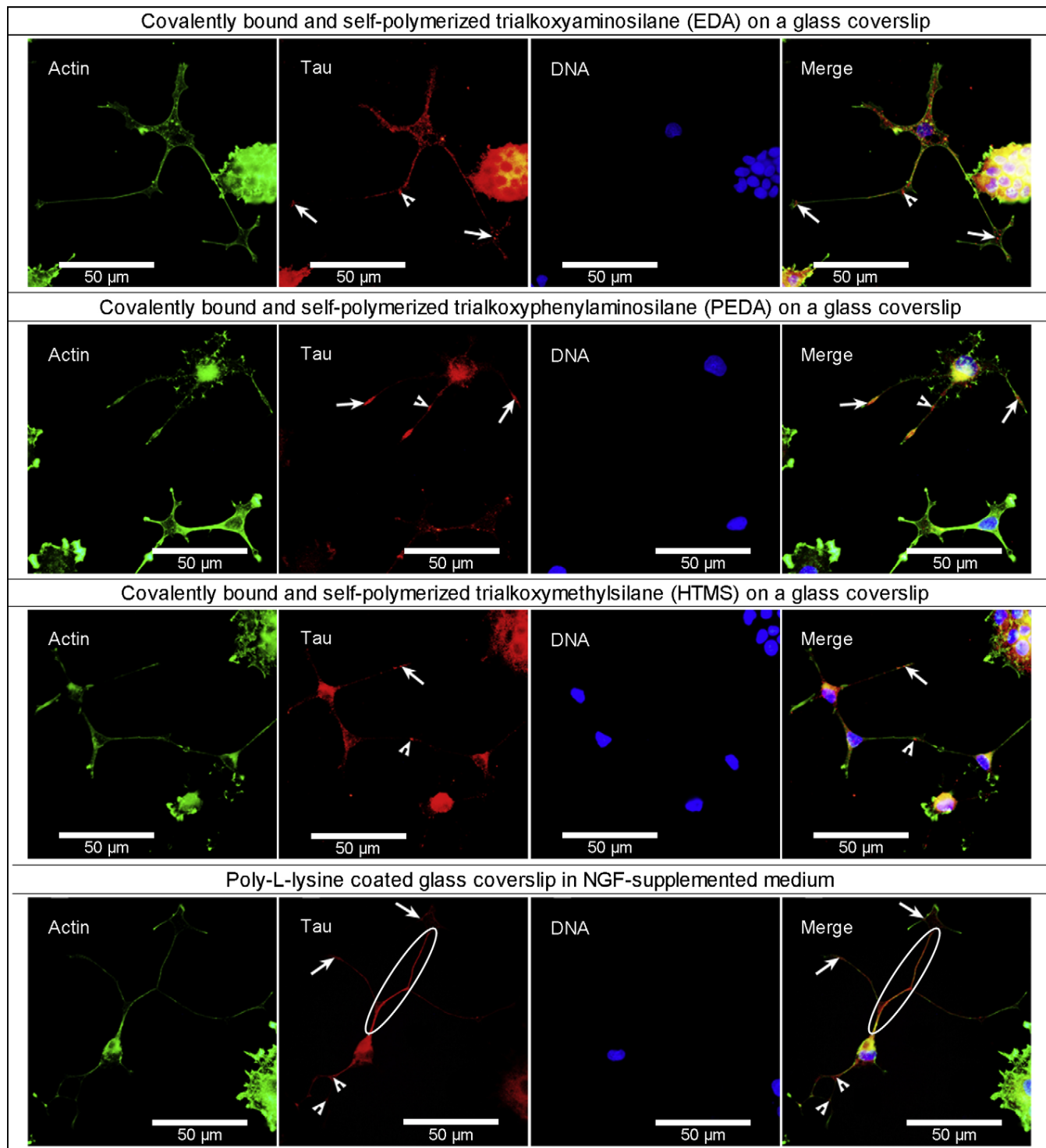


Fig. 6. Tau localisation in PC12 cells cultured on glass-silanes surfaces without NGF treatment and on PLL coated glass coverslip with NGF treatment. Arrows point local higher concentrations of Tau in growth cones (plain arrows) and at branching/turning points (broken arrows). Ovals indicate a high concentration of Tau widespread all along a neurite. Observation was made with an epifluorescence microscope.

3.6. PC12 cell adhesion is stronger on PLL-coated glass coverslips than on EDA-modified glass coverslips; the effect of serum-proteins adsorption on surfaces might be critical

Observation of cells by RICM allows to visualise as dark areas the regions of the adhering cell that are in close-contact to the substrate [27]. PC12 cells are found to be less adhesive on a

glass-EDA substrate than on a PLL substrate (Fig. 9). On glass-EDA, the growth cone at the neurite tip is the only cellular region appearing dark (Fig. 9a). In contrast, on PLL substrate most of the cell appears dark (Fig. 9b). This difference may be correlated to the distribution of NH_2 terminal groups, covering the surface more evenly in PLL substrate than on glass-EDA substrate. Considering that PC12 cells adhere poorly on silica surfaces, a weak adhesion on

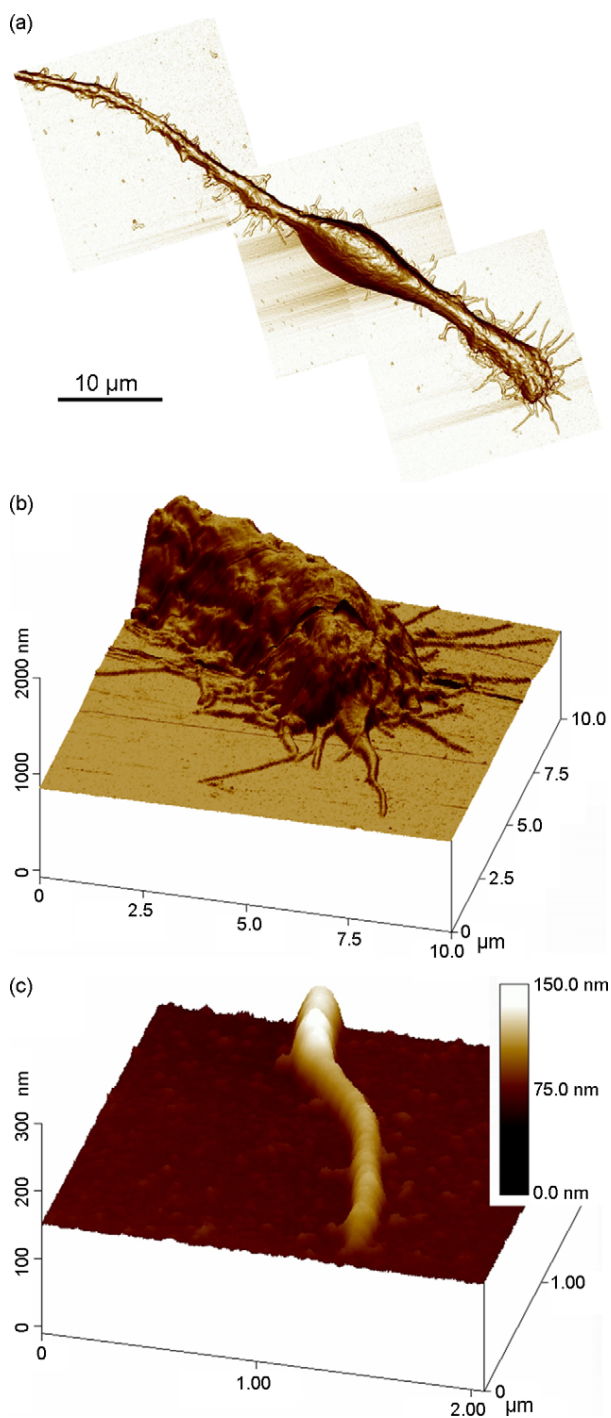


Fig. 7. AFM analyses of PC12 cells fixed with glutaraldehyde on an EDA-modified glass surface. (a) Image of the growing edge of a neurite. Plot type: illumination. (b) Topographic image of the growth cone of the neurite in (a). (c) Topographic image of a filopodia of the growth cone in (b).

glass-EDA support the hypothesis of this surface chemical pattern being mostly glass-like. Moreover, the nanoroughness of glass-EDA surface itself might loosen cell–substrate contacts.

Though RICM observations give credit to the fact that cells would directly sense surface chemistry, that is responsible for surface energy distribution, it is rather probable that cell–surface interactions are mediated by serum proteins interacting with the surface [33,34]. To test this hypothesis, analysis of surfaces in cell-culture conditions was made using the fluid-imaging mode of the AFM. The

PLL-coated surface displays increased roughness when imaged in culture medium (Fig. 10b) than in air (Fig. 2b). The rms roughness is typically less than 1 nm when imaged in air immediately after PLL-treatment of the glass coverslip (Fig. 2b). This value is similar to that of clean glass. Yet, in experimental conditions, that is 5 days after cell seeding, rms roughness is increased up to 3 nm, suggesting that some material has adsorbed on the surface. We believe that this adsorbed material corresponds to serum proteins, for example BSA or fibronectin. In contrast, nanoroughness of a glass-EDA surface is similar when imaged in culture medium (Fig. 10a) or in air (Fig. 2a). Therefore, more serum proteins seem to adhere on PLL substrate, where terminal amines are evenly distributed, rather than on glass-EDA substrate, though proteins like BSA [35] and fibronectin [36] were shown to adsorb on silica surfaces. As a result, nanoroughness of glass-EDA substrate does not seem to be affected by serum proteins adsorption and, hence, serum protein may not be the critical mediator of the surface energy distribution triggering PC12 cells differentiation.

4. Discussion

In this study, we manufactured culture substrates by specific chemical treatment of clean glass surfaces in order to obtain a physical nanostructure exhibiting a nanoroughness that generated local gradients in surface energy. We showed that PC12 cell differentiation was triggered on such surface in absence of NGF stimulation. Both neurite outgrowth and neuron-specific MAPs expression and localisation indicated that physical surface signals can mimic NGF treatment. AFM analysis revealed that the size of manufactured surfaces nano-structuration is comparable to that of filopodia emitted by PC12 cell growth cones. Therefore, we believe that filopodia could act as primary sensors not only of the cell chemical environment but also of the surface physical cues that will then be transduced and translated into differentiation signal.

Here, we point out that the influence of the physical cues of the substrate is critical to prompt PC12 cells differentiation, stimulating neuritogenesis. This is in agreement with previous reports showing that NGF is not necessarily required to initiate PC12 cells differentiation [11,12]. However, it is important to note that in our experiments, differentiated PC12 cells on trialkoxysilanes-modified glass substrates did not survive longer than 12–15 days, and that neurites lengths rarely exceeded 100 µm. This is to be correlated with a distinct Tau localization pattern in PC12 cells seeded on trialkoxysilanes-modified glass substrates, compared to PC12 cells differentiated through NGF on a PLL substrate. Thus, although not strictly necessary for triggering differentiation, NGF might be critical for PC12 cells to survive long-term in a differentiated state and to stabilize and further extend neurites.

Surface energy distribution seemed to affect the morphology of the extended neurites. Homogeneous distribution of terminal amines in PLL substrate allowed neurites to adhere more firmly than on glass–silane substrates. On PLL and under NGF treatment, extending neurites drew smooth bends (Figs. 4c and 6), suggesting that it established contacts with the substratum all along. Conversely, on glass-EDA substrate (Figs. 4a and 6), glass-PEDA and glass-HTMS (Fig. 6), extending neurites drew straightened lines, supposedly between adhesion points: from the cell soma to branching/turning points, and to growth cone. Between these adhesion points, that appear in dark in RICM observations, neurites either did not adhere, or adhered very weakly (Fig. 9a). It might suggest that the heterogeneity of the trialkoxysilanes-modified surfaces is not confined to sub-micrometer scale. One possibility is that adjacent aggregates of silanes congregated and formed better adhesion points. Filopodia might adhere briefly on areas providing weak adhesion, then extend to reach areas providing better support, and ultimately orientate neurite outgrowth in the corresponding direc-

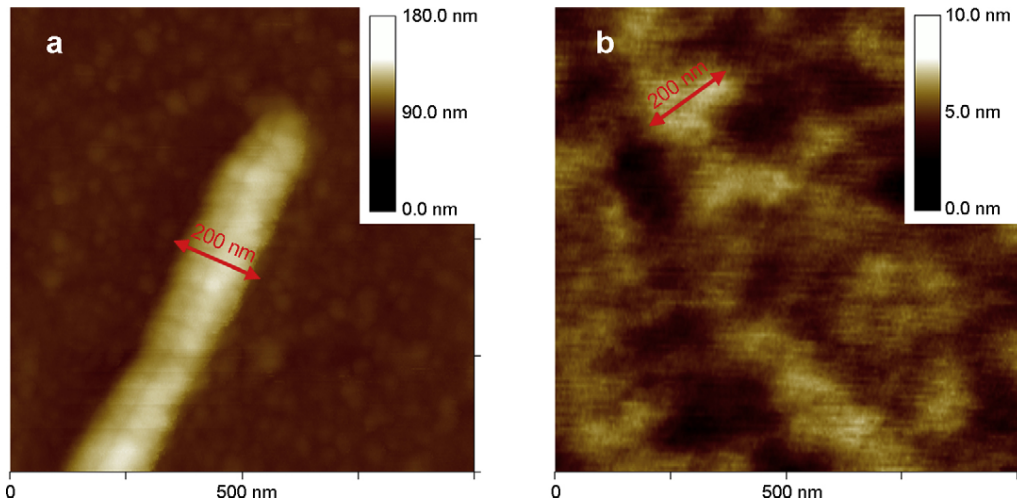


Fig. 8. (a) AFM image of a filopodia on a glass-EDA surface. The height of the filopodia is 40 nm. (b) AFM image of a glass-EDA surface (as in Fig. 1a, but scaled up to $1 \mu\text{m}^2$). EDA aggregates, responsible for both nanoroughness and local gradients in surface energy, have dimensions comparable in size to the filopodium.

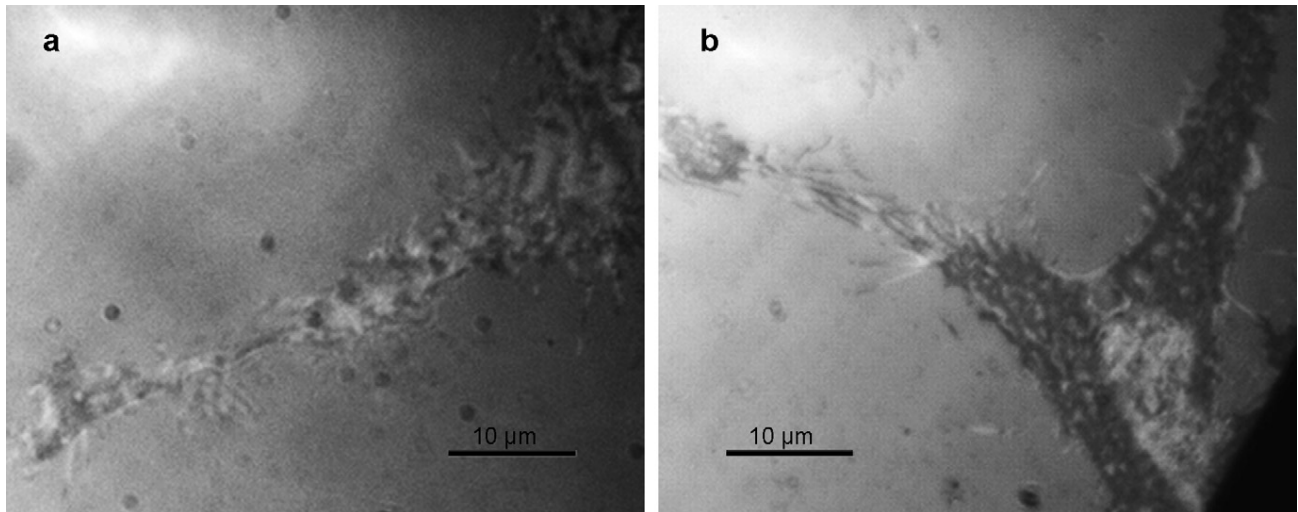


Fig. 9. RICM in cell culture conditions (in absence of NGF) representing parts of PC12 cells on an EDA-modified glass substrate (a) and on a glass coverslip coated with PLL (b).

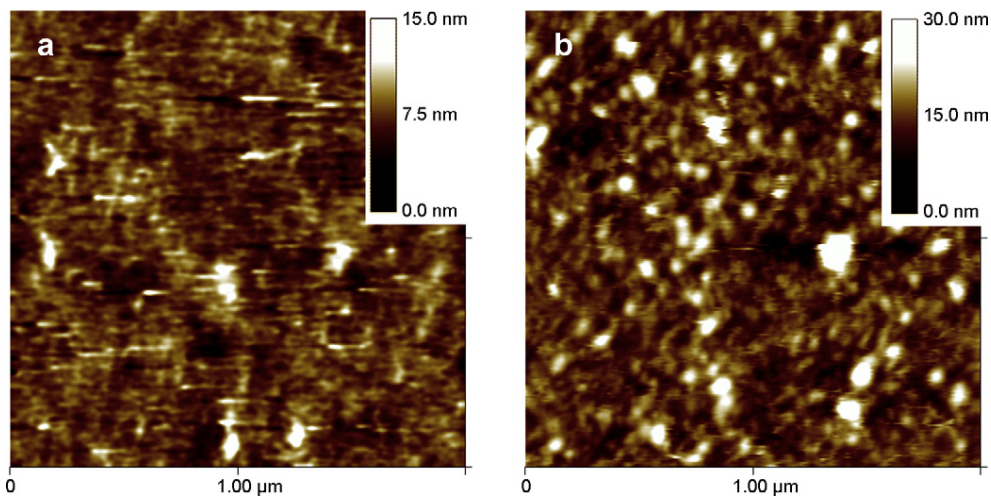


Fig. 10. AFM fluid-imaging in cell culture conditions, that is in a medium containing serum proteins but no NGF, representing an EDA-modified glass substrate (a) and a glass coverslip coated with PLL (b).

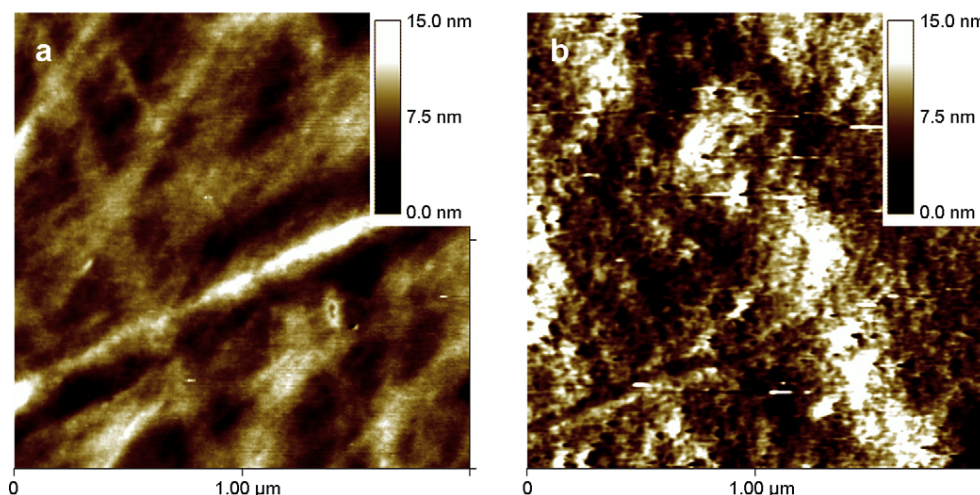


Fig. 11. AFM images of a plastic Petri surface coated with PLL in air (a) and in fluid 5 days after seeding, that is in cell culture conditions (b). Plastic fibers generate a rms roughness of 2–3 nm, but the morphology of the fibers differs from the morphology of the silane aggregates of a glass-EDA substrate (Figs. 2a and 10a).

tion. Thus, these physical cues seem to play a critical role in the actual guiding of growth cone. Certainly, chemical cues do cooperate in the axonal guiding [15,16].

Cell adhesion to substrate and cell growth can be modulated by serum protein adsorption on the substrate [37]. Obviously, potential contribution of serum proteins in cell adhesion will depend on their ability to adsorb on the surface itself. As previously reported in this study, serum proteins did modify PLL substrate nanoroughness, suggesting that they may participate in PC12 cell adhesion. Yet, they had no dramatic effect on the nanoroughness of glass-EDA substrate. Therefore, surface energy distribution by itself may be sufficient to trigger PC12 cell differentiation, independently of serum protein contribution. Alternatively, serum protein adsorption preserved initial nanoroughness, and in addition potentiated initial surface energy distribution. This potentiating effect might be a critical factor in triggering PC12 cell differentiation. Beyond protein adsorption, the fact that rms roughness of PLL substrate is increased in fluid conditions, without neuritegenesis being stimulated (in absence of NGF treatment), may suggest that topographical morphology, is more critical than rms roughness in eliciting PC12 cell differentiation. Usually PLL and PLO are coated on plastic Petri dishes, not on glass coverslips. Biopolymers like PLL and PLO should coat plastic Petri dishes the same way as glass coverslips: homogeneously. Plastic-Petri surfaces exhibit fibers that generate a rms roughness of 2–3 nm both in air and in fluid (Fig. 11), yet we did not observe neurite initiation on a plastic Petri surface coated with PLL in absence of NGF treatment (data not shown). It might indicate that neither the morphology of the roughness generated by plastic fibers, nor the morphology of layers of serum proteins formed on PLL-coated plastic Petri dishes, and on glass coverslips, are able to stimulate neuritegenesis. Consequently, both the size and the arrangement of the silane aggregates on the surface might be critical to generate specific surface energy distribution that may trigger PC12 cell differentiation.

Though our results indicate that the cell, through its filopodia (Fig. 8), may be able to integrate a combination of nanoroughness and local gradients in surface energy, the molecular mechanisms of the triggered signalling cascade are not yet identified. One strong hypothesis is that PC12 cells would react to surface properties by secreting factors contributing in building an environment favourable to neuritegenesis. One such secreted factor could be NGF. Yet, in our experimental conditions, NGF might not be secreted in sufficient amount as initial neuritegenesis is triggered, but long-term survival of differentiated cell is not guaranteed. Another

possibility is a modulation of extracellular Ca^{2+} [38] or intracellular Ca^{2+} in PC12 cells. According to the literature, depending on the culture substrate, filopodia can generate transient elevation of intracellular Ca^{2+} that is propagated back to the growth cone [39], a process that is involved in neurite outgrowth. Heterogeneous distribution in surface energy could trigger a Ca^{2+} signalling in filopodia. Consequently, it could trigger the activity of proteins, including Rac1, RhoA and Cdc42 GTPases, FAK+, β -integrins, paxillin and vinculin. In response to growth factors and/or substratum cues, these proteins modulate filopodia and lamellipodia assembly and disassembly, as well as the formation and stabilization of focal adhesions at their edges [4,5,40–42]. The question is now: what are the mechanisms and the proteins actually involved in this physical signalling, i.e. how surface energy distribution is transduced.

5. Conclusions

Our results disclose a clear connection between substratum physical cues and neuronal differentiation. Earlier experimental data demonstrating the influence of substrate on cell differentiation would gain in being reappraised in light of this new criterion (i.e. surface energy distribution), and, in turn, future experiments will have to challenge it. Accordingly, other systems than PC12 cells, such as primary neurons or astrocytes, may be dramatically affected by surface energy distribution. As a result, future design of biomaterials may integrate local gradients in surface energy as a mean to enhance nerve regeneration, for instance of hippocampal or cortical neurons. In addition, it will be interesting to investigate the mediators of the physical signals sensed by filopodia. In particular, it should be investigated whether PC12 cells can respond to physical cues only directly or also through components of the culture medium.

Finally, improved substrates displaying highly organised SAMs, with uniformly distributed surface energy, should be assessed for their supposed inability to stimulate differentiation. Such surfaces could be characterized using Fourier-transform infrared spectroscopy to quantify the material adsorbed on glass surfaces. Vibrational sum-frequency generation could be used to precise the organisation level of SAMs. Other possible substrates could be based on nanopillars displaying surface energy range that is comparable to that used in the present study. Thus, it should be possible to unveil what parameter in surface energy distribution triggers PC12 cell differentiation: whether it is surface concentration in termi-

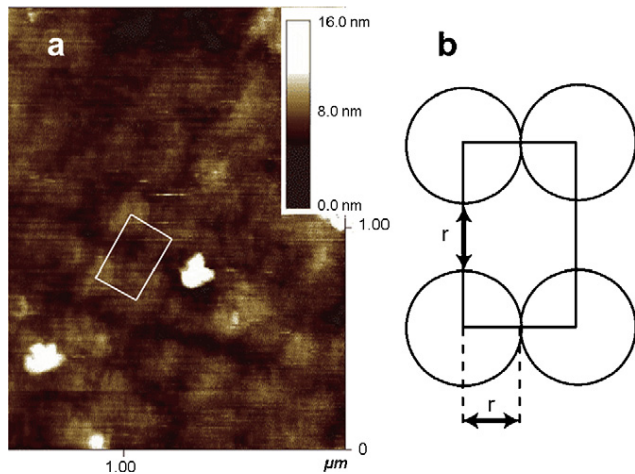


Fig. A1. This figure depicts a glass surface modified by EDA (a) as in Figs. 2a and in 8b (AFM air imaging) along with a schematic illustration (b) of the parameters used in the calculation of the EDA surface fraction.

nal amines/methyl and/or the alternation of OH and of NH_2/CH_3 groups, and/or the disposition of silane aggregates.

Acknowledgements

The present study was supported by: French Ministry of Research, Université Paris Diderot, Institut Fédératrice de Recherche (IFR95) – Université Paris Descartes, Région Ile-de-France. Thanks are due to C. Tourain for AFM assistance and JP. Balland for contact angle measurements. The authors appreciate productive discussions with H. Haidara and M. Nardin. The authors also thank P. Djian for lending his laboratory's cell-culture devices.

Appendix A

A.1. Calculation of energies of adhesion on glass-EDA surface and on clean glass surface

In order to evaluate the energy of adhesion of water (as an example) on glass-EDA surface and on clean glass surface, we used the Cassie–Baxter relation [43] to estimate the contact angle on the *pure EDA domains*:

$$\cos(\theta^*) = \Phi_1 \cos(\theta_1) + \Phi_2 \cos(\theta_2)$$

where $\theta^* = 55^\circ$ is the apparent contact angle, ϕ_1 and ϕ_2 are, respectively, the surface fraction of the glass and of EDA, and $\theta_1 = 0^\circ$ and θ_2 are, respectively, the contact angle of water on clean glass and on the *pure EDA monolayer* surface. To estimate the surface fraction $\phi_1 = 1 - \phi_2$ we used the dimension of the rectangle modelling the distance between EDA aggregates (Fig. A1). Inside the rectangle we have one circle with a πr^2 -area. Rectangle area was taken equal to $6r^2$. We obtained:

$$\phi_2 = \frac{\pi r^2}{2r \times 3r} = \frac{\pi}{6}$$

Finally we found:

$$\frac{\cos(\theta^*) - 1}{\phi_2} + 1 = \cos(\theta_2) \Rightarrow \theta_2 \approx 80^\circ.$$

This value means that EDA aggregates have a lower surface energy than the clean glass surface; consequently the associated

energy of adhesion of the pure EDA monolayer surface is less than the energy of adhesion of the clean glass surface. Now we can calculate the energy of adhesion of water on a pure EDA monolayer and on a clean glass surface:

$$W_{\text{EDA}} = \gamma_e(1 + \cos \theta_2) = 85.4 \text{ mJ m}^{-2}$$

and

$$W_{\text{glass}} = \gamma_e(1 + \cos \theta_1) = 145.6 \text{ mJ m}^{-2}$$

and the difference between the energies of adhesion on glass-EDA and on clean glass is:

$$\Delta E = |W_{\text{glass}} - W_{\text{EDA}}| \approx 61 \text{ mJ m}^{-2}.$$

References

- [1] P.C. Letourneau, Dev. Biol. 44 (1975) 92–101.
- [2] P.C. Letourneau, Dev. Biol. 44 (1975) 77–91.
- [3] D.M. Suter, P. Forscher, J. Neurobiol. 44 (2000) 97–113.
- [4] S. Woo, T.M. Gomez, J. Neurosci. 26 (2006) 1418–1428.
- [5] C.O. Arregui, S. Carbonetto, L. McKerracher, J. Neurosci. 14 (1994) 6967–6977.
- [6] T. Wehrman, X. He, B. Raab, A. Dukipatti, H. Blau, K.C. Garcia, Neuron 53 (2007) 25–38.
- [7] L.A. Greene, A.S. Tischler, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73 (1976) 2424–2428.
- [8] J.Z. Yu, M.M. Rasenick, FASEB J. 20 (2006) 1452–1461.
- [9] D.G. Drubin, S.C. Feinstein, E.M. Shooter, M.W. Kirschner, J. Cell Biol. 101 (1985) 1799–1807.
- [10] N. Azoitei, T. Wirth, B. Baumann, J. Neurochem. 93 (2005) 1487–1501.
- [11] D.K. Fujii, S.L. Massoglia, N. Savion, D. Gospodarowicz, J. Neurosci. 2 (1982) 1157–1175.
- [12] J.R. Wujek, R.A. Akeson, Brain Res. 431 (1987) 87–97.
- [13] M. Aizawa, S. Koyama, K. Kimura, T. Haruyama, Y. Yanagida, E. Kobatake, Electrochemistry 67 (1999) 118–125.
- [14] Y. Guo, M. Li, A. Mylonakis, J. Han, A.G. MacDiarmid, X. Chen, P.I. Lelkes, Y. Wei, Biomacromolecules 8 (2007) 3025–3034.
- [15] J.Q. Zheng, Nature 403 (2000) 89–93.
- [16] V.H. Hopker, D. Shewan, M. Tessier-Lavigne, M. Poo, C. Holt, Nature 401 (1999) 69–73.
- [17] A.C. Murnane, K. Brown, C.H. Keith, J. Neurosci. Res. 67 (2002) 321–328.
- [18] J.D. Foley, E.W. Grunwald, P.F. Nealey, C.J. Murphy, Biomaterials 26 (2005) 3639–3644.
- [19] F. Haq, V. Anandan, C. Keith, G. Zhang, Int. J. Nanomed. 2 (2007) 107–115.
- [20] C.A. Lopez, A.J. Fleischman, S. Roy, T.A. Desai, Biomaterials 27 (2006) 3075–3083.
- [21] B. Arkles, Chemtech 7 (1977) 766–778.
- [22] D. Kleinfeld, K.H. Kahler, P.E. Hockberger, J. Neurosci. 8 (1988) 4098–4120.
- [23] D. Higgins, G.A. Banker, in: G.A. Banker, K. Goslin (Eds.), Culturing Nerve Cells, 19 Second Edition, Cambridge, 1998 (Chapter 3).
- [24] D.A. Stenger, C.J. Pike, J.J. Hickman, C.W. Cotman, Brain Res. 630 (1993) 136–147.
- [25] R. Kapur, A.S. Rudolph, Exp. Cell Res. 244 (1998) 275–285.
- [26] J. Radler, E. Sackmann, J. Phys. II 3 (1993) 727–748.
- [27] R. Simson, E. Wallraff, J. Faix, J. Niewohner, G. Gerisch, E. Sackmann, Biophys. J. 74 (1998) 514–522.
- [28] W.A. Zisman, Adv. Chem. Ser. 43 (1964) 1–51.
- [29] L.A. Greene, J.M. Aletta, A. Rukenstein, S.H. Green, Methods Enzymol. 147 (1987) 207–216.
- [30] L.A. Greene, J. Cell Biol. 78 (1978) 747–755.
- [31] B.F. Liu, J. Ma, Q.Y. Xu, F.Z. Cui, Colloids Surf. B 53 (2006) 175–178.
- [32] D.W. Cleveland, S.Y. Hwo, M.W. Kirschner, J. Mol. Biol. 116 (1977) 227–247.
- [33] C.A. Haynes, W. Norde, Colloids Surf. B 2 (1994) 517–566.
- [34] M. Bellion, L. Santen, H. Mantz, H. Haehl, A. Quinn, A. Nagel, C. Gilow, C. Weitenberg, Y. Schmitt, K. Jacobs, J. Phys. Condens. Matter 20 (2008) 404226.
- [35] K.M. Yeung, Z.J. Lu, N.H. Cheung, Colloids Surf. B 69 (2009) 246–250.
- [36] L. Baujard-Lamotte, S. Noinville, F. Goubard, P. Marque, E. Pauthe, Colloids Surf. B 63 (2008) 129–137.
- [37] A.E. Schaffner, J.L. Barker, D.A. Stenger, J.J. Hickman, J. Neurosci. Methods 62 (1995) 111–119.
- [38] H. Takatsuki, A. Sakanishi, Colloids Surf. B 32 (2003) 69–76.
- [39] T.M. Gomez, E. Robles, M. Poo, N.C. Spitzer, Science 291 (2001) 1983–1987.
- [40] A. Renaudin, M. Lehmann, J. Girault, L. McKerracher, J. Neurosci. Res. 55 (1999) 458–471.
- [41] C.D. Nobes, A. Hall, J. Cell Biol. 144 (1999) 1235–1244.
- [42] A.J. Ridley, A. Hall, Cell 70 (1992) 389–399.
- [43] A.B.D. Cassie, S. Baxter, Trans. Faraday Soc. 40 (1944) 546–551.

Annexe D

Reproduction de l'article publié dans *Biomaterials*

Cet article constitue le prolongement du travail initié par l'article précédent (cf. [annexe B](#)). À la différence de ce dernier, l'élaboration des substrats et les techniques employées pour les analyser constituent cette fois-ci le cœur de l'article. Les substrats de verre sont tous modifiés par auto-assemblage de monocouches d'alkylsiloxanes à terminaison CH_3 . Outre l'AFM et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, l'appareil analytique déployé combine la génération de somme de fréquence (SFG ; spectroscopie non-linéaire), et l'extraction des énergies libres de surface *via* Zisman et Owens–Wendt. L'essentiel des résultats résumés dans cet article au sujet des analyses de surface des substrats sont décrits plus en détails tout au long du [chapitre 4](#) de ce document.

L'article met en lumière l'impact des hétérogénéités chimiques du substrat d'adhésion dans l'adhésion et la différenciation des cellules PC12. Parmi tous les facteurs de surfaces analysés (mouillabilité, nanorugosité, densité surfacique des terminaisons CH_3 , hétérogénéités chimiques du substrat), ce sont les hétérogénéités chimiques des surfaces mixtes polaires/apolaires (CH_3/OH) qui sont identifiées comme étant le facteur critique auquel les cellules se révèlent particulièrement sensibles. L'observation des cellules (contraste de phase et immunofluorescence) sur les différentes classes de substrats correspond aux analyses exposées à la [section 9.1](#) de cette thèse.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Biomaterials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biomaterials

Neuronal adhesion and differentiation driven by nanoscale surface free-energy gradients

Guillaume Lamour^{a,b}, Ali Eftekhari-Bafrooei^b, Eric Borguet^b, Sylvie Souès^c, Ahmed Hamraoui^{a,d,*}

^aNeuro-Physique Cellulaire, Université Paris Descartes, UFR Biomédicale, 45 Rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France

^bDepartment of Chemistry, Temple University, Philadelphia, Pennsylvania, PA 19122, USA

^cRégulation de la Transcription et Maladies Génétiques, CNRS UPR2228, Université Paris Descartes, UFR Biomédicale, 45 Rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France

^dService de Physique et Chimie des Surfaces et Interfaces, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2009

Accepted 15 January 2010

Available online 10 February 2010

Keywords:

PC12 cells

Neuronal differentiation

Cell adhesion

Self-assembled monolayers (SAMs)

Sum-frequency generation (SFG)

Surface energy

ABSTRACT

Recent results indicate that, in addition to chemical, spatial and mechanical cues, substrate physical cues such as gradients in surface energy may also impact cell functions, such as neuronal differentiation of PC12 cells. However, it remains to be determined what surface effect is the most critical in triggering PC12 cell differentiation. Here we show that, beyond continuously probing the surface energy landscape of their environment, PC12 cells are highly sensitive to nanoscale chemical heterogeneities. Self-assembled monolayers of alkylsiloxanes on glass were used as a culture substrate. By changing the structure, ordering and chemical nature of the monolayer, the surface energy distribution is altered. While both well-ordered CH₃ terminated substrates and bare glass (OH terminated) substrates did not favor PC12 cell adhesion, PC12 cells seeded on highly disordered CH₃/OH substrates underwent enhanced adhesion and prompt neuritogenesis by 48 h of culture, without nerve growth factor treatment. These data illustrate that surface free-energy gradients, generated by nanoscale chemical heterogeneities, are critical to biological processes such as nerve regeneration on biomaterials.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Neuronal differentiation is critical to nervous tissue regeneration after injury, and adhesion on a substrate is critical for neurite extension [1–3]. The initiation and guidance of a neurite rely on extra-cellular signals, such as substrate energy of adhesion (e.g., surface energy, or surface tension) [4], especially local gradients [5]. Hence, it is of great interest to unveil the substrates characteristics that are effectively sensed by the growth cone, and translated into neuritis extension as a response to these physical cues. The ability to spatially control the distribution of the energy of adhesion is of particular interest in many biomedical and tissue-engineering applications.

The interactions of cells, especially neurons, with nanoscale topography [6–9], and with surface chemistry [10–12], were reported to be important parameters in controlling cell function. Another parameter, substrate compliance, influences both neuritogenesis [13–16] and neurite branching rate [17]. Thus, a combination of spatial, chemical and mechanical inputs, together with the genetic program of the cell, has been recently proposed to

control the shape and functions of cells, as well as of tissues [18]. However the exact role of the surface tension and its spatial variation is still unclear and a systematic study may lead to a better understanding of the surface adhesion parameters that drive neuritogenesis.

Self-assembled monolayers (SAMs) are surface-active materials with many potential applications in biotechnology [19,20]. SAMs of alkylsiloxanes on glass can exhibit a wide range of properties, including the chemical nature, the surface roughness, and the organization of surface-exposed terminal groups. These combined properties generate, at the nanoscale level, distinct surface energy distributions, and at larger scale, macroscopic surface characteristics such as wettability. SAMs of alkylsiloxanes on glass [21,22] or on titanium [23] have been shown to be suitable substrates for controlling cell adhesion, and in particular for controlling neuronal cell differentiation [10,21,23].

PC12 cells, though not primary neuronal cells, express the transmembrane TrkA and p75 receptors to nerve growth factor (NGF) [24,25], and differentiate into a neuronal phenotype when challenged by appropriate NGF concentrations [26]. This ability makes them a well-defined model to study neuronal differentiation mechanisms, and thus axonal regeneration. Several key inducers of PC12 cell neuronal differentiation in NGF-free medium have been identified: PC12 cell neuritogenesis is observed on soft substrates

* Corresponding author. Fax: +33 (0)14 286 2085.

E-mail address: ahmed.hamraoui@parisdescartes.fr (A. Hamraoui).

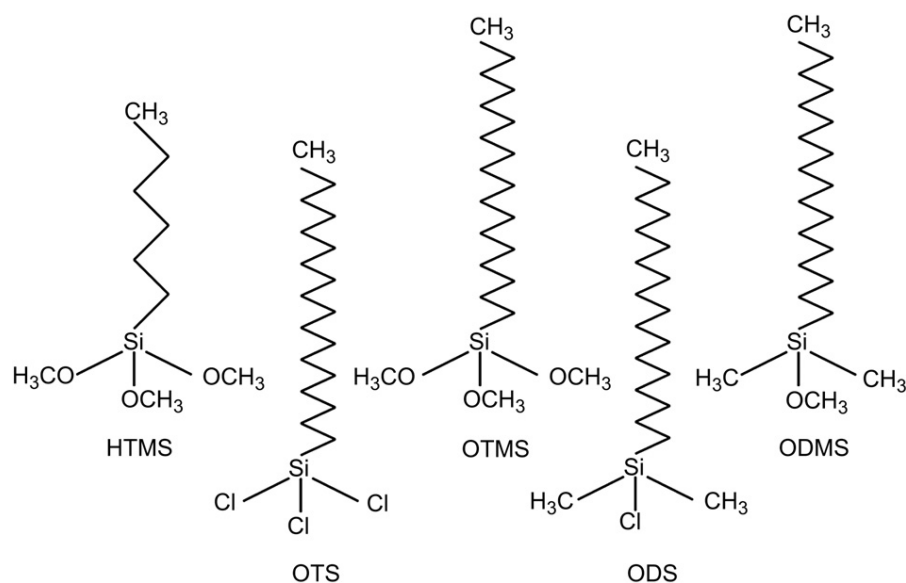


Fig. 1. Schematics of methyl-terminated molecules used to modify glass surfaces. Molecules were grafted onto clean glass surfaces by chemisorption from the liquid phase. HTMS, OTMS and OTS cross-link during SAMs formation, contrary to ODMS or ODS, that can bind glass surfaces through only one bond, following hydrolysis of their unique OCH₃ or chlorine leaving group.

composed of extra-cellular matrix (ECM) proteins such as collagen, fibronectin and laminin [27], or of ECM derived from astrocytes [28].

In our previous study [5], we demonstrated the differentiation ability of PC12 cells in NGF-free medium when seeded on solid glass substrates covered with NH₂-terminated alkylsiloxane SAMs. These surfaces contained a nanoscale mixture of hydroxyl and amine groups which provided local gradients in surface energy. However, we did not determine whether the trigger of PC12 cell differentiation was the surface nanoroughness, the surface concentration in terminal amines, the alternation of OH and NH₂ groups, or a combination of these factors.

Here we examined the influence of these potential triggers, again by tailoring various silanes on glass [29], which provide cell culture substrates. We used methyl-terminated silanes that offer two main advantages compared to aminosilanes. First, because of the smaller reactivity of CH₃ compared to NH₂ groups, the control over adsorption process is easier. It is noted that the highly reactive leaving groups of silanes molecules (chlorine and methoxy) react with the silanol groups and/or adsorbed water on the glass surface and are present on the side of the molecule close to the glass surface, away from CH₃ terminal groups (Fig. 1). Second, vibrational spectroscopy which is used for the surface characterization is more reliable in the CH stretching region (2800–3000 cm⁻¹) than in the NH stretching region (3100–3500 cm⁻¹) where the broad OH vibrational spectrum of adsorbed water smears out the NH peaks. Furthermore, CH groups do not provide polar component to the surface free energy (SFE), thus facilitating the SFE calculations and SFE analysis.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Chemicals were obtained from Acros Organics (Geel, Belgium), Sigma–Aldrich (St. Quentin Fallavier, France), ABCR (Karlsruhe, Germany), Fisher Scientific (Illkirch, France) and Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France). The sources and purity of the chemicals used are summarized in Table 1.

2.2. Substrates preparation

Modified glass slides (SuperFrost®, 25 × 75 × 1 mm³, Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) were used for optical studies, and modified glass coverslips (30-mm

diameter and 100-μm thick, Menzel-Glaser) were used for cell culture experiments. Prior to use, glassware was cleaned by immersion in piranha solution (3:1 (v/v) sulfuric acid:40% hydrogen peroxide), then thoroughly rinsed with deionized water and dried under a nitrogen stream (*caution: piranha solution is extremely corrosive and can react violently with organic compounds. Appropriate safety precautions including gloves and face shield should be used when handling.*). Glass coverslips were cleaned by immersion in ultrasonic bath of chloroform for 20 min prior to immersion in piranha solution. For the self-assembly, the cleaned glass substrates were immersed into solutions (Table 2) of the desired alkylsilanes (Fig. 1). The chemically modified substrates were then rinsed with the neat solvent. Prior to cell culture, the substrates were dried under a laminar flow hood and prior to surface characterization, the substrates were dried under a nitrogen stream. All treatments were carried out at room temperature and in ambient atmosphere (relative humidity ≈ 50%).

2.3. Surface characterization

2.3.1. Fourier transform infrared spectroscopy

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectra were measured in the transmission geometry at a normal incidence angle using a Bruker Optics TENSOR 27

Table 1
Chemicals used for surface modification and contact angle measurements.

	Manufacturer	Purity (%)
Deionized water (Elga UHQ PS MK3)	Veolia Water Systems	($\rho = 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$)
Hexanes (HX) (mixture of isomers)	Sigma–Aldrich	≥98.5 (ACS) ^a
Methanol (MET)	Carlo Erba Reagents	>99.9 (HPLC) ^a
Acetic acid (AA)	Carlo Erba Reagents	99.9 (RPE)
Sulfuric acid	Sigma–Aldrich	95–97
Hydrogen peroxide	Sigma–Aldrich	40 (m/v in H ₂ O)
Chloroform (CF)	Carlo Erba Reagents	>99.8 (ACS)
n-Hexyltrimethoxysilane (HTMS)	ABCR	97
n-Octadecyltrimethoxysilane (OTMS)	Acros Organics	95
Octadecyldimethylmethoxysilane (ODMS)	ABCR	95
n-Octadecyltrichlorosilane (OTS)	Acros Organics	95
Octadecyldimethylchlorosilane (ODS)	Sigma–Aldrich	95
Glycerol (GL)	Acros Organics	≥99
Formamide (FA)	Fisher Scientific	≥99.5
n-Hexadecane (HD)	Acros Organics	99
Tetradecane (TD)	Sigma–Aldrich	≥99
n-Dodecane	Fisher Scientific	>98
n-Undecane	Acros Organics	99
n-Octane	Acros Organics	95

^a Water content is <0.01% (v/v).

Table 2

Description of the chemical processes used to modify glassware. The abbreviations in capital letters refer to the chemicals displayed in Table 1.

Substrate	Solution	Adsorption time	Rinsing solvent(s)	Note(s)
ots	0.1% OTS + 20% CF + 80% HD	15 min	CF and MET	^a
ods	0.1% ODS + 20% CF + 80% HD	15 min	CF and MET	^{a,b}
otms	1% OTMS + 99% HX	4 h	HX and MET	
otms _x	1% OTMS + 99% HX	4 h	HX and MET	^a
odms ₁	1% ODMS + 99% HX	~10 h	HX and MET	^a
odms ₂	1% ODMS + 99% HX	>24 h	HX and MET	
htms _{M1}	2% HTMS + 94% MET + 4% H ₂ O + 1 mM AA	~16 h	MET	
htms _{M2}	2% HTMS + 94% MET + 4% H ₂ O + 1 mM AA	~24 h	MET	
htms _{M3}	2% HTMS + 94% MET + 4% H ₂ O + 1 mM AA	>72 h	MET	
htms _H	1% HTMS + 99% HX	4 h	HX and MET	
htms _{Hx}	1% HTMS + 99% HX	4 h	HX and MET	^a

^a Solution was slowly agitated with a rotating magnet all along the reaction.

^b ODS was slightly heated until it reached a liquid phase (at 28–30 °C), just before being added to the solvent solution.

spectrometer equipped with a DTGS detector. FTIR spectra were background corrected by subtraction of a spectrum of the clean, bare substrate (e.g., SAM-free), and recorded by integrating 200 scans with a resolution of 4 cm⁻¹.

2.3.2. Vibrational sum-frequency generation

Sum-frequency generation (SFG) is a surface vibrational spectroscopy based on a second-order non-linear optical process in which two laser beams with frequencies ω_1 and ω_2 overlap on the surface and generate a coherent response whose frequency is the sum of two incident laser ($\omega_{\text{SFG}} = \omega_1 + \omega_2$). In the electric dipole approximation, second-order non-linear optical processes, including SFG, do not take place in media with inversion symmetry but do occur at interfaces as the inversion symmetry is necessarily broken there. Therefore, by selecting one of the incident beams to be in the IR region ($\omega_1 = \omega_{\text{IR}}$) and the other in the visible region ($\omega_2 = \omega_{\text{vis}}$), SFG can be used as a powerful spectroscopic technique to measure surface vibrational spectra [30]. A detailed description of our SFG set up can be found elsewhere [31]. Briefly, IR and visible pulses with energies of 15 and 2 μJ , incident at the surface with the angles of 72° and 65° respectively, were focused to beam waists of 250 and 200 μm , respectively. The SFG signal was detected with a CCD (Princeton Instrument) coupled with a spectrograph (300i, Acton Research Corp.). The polarization of visible and SFG were controlled by a combination of polarizers and half-wave plates. In the experiments presented here, the polarization combination of SFG, visible, and IR were either S,S,P or P,P,P.

2.3.3. Contact angle measurements

Contact angles (θ) were measured as described in Ref. [5]. Briefly, an image of the profile of a drop on a solid surface was recorded using a CCD video camera (Sony DXC-101P). The image was then processed with ImageJ software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD) using the Contact Angle plug-in (Marco Brugnara, University of Trento, Trento, Italy), which calculates the contact angle value from the profile of the drop. At least 3 drops per sample were analyzed.

2.3.4. Determination of surface free energy

The surface free energies (SFE) of samples were calculated using the Owens-Wendt theoretical model [32]. This model gives the long-range dispersion (Lifshitz-Van der Waals; γ^{d}) and the short-range polar (hydrogen bonding; γ^{p}) components of SFE according to the following equation:

$$W_{\text{SL}} = (1 + \cos \theta) \gamma_{\text{L}} = 2(\gamma_{\text{s}}^{\text{d}})^{1/2} (\gamma_{\text{L}}^{\text{d}})^{1/2} + 2(\gamma_{\text{s}}^{\text{p}})^{1/2} (\gamma_{\text{L}}^{\text{p}})^{1/2} \quad (1)$$

where γ_{s} is the SFE of the surface, γ_{L} is the SFE of the liquid and W_{SL} is the solid-liquid interface energy. Two liquids were used as probes for SFE calculations: n-hexadecane, and H₂O. For a liquid, the overall surface tension (γ_{L}) is a combination of dispersive and polar components, whose values are indicated in Table 3 (adapted from Ref. [33]). The contact angles of n-hexadecane and H₂O were reported in Eq. (1) for each solid substrate, then sample SFE components were calculated.

The critical surface tension γ_{c} was calculated using the Fox-Zisman approximation. In this work, it can be understood as a first-order approximation of the Good-Girifalco equation [35], for a surface tension of the liquid γ_{L} ($\gamma_{\text{L}} \geq \gamma_{\text{c}}$) close to the γ_{c} of the solid. Using a linear regression analysis, Zisman plots, $\cos \theta = f(\gamma)$, were traced for each substrate by fitting the data obtained with the test liquids. γ_{c} values were read where the line fits intersect $\cos \theta = 1$, as described by Zisman [34].

Table 3

Values of the surface tension (γ , mN m⁻¹) of some test liquids at 20 °C (adapted from Ref. [33]). γ^{d} and γ^{p} are respectively the dispersive and the polar components of the surface tension.

Liquid	γ	γ^{d}	γ^{p}
Water	72.8	21.8	51
Glycerol	64	34	30
Formamide	58	39	19
n-Hexadecane	27.47	27.47	~0
Tetradecane	26.56	26.56	~0

2.3.5. AFM imaging

Each substrate was analyzed using a Bioscope™ AFM (Digital Instruments/Veeco) in air using tapping mode (RTESP tip cantilever, spring constant: 40 N m⁻¹). The root-mean-square (rms) roughness of the surfaces was evaluated for regions of $\sim 1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$, by AFM software Nanoscope (Veeco). The line scanning frequency was $\sim 0.5 \text{ Hz}$ (256 scan lines \times 512 pixels). The images were flattened using Nano-scope software before the rms was evaluated.

2.4. PC12 cell manipulation

Unless otherwise specified, the biological products in this section were purchased from Invitrogen (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France).

2.4.1. Cell culture

PC12 cells (ATCC, CRL 1721) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium containing horse serum (5%), fetal calf serum (5%, HyClone), non-essential amino acids (1%) and antibiotics (1%). In the experiments, PC12 cells (passage numbers 7–17) were seeded onto modified glass coverslips, that had been sterilized by immersion in a solution of 70% methanol and 30% H₂O for 15 min. Cells were seeded in a small volume of the culture medium ($V = 335 \mu\text{L}$), in order to trap PC12 cells on the top of the modified substrates. The cell density at the time of seeding was $\sim 10^4 \text{ cm}^{-2}$. Experiments never exceeded 48 h. No further addition of culture medium was made and, in particular, no NGF was added to the culture medium.

2.4.2. Quantification of neuritogenesis

The propensity of PC12 cells to initiate neurites was evaluated on each substrate. At least 10 pictures ($S = 0.182 \text{ mm}^2/\text{picture}$) of the cells cultured on each substrate were taken with a camera mounted on a phase-contrast microscope (Nikon Eclipse TS100), using a $\times 20$ objective. In order to avoid confusing neurites with cell soma protrusions or filopodia, only neurites with length greater than 25 μm were counted. This threshold length corresponds to approximately the diameter of a PC12 cell soma multiplied by 1.5.

2.4.3. Immunofluorescence

PC12 cells were cultured on each substrate, as described above. After 48 h of culture, cells were fixed with 3.7% formaldehyde in PBS for 15 min and then permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS/0.1% bovine serum albumin (BSA) for 20 min. All washes, blocking steps, and antibody dilutions were performed using 0.1% BSA, 0.01% Triton® X-100 in PBS. After cell fixation and permeabilization, the primary antibody anti-MAP1B (Sigma-Aldrich; diluted 1:800) was incubated overnight at 4 °C. A secondary Cy3-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK; diluted 1:400) was incubated for 2 h at room temperature. DNA was stained with 4–6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) at 0.5 g/mL for 15 min. F-actin was stained with phalloidin coupled to Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) at 5 units/mL for 30 min. Finally cells were extensively washed in PBS and mounted in a Fluoromount G™ solution (Southern Biotech). Cell observation was done with a Nikon Eclipse E600 epifluorescence microscope coupled to a high resolution colour camera (Nikon DXM 1200), using $\times 10$ and $\times 50$ objectives. No threshold processing was applied to the images.

3. Results and discussion

Molecules (noted in capital letters) of various chain lengths and chemical nature (Fig. 1) were chosen to generate distinct surfaces (noted in small letters), according to their mechanism of adsorption and monolayer formation on glass. The resulting substrates were divided into three different classes (Fig. 2) with regard to nanoscale surface organization and hence to distribution of surface energy. Class 1 SAMs are well-ordered with an all-trans conformation of the alkyl chains. Class 2 SAMs, while eliminating multilayer formation due to the impossibility of the monomers undergoing cross-linking, are disordered. Moreover,

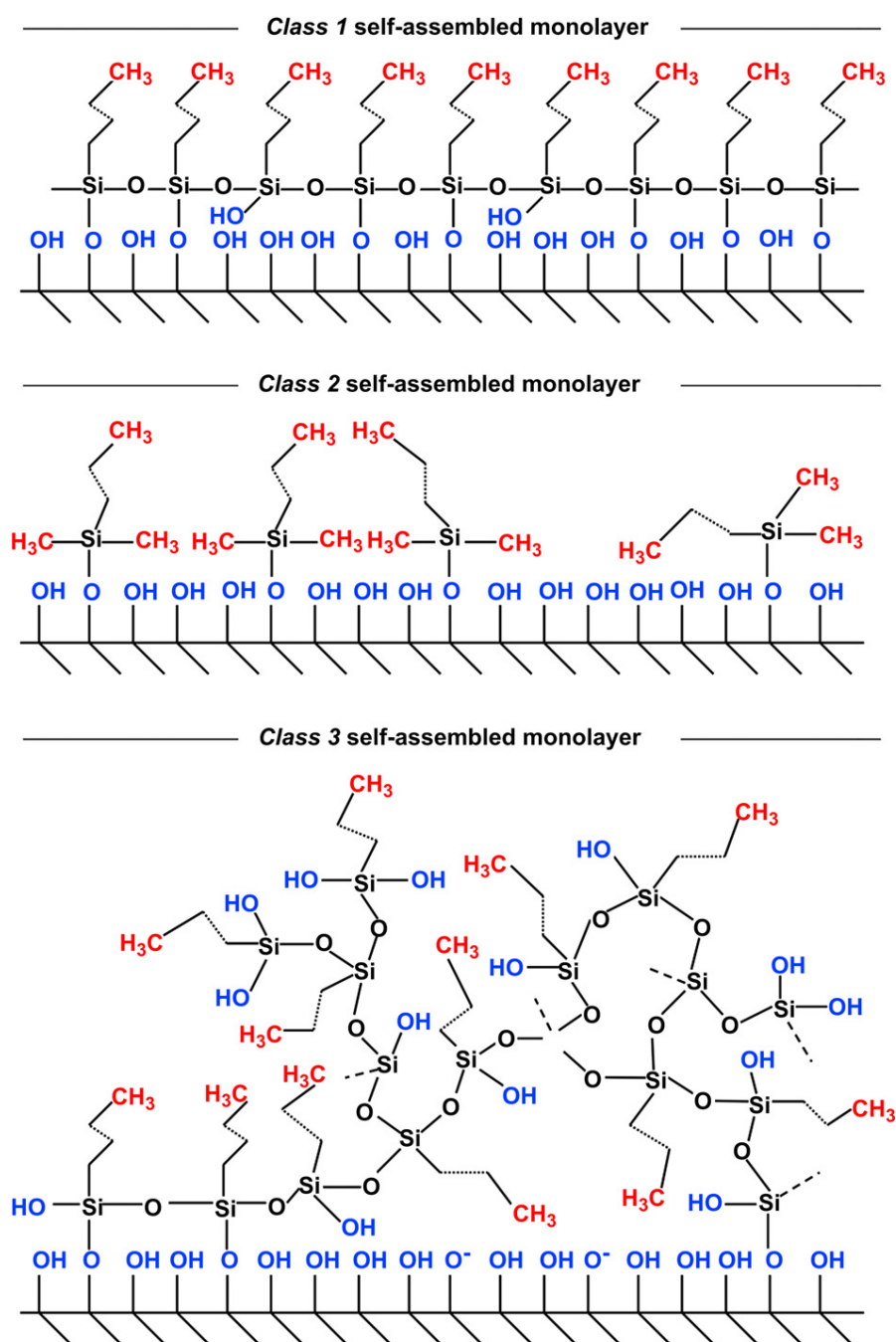


Fig. 2. Sketches representing three distinct organizations of SAMs used as substrates for PC12 cell culture. Class 1 SAMs are well-ordered with an all-trans conformation of alkyl chains. Class 2 SAMs are disordered but limited to monolayer formation. Class 3 SAMs are highly disordered, with possible multilayer formation and higher chemical heterogeneity.

class 2 SAMs likely are accompanied by a significant density of substrate silanol groups (Si–OH), compared to class 1 SAMs. This is a consequence of class 2 monolayer adsorption being incomplete by nature. Class 3 SAMs are the result of chaotic polymerization of a trialkoxysilane. The chemisorption of siloxanes is believed to require activation of the siloxane whereby the leaving group (e.g., OCH₃ in HTMS) is replaced by OH from water. When the solvent solution contains more than the trace amount of water necessary for adsorption reaction to occur, methoxy groups are quickly hydrolyzed before chemical adsorption on the silica

surface. As a result, the molecules polymerize through their silanol groups. It is the resultant polymer that chemically binds the silica surface.

In view of intrinsic properties of both molecules and solvent solutions (Table 2) it was expected that class 1 SAMs would be generated by OTS and OTMS molecules, that class 2 SAMs would be the result of ODS and ODMS adsorption, and that HTMS would generate either class 1 or class 3 SAMs according to the solvent solution used. The particular properties of each class of substrates are described here after.

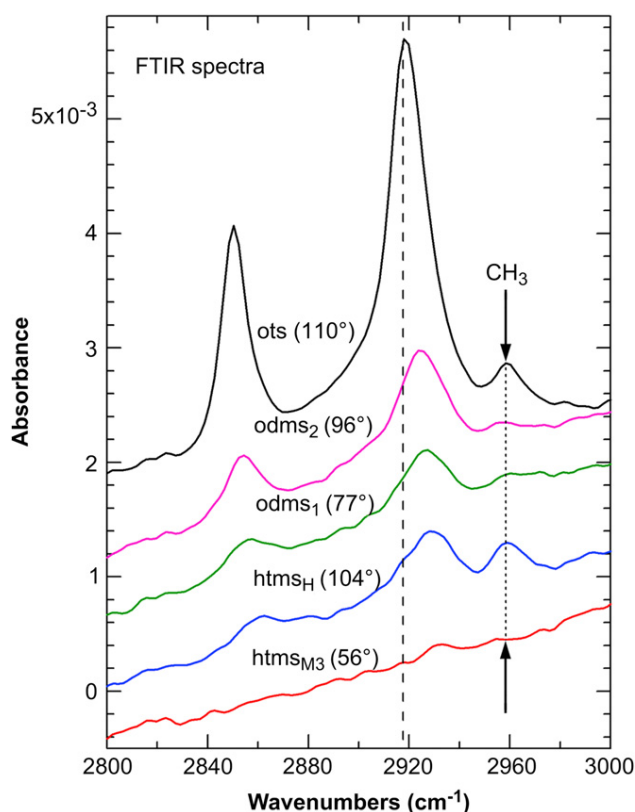


Fig. 3. FTIR spectra in the CH region of some substrates. FTIR spectra were background corrected by subtraction of a spectrum of the clean glass substrate (e.g., SAM-free). Spectra are offset for clarity. Peaks at $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$, $\sim 2920\text{ cm}^{-1}$, and $\sim 2955\text{ cm}^{-1}$ are respectively assigned to $\text{CH}_2\text{-ss}$, $\text{CH}_2\text{-as}$, and $\text{CH}_3\text{-as}$. Surface density of glass-bound alkylsiloxanes is reflected by the intensity of peaks, that depends on molecules alkyl chain length (for CH_2 peaks only) and on molecules organization inside the monolayers. This latter aspect is developed in the SFG spectra (Fig. 4) of the same substrates. The dashed line at $\sim 2920\text{ cm}^{-1}$ represents close packed long chain SAM obtained for the ots substrate. Values in parentheses indicate the water contact angle on each substrate.

3.1. Quantitative analysis of substrates by FTIR spectroscopy

Modified substrates were probed by FTIR in the CH stretching region (Fig. 3). The “ideal” and well-studied monolayer made of OTS molecules is known to lead to a full coverage of the bare glass surface [36]. As expected, its FTIR spectrum in the CH region displayed the most intense peaks among all other SAMs studied. The CH peak intensity of odms substrates was lower than those of ots substrates, although the alkyl chain length is identical (Fig. 1). This indicates that odms₁ and odms₂ substrates have fewer molecules grafted per unit area. The higher intensity of CH_2 symmetric ($\text{CH}_2\text{-ss}$) and asymmetric ($\text{CH}_2\text{-as}$) stretches, in odms₂ compared to odms₁ substrate, can result from a higher quantity of adsorbed material, as supported by the higher contact angle value. In contrast to these surfaces, the htms_{M3} substrates showed almost no visible CH peak, suggesting that the quantity of material grafted is under the detection limit of the FTIR spectrometer. Nevertheless, the presence of a non-negligible amount of CH groups at htms_{M3} surface was suggested by the relatively high contact angle measured for water (56°) while a bare glass surface would undergo complete wetting (e.g., $\theta_{\text{H}_2\text{O}} \approx 0^\circ$).

The intensity of the CH peaks of htms_H substrates was similar to that of odms substrates, although the HTMS molecule contains fewer CH_2 groups than ODMS (5 versus 17). This apparent

discrepancy could result from monomers cross-linking, probable with HTMS, but impossible with ODMS. The binding of HTMS monomers to each other laterally would increase the number of adsorbed molecules per area. Surprisingly, the intensity of the CH_3 peak of htms_H substrate was even greater than that of the ots substrate. AFM experiments revealed that the rms roughness of htms_H substrate is remarkably higher ($\sim 1.4\text{ nm}$) than that of the others substrates ($\sim 0.3\text{ nm}$) which are supposed to display one single organic monolayer on the bare glass surface. These results suggest that the htms_H modified surface is partially over covered by additional layers of HTMS molecules, possibly physisorbed on it. To determine whether the glass-bound layer of HTMS, and of the other molecules was coherently organized, a non-linear spectroscopic analysis was performed.

3.2. Qualitative analysis of surface-exposed CH groups organization by SFG

SFG spectra of ots and htms_H (Fig. 4) displayed similar peaks, though the FTIR spectra of the two substrates were different (Fig. 3). The specificity of SFG to non-centrosymmetry ensures that the spectra emphasize the CH_3 , as opposed to CH_2 groups present in an all-trans centrosymmetric environment. Both substrates formed ordered SAMs. This is evidenced from two well-defined peaks in the SSP spectra, at $\sim 2875\text{ cm}^{-1}$ and $\sim 2955\text{ cm}^{-1}$, respectively assigned to the $\text{CH}_3\text{-ss}$ and Fermi Resonance (FR) of CH_3 [37,38]. The absence, or the very small intensity, of CH_2 peaks (at $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ and $\sim 2925\text{ cm}^{-1}$) further supported the formation of class 1, all-trans, SAMs (sketched in Fig. 2). In the PPP spectra, peaks at $\sim 2965\text{ cm}^{-1}$ are assigned to $\text{CH}_3\text{-as}$ [37,38]. Their intensity is consistent with the interpretation of the SSP spectra and in general with the formation of well-ordered SAMs.

SFG spectra of odms₁, odms₂ and htms_{M3} indicated that the SAMs they formed were much more disordered compared to the class 1 SAMs discussed above. This is demonstrated in the PPP spectra by the absence of peak at $\sim 2965\text{ cm}^{-1}$ ($\text{CH}_3\text{-as}$), or by very small and broad peaks that overlapped with peaks at $\sim 2930\text{ cm}^{-1}$ ($\text{CH}_2\text{-as}$). The SSP spectra of these three substrates also confirmed the disordered organization of these surfaces. First, peaks at $\sim 2875\text{ cm}^{-1}$ ($\text{CH}_3\text{-ss}$) were broader and/or smaller than that of ots and htms_H substrates, second, $\text{CH}_3\text{-FR}$ peaks (at 2955 cm^{-1}) overlapped with $\text{CH}_2\text{-as}$ peaks (at $\sim 2920\text{--}2930\text{ cm}^{-1}$). And finally, the greater intensity of these latter peaks reflected gauche defects, a signature of surface-exposed CH_2 groups. Interestingly, the SSP spectra featured a $\text{CH}_3\text{-ss}$ peak that is more intense for odms₂ than for odms₁ and htms_{M3}. Together with the contact angle value and FTIR spectra, this may indicate that the odms₂ substrate exhibited a few coherently arranged CH_3 groups, with a large number of ODMS molecules covalently bound to the glass surface. However, the odms₂ substrate does not appear to be as ordered as the class 1 SAMs.

Of all the substrates, htms_{M3} substrate displayed the least intense peaks in the SFG spectra. This result could reflect the smaller amount of adsorbed molecules on glass, as indicated by both FTIR spectra and water contact angles (56° for htms_{M3} versus 77° and 96° for odms₁ and odms₂, respectively). In particular, htms_{M3} and htms_H were characterised by distinctive spectra, demonstrating that one molecule can lead to wholly different surface properties according to the conditions of grafting in solution.

However, SFG spectra could not convincingly characterize the differences between class 2 SAMs (odms₁ and odms₂) and class 3 SAMs (htms_{M3}). Therefore, further analysis was required to discriminate class 2 and class 3 SAMs.

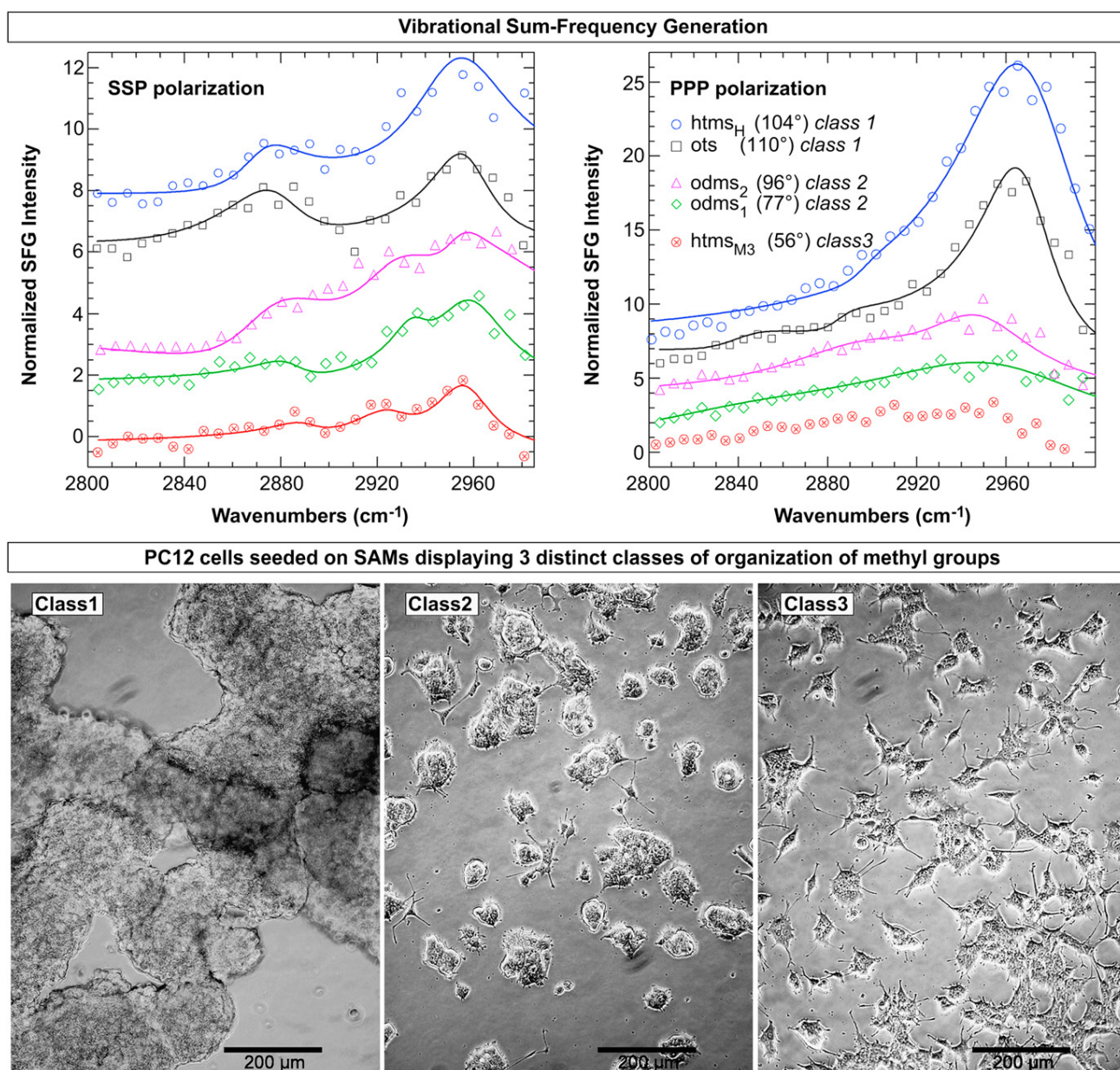


Fig. 4. SFG spectra of SAMs used as model culture substrates and PC12 cell adhesion and differentiation, without NGF treatment, on substrates 48 h after seeding. Top graphs feature SFG traces in the CH region for the substrates also analyzed by FTIR in Fig. 3. Spectra are offset for clarity. The polarization combination for SFG, visible and IR is S,S,P for left top graph, and P,P,P for right top graph. Clear surface organization (e.g., intense CH_2 -group peaks and absence of CH_2 peaks) arises in class 1 substrates, compared to the others. Values in parentheses indicate the water contact angle on each substrate. PC12 cells have three distinct fates according to substrate class: no adhesion on class 1 SAM, relatively poor adhesion and neurite outgrowth on class 2 SAM, and good adhesion preceding neuronal differentiation on class 3 SAM. Observations were made 48 h after seeding with a contrast phase microscope.

3.3. SFE determination by contact angle measurements

Data obtained for contact angles, SFE, and roughness analysis, are recapitulated in Table 4. The overall surface tension γ_s of class 1 substrates ots and htms_H was mostly composed of the dispersive component γ^d (Fig. 5), the polar contribution γ^p being close to zero. It suggests that very few OH groups were exposed, considering that γ^p is not generated by CH_3 groups. This result supports the close arrangement of monomers and its corollary: the complete coverage of the glass substrate. A similar result was obtained for the ots substrate, whose SFG spectra resemble those of class 1 SAMs (data not shown for clarity).

As expected, class 2 substrates odms_1 and ods (whose SFG spectra were similar to those of odms substrates—data not shown), displayed a more intense γ^p compared to class 1 substrates. This suggests the presence of surface-exposed OH groups, in agreement with the presence of disorganized alkyl chains and low intensity of FTIR peaks. The surface tension of an almost perfectly homogeneous CH_3 substrate is given by the γ_s of the ots substrate ($\sim 21.6 \text{ mN m}^{-1}$), close to the γ_c of the same substrate ($\sim 19.9 \text{ mN m}^{-1}$) obtained by a Zisman plot (Fig. 6). For a clean, bare glass substrate, estimations vary from 150 to 300 mN m^{-1} [39,40]. Consequently, it is of considerable importance to remark that, though the added contribution of γ^p to γ_s for class 2 substrates is

Table 4

Data collected from contact angle measurements and AFM. Contact angles (θ) were measured using water, glycerol (GL), formamide (FA), tetradecane (TD), and n-hexadecane (HD) as test liquids. Uncertainty on a measured contact angle was statistically estimated to less than 1° . $\Delta\theta$ is the difference between advancing and receding contact angles of water. The critical surface tension (γ_c , $\pm 1.5 \text{ mN m}^{-1}$) was determined from Zisman plots, displayed in Fig. 6, using contact angles of all test liquids. The polar (γ_s^p) and dispersive (γ_s^d) components of the overall surface tension (γ_s , $\pm 1.0 \text{ mN m}^{-1}$) of the solid substrates were determined from the water and n-hexadecane contact angles. Values of the root-mean-square roughness ($\pm 0.1 \text{ nm}$) are the mean of three independent measurements.

		ots	ods	otms	odms ₁	odms ₂	htms _{M1}	htms _{M3}	htms _H	htms _{Hx}
$\theta_{\text{H}_2\text{O}}$	deg	110	82	105	77	96	38	56	104	98
θ_{GL}	deg	99	77	92	68	81	34	51	91	87
θ_{FA}	deg	90	68	89	58	75	31	45	83	83
θ_{HD}	deg	40	31	29	13	24	6	11	34	21
θ_{TD}	deg	35	7	15	–	–	–	–	26	12
γ_c	mN m^{-1}	19.9	23	23.7	26.7	24	26.5	25.7	22.7	24.9
γ_s^d	mN m^{-1}	21.5	23.7	24.2	26.8	25.2	27.3	27	23.1	25.8
γ_s^p	mN m^{-1}	0.1	6.9	0.3	8.2	1.6	32.6	20.9	0.6	1.2
γ_s	mN m^{-1}	21.6	30.6	24.5	35	26.8	59.9	47.9	23.6	26.9
rms	nm	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.9	0.3	1.4	0.4
$\Delta\theta$	deg	12	17	12	15	11	32	22	30	12

relatively small ($1.6 \text{ mN m}^{-1} \leq \gamma^p \leq 8.2 \text{ mN m}^{-1}$), locally the surface energy gradients can reach much higher values ($20 \text{ mN m}^{-1} \leq \gamma_c \leq 150 \text{ mN m}^{-1}$).

Class 3 substrates, e.g., htms_{M1} and htms_{M3}, displayed higher γ^p ($\geq 20.9 \text{ mN m}^{-1}$) than both class 1 ($\leq 0.6 \text{ mN m}^{-1}$) and class 2 substrates ($\leq 8.2 \text{ mN m}^{-1}$). The smaller γ^p of htms_{M3} ($\sim 20.9 \text{ mN m}^{-1}$) compared to that of htms_{M1} ($\sim 32.6 \text{ mN m}^{-1}$) indicates that very HTMS molecules adsorbed on glass in htms_{M3}. As htms_{M3} was very smooth (rms $\approx 0.3 \text{ nm}$), it appears that HTMS may have bound to the majority of substrate silanol sites still available for adsorption. Moreover, $\theta_{\text{H}_2\text{O}}$ could not be further increased by lengthening the time of adsorption in the methanol/water solution, supporting the conclusion of HTMS optimal adsorption in these conditions. Nevertheless, the quantity of adsorbed HTMS was relatively small, as evidenced by the absence of peaks in the htms_{M3} FTIR spectrum (Fig. 3). Therefore the greater part of the γ^d contribution to the γ_s of htms_{M3} was provided by OH groups. As a result htms_M substrates exhibited a chemical pattern that was mostly glass-like, with a heterogeneous distribution of CH₃ groups. Conversely, class 2 SAMs mostly exhibited CH₃ groups, together with more (odms₁ and ods) or less (odms₂) scattered OH groups.

odms₂ and htms_{Hx} are particular substrates. odms₂ substrate concentrated more molecules than odms₁, as evidenced by the FTIR spectra, and its γ_s components resembled those of class 1 substrates, whose γ^p was close to zero. However, the γ^p of odms₂

($\sim 1.6 \text{ mN m}^{-1}$) was higher than the γ^p of class 1 substrates ($\gamma^p < 0.6 \text{ mN m}^{-1}$). Moreover, the SFG spectra evidenced the disordered organization of CH groups in odms₂ substrate. Therefore odms₂ cannot be considered as sharing properties of class 1 substrates. Htms_{Hx} substrate was made by agitating the solution in order to prevent HTMS molecules from over covering the substrate (rms $\approx 0.3 \text{ nm}$ for htms_{Hx} versus $\sim 1.4 \text{ nm}$ for htms_H). However, this process also apparently slowed the reaction kinetics, resulting in an incomplete monolayer. This is evidenced by $\theta_{\text{H}_2\text{O}}$ on htms_{Hx} (98°), smaller than $\theta_{\text{H}_2\text{O}}$ on htms_H (104°). This suggests that the htms_{Hx} substrate exhibited some OH groups that contributed to a small γ^p ($\sim 1.2 \text{ mN m}^{-1}$), and though originally forming a class 1 SAM, it did not share the same surface energy distribution. The SFG spectra of the otms_x substrate featured similar traces than those of class 2 substrates (data not shown for clarity), and $\theta_{\text{H}_2\text{O}}$ was also smaller on otms_x (100°) than on otms (105°). Consequently, htms_{Hx} and otms_x substrates shared the properties of class 2 substrates.

The values of γ_c , determined by Zisman plots (Fig. 6 and Table 4), were in agreement with previous results. γ_c can be assimilated to γ^d of solid substrates [41], and the gap between γ_c and γ^d never exceeded 1.6 mN m^{-1} (Table 4). In addition γ_c was always smaller in “ordered” substrates than in “disordered” substrates made of similar molecules. For instance, following relations were obtained: $\gamma_c(\text{ots}) < \gamma_c(\text{ods})$, $\gamma_c(\text{otms}) < \gamma_c(\text{odms}_2) < \gamma_c(\text{odms}_1)$, and $\gamma_c(\text{htms}_H) < \gamma_c(\text{htms}_{Hx}) < \gamma_c(\text{htms}_{M3}) < \gamma_c(\text{htms}_{M1})$. More generally, γ_c values were in the same range ($19.9 \text{ mN m}^{-1} < \gamma_c < 26.7 \text{ mN m}^{-1}$), thus supporting the idea that substrates are rather comparable in terms of nanoscale SFE distribution than in terms of overall surface tension.

The difference between advancing and receding contact angles of water (noted $\Delta\theta$) is a good control to evaluate physical roughness and/or chemical heterogeneity of surfaces [42–44]. $\Delta\theta$ values were in good agreement with both rms roughness and SFE distribution. Among smooth substrates whose rms roughness was $\sim 0.3 \text{ nm}$, those generating the smallest γ^p also generated the smallest $\Delta\theta$ (Table 4). On ods and odms₁ substrates, whose γ^p was higher than that of ots, otms, odms₂, htms_H and htms_{Hx} substrates (Fig. 5 and Table 4), $\Delta\theta$ was higher as well (~ 15 – 17° versus $\sim 12^\circ$). It was further higher on htms_{M3} ($\Delta\theta \approx 22^\circ$) whose surface tension is locally more heterogeneous. Finally, the largest values ($\Delta\theta \approx 30^\circ$) were obtained for substrates exhibiting high roughness: htms_{M1} (rms $\approx 0.9 \text{ nm}$) and htms_H (rms $\approx 1.4 \text{ nm}$).

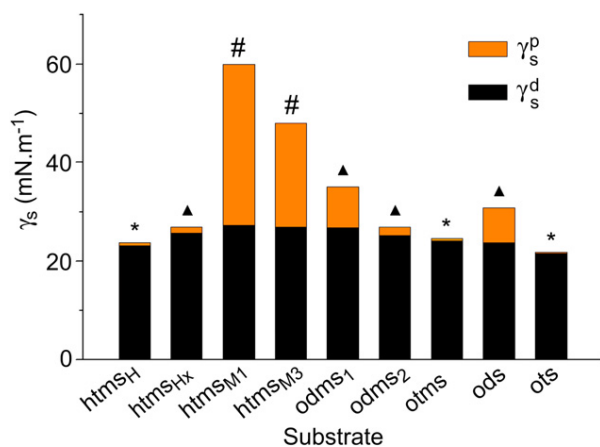


Fig. 5. SFE components γ^d and γ^p of solid substrates. γ^d and γ^p were calculated through the measurements of water and n-hexadecane contact angles, displayed in Table 4, using the Owens–Wendt theoretical model. Notes indicate PC12 cell fate on substrates 48 h after seeding: either the cells did not adhere (*), or they adhered, regrouped in clusters, and initiate few neurites (▲), or the adhesion was enhanced and the cells generated many neurites (#).

3.4. PC12 cell adhesion and differentiation on modified substrates

When seeded on a clean, bare glass substrate, PC12 cells poorly adhered and tend to detach by 48 h. On well-ordered SAMs, such

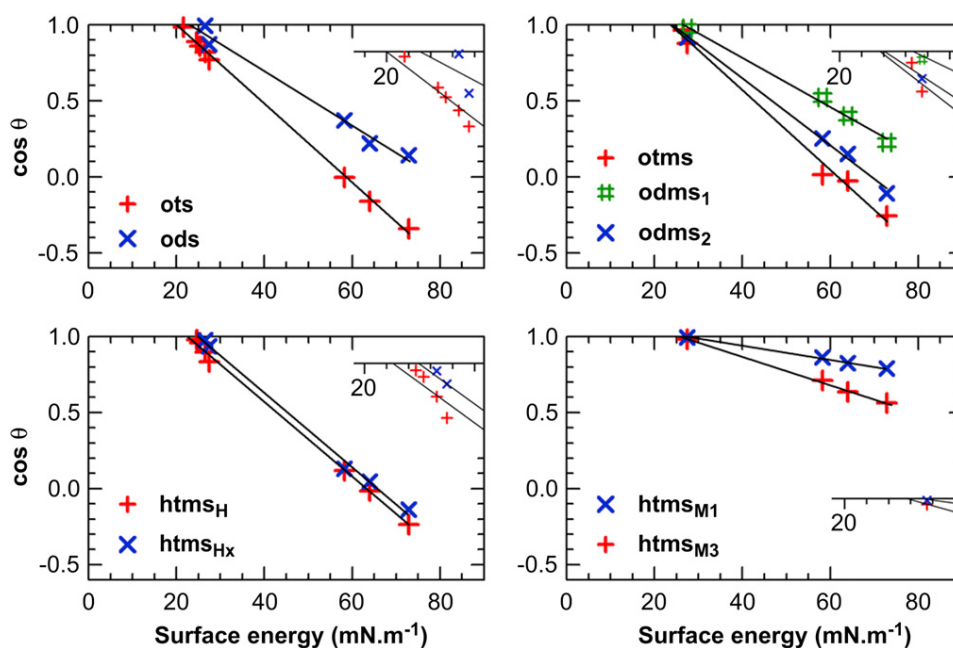


Fig. 6. Zisman plots used to determine the critical surface tension (γ_c) of solid substrates. γ_c values were read where the line fits intersect $\cos \theta = 1$ (numerical values are displayed in Table 4). For each substrates the line fit resulted in $R^2 > 0.99$, except for the ods substrate ($R^2 > 0.985$). Insets: enlargement of the area where the line fits intersect $\cos \theta = 1$ (e.g., γ_c).

as class 1 substrates, PC12 cells did not adhere at all, and clusters of cells were observed that floated over the surface (Fig. 4). This reveals the poor affinity of PC12 cells for substrates exclusively composed of OH groups, or of CH₃ groups. On the contrary, cells did adhere on class 2 and on class 3 SAMs, as well as on incomplete class 1 SAMs. Therefore, it appears that adhesion is favored as soon as some disorder is introduced in the surface arrangement of CH₃ groups. We further hypothesize that is because OH groups, pointing out from the surface, are accessible to the cells. In addition, PC12 cells initiated more neurites (Figs. 4 and 7) on class 3

SAMs (more than 50 mm⁻²) than on class 2 SAMs or on incomplete class 1 SAMs (less than 20 mm⁻²). All in all, it appears that, the more locally heterogeneous is the surface, the more PC12 cells generate neurites. These results are in complete agreement with those of our previous study [5], and provide further evidence that surface disorder, and thus local gradients in surface energy, can trigger neuritogenesis in PC12 cells albeit the absence of NGF treatment.

Our results also indicate that PC12 cells were not highly sensitive to the nanoroughness of our substrates. Cell adhesion and neuritogenesis were similar in ots (rms \approx 0.3 nm) and in htms_H (\sim 1.4 nm). They were also similar in htms_{M1} (\sim 0.9 nm) and in htms_{M3} (\sim 0.3 nm) substrates (Fig. 7). A potential explanation to this result is that the nanoroughness of our substrates is too low to have a critical influence on PC12 cell adhesion and differentiation. In addition, neither the hydrophobicity degree, nor the surface concentration of methyl groups seemed to profoundly affect PC12 cell behavior. The propensity of cells to adhere and differentiate were not significantly different in class 2 SAMs odms₁ ($\theta_{H_2O} = 77^\circ$) and odms₂ (96°), or in class 1 SAMs ots (110°) and htms_H (104°), while differences were obvious between class 2 SAM odms₁ (77°) and class 3 SAM htms_{M3} (56°), or between class 1 SAM htms_H (104°) and incomplete class 1 SAM htms_{Hx} (98°). As a result the chemical heterogeneity, that is the alternation between CH₃ and OH groups at the nanoscale level, seemed to be the determinant factor in generating the surface energy gradients that the cells were able to sense.

The dimension for which these gradients may become effective is still questionable, since the gradients can theoretically emerge out from the surface as soon as a few single OH groups become accessible to the cells. However, actin-based processes such as lamellipodial and filopodial activity can probe the substrate at a dimension of $\sim 150 \mu\text{m}$ [5,45], which may indicate the dimensional range for which the gradients become effective and thus sensed by the cells. Therefore, a potential explanation for this sensing might reside in the translation of the local gradients through lamellipodia and filopodia that can be mediated by external factors, such as calcium transients [46,47].

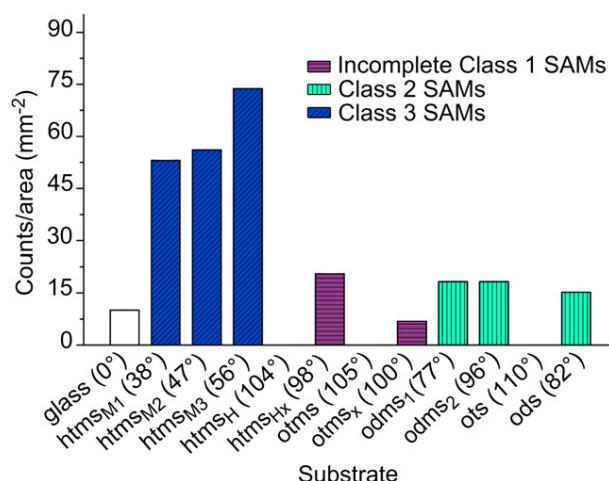


Fig. 7. Propensity of PC12 cells to initiate neurite outgrowth without NGF treatment, according to the substrate, 48 h after seeding. Several pictures of cells were taken and the number of grown neurites ($L > 25 \mu\text{m}$) was counted on each substrate. The data are from one experiment representative of at least three independent measurements. They reflect typical differences between substrate classes. On class 1 SAMs, cells did not adhere, and thus did not initiate any neurites. Conversely, on class 2 SAMs and incomplete class 1 SAMs, cells adhered and initiate few neurites. On class 3 SAMs, adhesion was enhanced and cells generated more neurites. The values in parentheses indicate the water contact angle on each substrate.

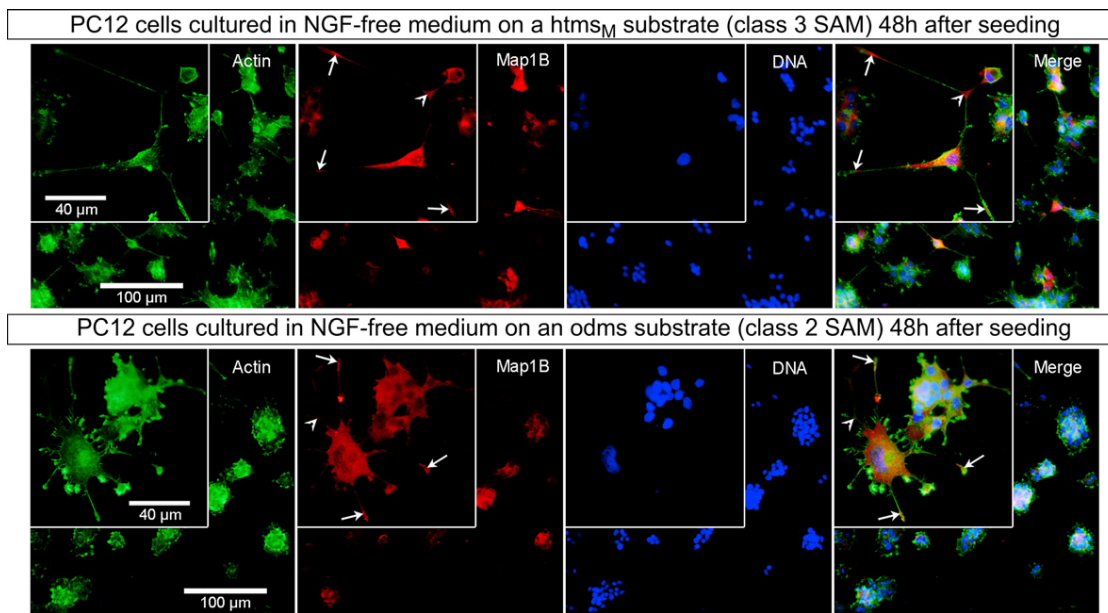


Fig. 8. MAP1B expression and localization in PC12 cells cultured on htms_M and odms substrates, without NGF treatment. MAP1B signal is stronger in isolated cells than in clustered cells. More cells display a strong signal and cells are more often apart on an htms_M substrate than on an odms one, where cells rather tend to group in clusters. Inset boxes: arrows point at higher local concentrations of MAP1B upstream of the growth cones (plain arrows) and at branching/turning points (broken arrows).

Though PC12 cells adhered on moderately disordered class 2 SAMs, they tended to gather in clusters (Figs. 4 and 8), suggesting that these substrates were not optimal, and that cell–cell interactions were favored over cell–substrate adhesive strengths, a typical feature of PC12 cells [48]. Conversely, on highly disordered class 3 SAMs, cells scattered across the surface, with single cells tended to spread (Figs. 4 and 8). This indicates a strong adhesion to the substrate, together with cells showing signs of polarization, what may prefigure neurite extension [49]. This can be correlated with the higher γ_s of class 3 substrates ($\geq 47.9 \text{ mN m}^{-1}$) over class 2 substrates ($\leq 35 \text{ mN m}^{-1}$), in agreement with the dependence of cell-aggregates spreading rate over the substrate adhesivity, that was reported in Ref. [50].

A criterion to evaluate neuronal differentiation is a high level of expression of neuronal markers proteins like MAP1B. MAP1B is a neuron-specific protein involved in microtubule assembly [51]. NGF treatment stimulates MAP1B expression together with PC12 cell differentiation [52]. As expected, high levels of fluorescence reflecting MAP1B concentration was detected in cells that underwent neurite outgrowth on class 3 and on class 2 SAMs, typically in isolated cells or at the periphery of cell clusters, rather than in cells trapped in clusters (Fig. 8). Better adhesiveness allowed more cells to remain apart, not to cluster, on class 3 substrates, whose ability to promote adhesion and to trigger neuronal differentiation of PC12 cells was thereby stronger than that of class 2 substrates. In view of these results, it can be suggested that PC12 cells would adhere but not differentiate if they were seeded on an NH₂-terminated class 1 SAM, as observed on smooth substrates such as bare glass coated with poly-L-lysine or poly-L-ornithine [5].

MAP1B localization in differentiated cells was similar whether PC12 cells were seeded on class 2 or on class 3 substrates (Fig. 8; inset boxes). MAP1B was mostly displayed in the cell soma. Interestingly, MAP1B was also displayed upstream of growth cones (Fig. 8; plain arrows), and at branching/turning points of the neurites (Fig. 8; broken arrows), that is where microtubules are highly dynamic. These results indicate that cell–substrate interactions can mimic NGF effects, leading PC12 cells to start neuritogenesis.

The fact that it only took 48 h for neurites to extend up to $\sim 100 \mu\text{m}$, compared to 4–6 days in our previous study [5], might be related to the reduced volume of medium ($V = 2 \text{ mL}$ to $V = 335 \mu\text{L}$) used for cell seeding in these experiments. Considering that cells might respond to surface energy gradients, by secreting neurotrophic factors, like NGF, their concentration in the cell environment would be higher in this experimental set. Higher concentrations of NGF, for example, are expected to facilitate the activation of signalling pathways leading to neurite outgrowth.

4. Conclusions

In this study, we manufactured culture substrates by distinct chemical treatments of bare glass surfaces in order to obtain an acute control of substrate physical and chemical cues that may be sensed by the cells. We introduced a new perspective on self-assembled-monolayers (SAMs) used as a culture substrate, by ranking them in three distinct classes, including highly ordered surface (class 1), moderately ordered surface (class 2), and highly disordered surface (class 3). Highly surface specific techniques have been used to characterize the substrates. In addition to commonly used FTIR and AFM, the analysis combined SFG, a non-linear optical technique that unveils the surface ordering, with wetting experiments, using the Owens–Wendt model that distinguishes dispersive and polar components of the surface free energy. Taken together, the results harmoniously combined to ascribe to each substrate class a distinct nanostructured organization that generated a specific surface free-energy distribution. Thence, we identified what is the most important parameter involved in generating the SFE gradients that the cells were able to sense. Of all the factors analyzed, including surface nanoroughness, wettability, chemical affinity, terminal-groups concentration, and nanoscale chemical heterogeneities, we demonstrate that, in our experiments, it is nanoscale chemical heterogeneities that have a critical influence on both the adhesion and the differentiation of PC12 cells. Moreover, we show that PC12 cells can reach a fully stable state of differentiation by 48 h of culture on rigid model surfaces (class 3 SAMs of

alkylsiloxanes on glass), without nerve growth factor treatment. Earlier experimental data demonstrating the influence of substrate factors, such as mechanical, spatial and chemical cues, on neuronal cell functions, would gain in being reappraised in light of this new criterion (e.g., substrate nanoscale chemical heterogeneities) and, in turn, future experiments will have to challenge it. It is reasonable to assume that other systems, in addition to PC12 cells, such as primary neurons or astrocytes, may be dramatically affected by nanoscale surface organization. Therefore, future design of biomaterials may integrate local gradients in surface free energy as a mean to enhance regeneration of hippocampal or cortical neurons for instance. In addition, future experiments should investigate the mediators of the nanoscale SFE gradients. In particular, it should be determined whether PC12 cells can respond to these substrate physical cues directly or through components of the culture medium such as calcium and serum proteins.

Acknowledgements

We thank Dr. Sylvain Gabriele for critical reading of the manuscript.

The Descartes group acknowledges the support of the French Ministry of Research, the University of Paris Diderot, the IFR95, and of the University of Paris Descartes. The Temple group acknowledges the support of the NSF.

Appendix

Figures with essential colour discrimination. Most of the figures in this article have parts that are difficult to interpret in black and white. The full colour images can be found in the on-line version, at doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.099.

References

- Letourneau PC. Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. *Dev Biol* 1975;44:92–101.
- Letourneau PC. Possible roles for cell-to-substratum adhesion in neuronal morphogenesis. *Dev Biol* 1975;44:77–91.
- Suter DM, Forscher P. Substrate–cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J Neurobiol* 2000;44:97–113.
- Murnane AC, Brown K, Keith CH. Preferential initiation of PC12 neurites in directions of changing substrate adhesivity. *J Neurosci Res* 2002;67:321–8.
- Lamour G, Journiac N, Souès S, Bonneau S, Nassoy P, et al. Influence of surface energy distribution on neuritogenesis. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009;72:208–18.
- Fan YW, Cui FZ, Hou SP, Xu QY, Chen LN, et al. Culture of neural cells on silicon wafers with nano-scale surface topograph. *J Neurosci Methods* 2002;120:17–23.
- Badami AS, Kreke MR, Thompson MS, Riffle JS, Goldstein AS. Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates. *Biomaterials* 2006;27:596–606.
- Staii C, Viesselmann C, Ballweg J, Shi L, Liu G, et al. Positioning and guidance of neurons on gold surfaces by directed assembly of proteins using atomic force microscopy. *Biomaterials* 2009;30:3397–404.
- Xiong Y, Lee AC, Suter DM, Lee GU. Topography and nanomechanics of live neuronal growth cones analyzed by atomic force microscopy. *Biophys J* 2009;96:5060–72.
- Stenger DA, Pike CJ, Hickman JJ, Cotman CW. Surface determinants of neuronal survival and growth on self-assembled monolayers in culture. *Brain Res* 1993;630:136–47.
- Lee MH, Brass DA, Morris R, Composto RJ, Ducheyne P. The effect of non-specific interactions on cellular adhesion using model surfaces. *Biomaterials* 2005;26:1721–30.
- Ren Y, Zhang H, Huang H, Wang X, Zhou Z, et al. In vitro behavior of neural stem cells in response to different chemical functional groups. *Biomaterials* 2009;30:1036–44.
- Saha K, Keung AJ, Irwin EF, Li Y, Little L, et al. Substrate modulus directs neural stem cell behavior. *Biophys J* 2008;95:4426–38.
- Teixeira AI, Ilkhanizadeh S, Wigenius JA, Duckworth JK, Inghanas O, et al. The promotion of neuronal maturation on soft substrates. *Biomaterials* 2009;30:4567–72.
- Janmey PA, Winer JP, Murray ME, Wen Q. The hard life of soft cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 2009;66:597–605.
- Leipzig ND, Shoichet MS. The effect of substrate stiffness on adult neural stem cell behavior. *Biomaterials* 2009;30:6867–78.
- Flanagan LA, Ju YE, Marg B, Osterfield M, Janmey PA. Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport* 2002;13:2411–5.
- Schwarz US, Bischofs IB. Physical determinants of cell organization in soft media. *Med Eng Phys* 2005;27:763–72.
- Senaratne W, Andruzzi L, Ober CK. Self-assembled monolayers and polymer brushes in biotechnology: current applications and future perspectives. *Biomacromolecules* 2005;6:2427–48.
- Barrias CC, Martins MCL, Almeida-Porada G, Barbosa MA, Granja PL. The correlation between the adsorption of adhesive proteins and cell behaviour on hydroxyl-methyl mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials* 2009;30:307–16.
- Kleinfeld D, Kahler KH, Hockberger PE. Controlled outgrowth of dissociated neurons on patterned substrates. *J Neurosci* 1988;8:4098–120.
- Kapur R, Rudolph AS. Cellular and cytoskeleton morphology and strength of adhesion of cells on self-assembled monolayers of organosilanes. *Exp Cell Res* 1998;244:275–85.
- Sukenik CN, Balachander N, Culp LA, Lewandowska K, Merritt K. Modulation of cell-adhesion by modification of titanium surfaces with covalently attached self-assembled monolayers. *J Biomed Mater Res* 1990;24:1307–23.
- Wehrman T, He X, Raab B, Dukipatti A, Blau H, et al. Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron* 2007;53:25–38.
- Mischel PS, Umbach JA, Eskandari S, Smith SG, Gundersen CB, et al. Nerve growth factor signals via preexisting TrkA receptor oligomers. *Biophys J* 2002;83:968–76.
- Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;73:2424–8.
- Fujii DK, Massoglia SL, Savion N, Gospodarowicz D. Neurite outgrowth and protein synthesis by PC12 cells as a function of substratum and nerve growth factor. *J Neurosci* 1982;2:1157–75.
- Wujek JR, Akeson RA. Extracellular matrix derived from astrocytes stimulates neuritic outgrowth from PC12 cells in vitro. *Brain Res* 1987;431:87–97.
- Arkles B. Tailoring surfaces with silanes. *Chemtech* 1977;7:766–78.
- Shen YR. Sum-frequency generation. In: *The principles of nonlinear optics*. New York: Wiley-Interscience; 1984. pp. 67–85.
- Eftekhari-Bafrooei A, Borguet E. Effect of surface charge on the vibrational dynamics of interfacial water. *J Am Chem Soc* 2009;131:12034–5.
- Owens DK, Wendt RC. Estimation of surface free energy of polymers. *J Appl Polym Sci* 1969;13:1741–7.
- Kwok DY, Li D, Neumann AW. Evaluation of the Lifshitz Van-der-Waals acid–base approach to determine interfacial-tensions. *Langmuir* 1994;10:1323–8.
- Zisman WA. Contact angle, wettability and adhesion. *Adv Chem Ser* 1964;43:1–51.
- Good RJ, Girifalco LA. A theory for estimation of surface and interfacial energies.3. Estimation of surface energies of solids from contact angle data. *J Phys Chem* 1960;64:561–5.
- Ulman A. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem Rev* 1996;96:1533–54.
- Porter MD, Bright TB, Allara DL, Chidsey CED. Spontaneously organized molecular assemblies .4. Structural characterization of normal-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared-spectroscopy, and electrochemistry. *J Am Chem Soc* 1987;109:3559–68.
- Guyotssonnet P, Superfine R, Hunt JH, Shen YR. Vibrational spectroscopy of a silane monolayer at air solid and liquid solid interfaces using sum-frequency generation. *Chem Phys Lett* 1988;144:1–5.
- Fisher JC. The fracture of liquids. *J Appl Phys* 1948;19:1062–7.
- Degennes PG, Brochard-Wyart F, Quéré D. Capillarité: Interfaces mobiles. In: *Gouttes, bulles, perles et ondes*. Paris: Belin; 2005. pp. 11–37.
- Adamson AW, Gast AP. The solid–liquid interface-contact angle. In: *Physical chemistry of surfaces*. 6th ed. New York: Wiley-Interscience; 1997. pp. 347–89.
- Degennes PG. Wetting – statics and dynamics. *Rev Mod Phys* 1985;57:827–63.
- Chow TS. Wetting of rough surfaces. *J Phys Condens Matter* 1998;10:L445–51.
- Zografi G, Tam SS. Wettability of pharmaceutical solids – estimates of solid-surface polarity. *J Pharm Sci* 1976;65:1145–9.
- Mogilner A, Rubinstein B. The physics of filopodial protrusion. *Biophys J* 2005;89:782–95.
- Gomez TM, Robles E, Poo M, Spitzer NC. Filopodial calcium transients promote substrate-dependent growth cone turning. *Science* 2001;291:1983–7.
- Veksler A, Gov NS. Calcium-actin waves and oscillations of cellular membranes. *Biophys J* 2009;97:1558–68.
- Greene LA, Aletta JM, Rukenstein A, Green SH. PC12 pheochromocytoma cells: culture, nerve growth factor treatment, and experimental exploitation. *Methods Enzymol* 1987;147:207–16.
- Matta LL, Aranda-Espinoza H. Neuronal systems & modeling; strong adhesion identifies potential neurite extension and polarization sites in PC12 cells. *Biophys J* 2008;94:1055–7.
- Ryan PL, Foty RA, Kohn J, Steinberg MS. Tissue spreading on implantable substrates is a competitive outcome of cell–cell vs. cell–substratum adhesivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4323–7.
- Gordonweeks PR. Growth cones – the mechanism of neurite advance. *Bio-Essays* 1991;13:235–9.
- Drubin DG, Feinstein SC, Shooter EM, Kirschner MW. Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J Cell Biol* 1985;101:1799–807.

Annexe E

Article en cours de publication dans la revue *Journal of Chemical Education*

Cet article décrit la mesure des angles de contact et le montage expérimental que nous avons utilisé tout au long de cette étude. L'utilité de ce dispositif tient à son coût relativement peu élevé, allant de pair avec une précision intéressante sur les mesures effectuées. Nous illustrons le principe du montage, le principe de la mesure des angles, et leur application éventuelle à travers la construction du Zisman plot du substrat modèle ots. Les figures et les descriptions de l'article correspondent à celles exposées dans ce document au [chapitre 3](#) (pages 57–63).

Notons que l'appareillage décrit dans cet article a été assemblé dans le laboratoire du Pr. Eric BORGUET de l'université Temple (Philadelphie, PA). De ce fait, il diffère légèrement de celui décrit dans ce travail de thèse. La principale différence réside dans l'utilisation d'un simple appareil photo numérique (dans l'article) alors que le montage photographié et exposé à la [figure 3.6](#) est muni d'une caméra vidéo analogique dotée d'un objectif beaucoup plus puissant. En outre, l'article ne fait pas mention de la mesure des angles d'avancée et de recul.

Contact Angle Measurements Using a Simplified Experimental Set-Up.

Guillaume Lamour^a, Ahmed Hamraoui^a, Andrii Buvailo^{b,c}, Yangjun Xing^b, Sean Keulayan^b, Vivek Prakash^b, Ali Eftekhari-Bafrooei^b, and Eric Borguet^{b,*}.

^aNeuro-Physique Cellulaire, Université Paris Descartes, UFR Biomédicale, 45 Rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France.

^bDepartment of Chemistry, Temple University, Philadelphia, Pennsylvania 19122 USA.

^cKyiv National Taras Shevchenko University, Kyiv, Ukraine, 01033.

*Correspondence author. Email: eborguet@temple.edu. Tel: (215) 204-9696. Fax: (215) 204-9530.

Abstract

In this paper we report a simplified set-up to measure the static contact angle of a liquid drop in contact with a solid. The image of the drop is made with a simple digital camera by taking a picture which is magnified by an optical lens. The profile of the drop is then processed under ImageJ free software. ImageJ contact angle plugin detects the edge of the drop and fits its profile to a circle or an ellipse, then the tangent is calculated by the macro and is drawn at the triple line contact, thus returning the value of the contact angle with acute precision.

Keywords: General Public; Third-Year Undergraduate; Fourth-Year Undergraduate; Chemistry; Chemical Engineering; Demonstrations; Surface Science; Contact Angle; Liquid Solid Interface; Surface Energy; Drop; Instrumentation.

Introduction

Contact angle measurements are often used to evaluate surface and liquid cleanliness and the effects of surface treatments developed as a part of fundamental research in surface science, as well as for industrial applications. An accurate characterization of surfaces is required in a wide range of research fields, such as surface chemistry and biomaterials (1). In addition to techniques such as Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) (2), second-harmonic generation (SHG) or sum-frequency generation (SFG) (3), atomic force microscopy (AFM) (4), X-ray photoelectron microscopy (XPS) (5), and ellipsometry (6), contact angle measurement is useful in the evaluation of surface macroscopic properties, such as surface energy (7) and wettability (8).

A drop of pure liquid on a plane solid surface experiences adhesive forces acting between the liquid and the solid surface that favor spreading, while the cohesive forces within the liquid counteract the spreading. The balance between these forces determines the contact angle, θ (Fig. 1). This balance is described by Young's equation (9) (eq. 1) that relates the contact angle to the surface free energies,

$$\gamma^{SV} - \gamma^{SL} = \gamma^{LV} \cos \theta \quad (\text{eq. 1})$$

of a system containing solid (S), liquid (L), and vapor (V) phases. γ^{SV} is the solid surface free energy, γ^{LV} is the liquid surface free energy (also called "surface tension"), and γ^{SL} is the solid/liquid interfacial free energy. A solid surface, with a surface energy that is higher than the surface tension of a liquid drop, will undergo complete wetting so that adhesiveness dominates, and the drop spreads such that the contact angle is 0° . This can be illustrated by the complete spreading of water on any substrate that has a higher surface energy than that of the water itself (*i.e.* $> 72.8 \text{ mN m}^{-1}$, water surface tension). If the substrate has a relatively high surface energy, yet lower than the liquid's surface tension, the liquid will wet the solid surface and the resulting contact angle is $0^\circ < \theta < 90^\circ$ (Fig. 1c). Conversely, if the surface energy of the solid surface is low, it will undergo poor wetting and poor adhesiveness of the drop, resulting in a larger contact angle. For example, a water drop that has a contact angle $> 90^\circ$ (Fig. 1a; Fig. 2b) is characterized as "non-wetting", and the solid surface is said to be hydrophobic.

Measuring contact angles with a high level of precision usually requires high-tech contact-angle goniometers that can perform a great number of automated measurements ($N = 50 - 100$) per drop, thus reducing the error on each returned average value (10). Such goniometers may not be necessarily needed, especially for re-

searchers that are mostly concerned in performing routine controls on the quality of their sample surfaces, rather than making wetting studies that require the best equipment available. For instance, when making self-assembled-monolayer (SAM) covered substrates for cell culture (1), a precision of $\pm 1-2^\circ$ in one single measurement is sufficient, as biological response, by nature, will not be critically sensitive to small variations in substrate wettability. Therefore, the simple experimental apparatus described here provides a convenient alternative to commercial goniometers, since the method allows measurements with sufficient precision to be obtained, while being quite accessible in terms of cost and ease of construction.

In addition, practical experience in determining contact angle and surface energies would be advantageous to students, in a course such as physical chemistry. Besides learning how to optimize the configuration of the apparatus, the students would be acquainted with the sensitivity of contact angle measurements, which highly depends on the quality of the solid surface, and on the cleanliness of the test liquid(s). Therefore, the students would learn the importance of cleaning and drying the sample surface, *i.e.* performing experiments carefully and with attention to detail. More generally, and beyond experimental considerations, it should be emphasized that the contact angle measurement is a most reliable technique to characterize solid-liquid interfaces, and the most simple and accessible technique available to measure the surface tension of solid surfaces. Step-by-step instructions on how to make a contact angle measurement are provided in the supplementary material.

Hardware assembly

A schematic view of the set-up is described in the sketch in Fig. 2c. All parts, except lighting system, are mounted on an aluminium breadboard. Thus, the optical components are kept stable and fixed, while the sample support is mounted on a translation system, allowing for subtle focus adjustments. Details of all the parts used to assemble the system can be found in Table 1.

The list of optical parts includes a basic digital camera (Sony, Cyber-Shot, 5.1 megapixels) and an optical lens with a focal distance of 50.0 mm (Thorlabs, BK7 A-coated Plano-Convex Lens, 25.4 mm-diameter), that is situated between the camera and the sample (Fig. 2a). A lamp is positioned behind the sample in order for the liquid drop to appear black, which is necessary for measurement precision as well as for image processing. A box (Fig. 2b), covered with sheets of aluminum foil, is positioned over the lens and the sample, thus rejecting stray light.

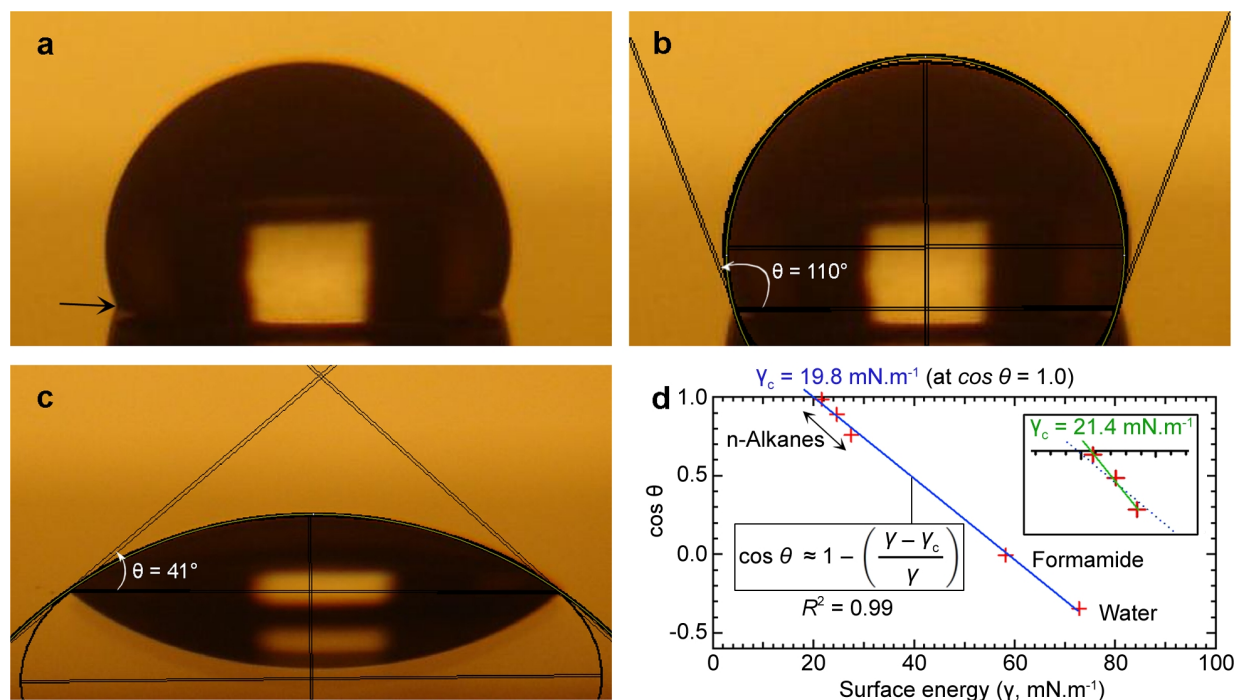


Fig. 1. Liquid drops in contact with a solid surface (ODS SAM on glass slide). (a) Drop of deionized water (5 μl) on ODS surface. Arrow points the solid/liquid/air point, where the contact angle is measured. (b) Same drop as in (a) processed under ImageJ software using “Contact Angle” plug-in. The contact angle is the angle formed between the base line and the tangent at the triple line (here: $\theta = 110^\circ$). (c) Drop of n-Hexadecane (5 μl) on ODS SAM, processed under ImageJ. Contact angle is 41° . The profile of the drops in (b) and (c) is automatically fitted using the ellipse approximation. A possible application of contact angle measurements is to determine critical surface energy (γ_c) of the solid surface using a Zisman plot (d). Inset box at top right represents the line fit of data for n-alkanes liquids only, that supposedly returns a more accurate value for the critical surface tension of an ODS SAM. The dashed line in the inset box is equivalent to the line fit for all liquids.

The box dimensions are not critical, providing that the box covers the sample and lens assembly. The liquid drop should not reflect any stray light that could spoil the measurement. The use of the box can be avoided, providing the experiments are conducted in a room where light intensity is lower than the light intensity produced by the lamp. Nevertheless, the box is also useful to prevent drops being polluted by air contaminants such as dust.

The most critical element, relating to the precision of measurements, is the lighting system. Careful attention should to be paid to the lighting in order to generate a background, behind the drop, that is suitably homogeneous (Fig. 1a) for the image to be further

processed, and hence for contact angles to be calculated (Fig. 1b; Fig. 1c). Good results in homogenizing the background are obtained through positioning a diffuser such as tracing paper between the drop and the lamp as shown in Fig 2c.. Any commercial lamp with power between 50W and 200W can be used to provide the light source.

In addition, the height of the camera should be adjusted so that the actual drop and its reflection on the glass substrate can be observed. Thus, one can precisely determine position of the triple line (at intersection of solid/liquid/air interfaces) between the two, marked by an arrow in Fig. 1a.

Table 1. List of all components used to make the contact angle measurement experimental apparatus, as presented in Fig. 2a.

Brand	Specification	Part number	Quantity
Sony	Cyber-Shot, 5.1 Mpxl	DSC-P93	1
OptoSigma	Aluminum Linear Ball Bearing Stage	123-0710/0715	1
Thorlabs	Aluminum Breadboard, 8" x 8" x $\frac{1}{2}$ ", $\frac{1}{4}$ -20 Threaded Mounting Base, 1" x 3" x $\frac{3}{8}$ " (25 x 75 x 10 mm)	MB8	1
	Post Holder with Spring-Loaded Thumbscrew, L=3"	BA1	4
	Post Holder with Spring-Loaded Thumbscrew, L=2"	PH3-ST	1
	Adapts $\phi 1$ "-Optic to $\phi 2$ "-Mount	PH2-ST	2
	SM1 Retaining Ring for $\phi 1$ " Lens Tubes and Mounts	AD2	1
	$\frac{1}{4}$ "-20 Locking Thumbscrew for Post Holders, Brass, 10 Per Box	SM1RR	1
	($\phi \frac{1}{2}$ " x 1.5")-Post	TS25B031	1
	Cap Screw Kit	TR1.5	3
	BK7 A-Coated Plano-Convex Lens, $\phi = 25.4$ mm, $f = 50.0$ mm	HW-KIT2/M M6-1.0 Screws	1
		LA1131-A	1

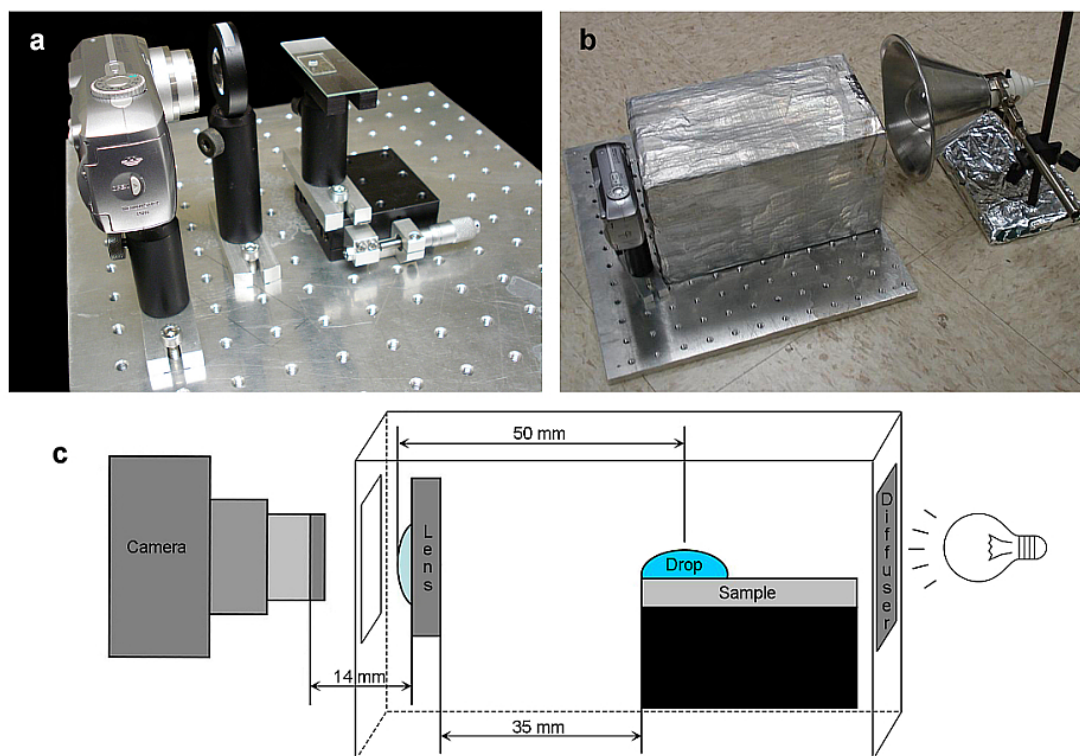


Fig. 2. Set-up used to measure contact angles. All the “internal” elements of the experimental apparatus are shown in picture (a), while picture (b) depicts elements external to the box, such as lighting system. The sketch in (c) precisely describes the configuration, along with the critical distances between some essential parts, such as camera, lens and sample area.

Measuring contact angles

The contact angle measurement is illustrated in the case of drops ($V = 5 \mu\text{l}$) of deionized water (Fig. 1a; Fig. 1b) and of n-hexadecane (Fig. 1c) (Sigma, > 99%) on a glass slide (VWR micro slides, $25 \times 75 \times 1 \text{ mm}^3$, cut with a diamond tip) modified with octadecyltrichlorosilane (OTS, Gelest Inc.), so as to obtain a surface evenly coated with monolayer of octadecylsilane (ODS) groups: an ODS SAM. The procedure to make this substrate can be found elsewhere (11). The ODS SAM has hydrophobic terminal methyl groups, and thus the contact angle for water is $> 90^\circ$ (Fig. 1a and Fig. 1b). The images presented are taken directly with the camera. No image treatment, such as contrast enhancing, has been done to further process images in order to determine contact angles.

The same drop of deionized H_2O on an ODS SAM (as in Fig. 1a) is shown in Fig. 1b after processing by ImageJ free software (12) using the “Contact Angle” plug-in (13). For each measurement, the user must choose two points to manually define the base line, with 3 other points required by the software along the drop profile (see the supplementary material that features a set of instructions supplying all the details on the procedure used to make the measurement). Afterward, the program fits the profile of the drop and then calculates the contact angle using the sphere approximation or the ellipse approximation. In our study the ellipse approximation gave consistent results for contact angles $> 40^\circ$. For drops with contact angles $< 40^\circ$, we used the sphere approximation. In order to evaluate the level of precision, on the analysis of a single drop, that is obtained using this method, the image of the drop shown in Fig. 1a was processed 50 times as described above by the ImageJ contact angle plug-in (as in Fig. 1b) and the returned value of contact angle was

$110.2 \pm 0.4^\circ$. The difference between the maximum and minimum measured values was equal to 1.7° . For an n-hexadecane drop, which has a lower contact angle on the same surface (Fig. 2c), contact angle was $40.7 \pm 0.6^\circ$, with a difference between max. and min. measured values that was equal to 2.4° . These values obtained for water and n-hexadecane drops are in good agreement with those reported in the literature for the same substrate (14–16). Moreover, the level of precision obtained for the analysis of one single drop appears to be comparable to those obtained with commercial contact angle goniometers (10). The same type of measurements were done with drops of formamide, n-undecane and n-octane on the same surface, displaying similar results in terms of precision. The results of all measurements made are summarized in Table 2.

It is noted that in order to obtain reasonable precision on one single measurement of a specific liquid on a specific substrate, the user should perform the analysis of multiple drops (at least 3). The mean value of the analysis of these drops is the contact angle value for the liquid and surface under consideration. It is also noted that according to experimental conditions, the standard deviation of the mean contact angle value may be higher than the uncertainty on the analysis of one single drop, reported in Table 2. Thus the user is not requested to perform more than one single analysis per image, providing the line fit of the drop profile looks accurate.

Determination of the critical surface tension of the solid substrate

Determining contact angles using several liquids, which display different surface tensions, can help in establishing the critical surface tension (γ_c) of the organic monolayer when surfaces are modified.

Table 2. Static contact angles measured for several test liquids, using one drop per liquid on octadecylsilane self-assembled monolayer (ODS SAM) on glass. All values were obtained by fitting images of drops with the ImageJ contact angle plug-in. Drops of water, formamide, and n-hexadecane were fitted using the ellipse approximation, while drops of n-undecane and n-octane were fitted using the sphere approximation.

	Water	Formamide	n-Hexadecane	n-Undecane	n-Octane
Surface tension (γ , $mN.m^{-1}$)	(72.80)	(58.20)	(27.47)	(24.66)	(21.62)
θ , deg, Min. value	109.6	88.6	39.4	26.5	9.4
θ , deg, Mean \pm Std. dev. (N*)	110.2 \pm 0.4 (50)	90.3 \pm 0.8 (50)	40.7 \pm 0.6 (50)	27.3 \pm 0.4 (20)	9.8 \pm 0.4 (20)
θ , deg, Max. value	111.3	92.2	41.8	27.9	10.8

* # of times the contact angle was evaluated for a single image.

As an example, the critical surface tension (γ_c) of the ODS substrate has been determined by measuring the static contact angle of liquid droplets (see table 2). The values of γ_c are calculated using the Fox–Zisman approximation (17). In this paper, it can be understood as a first-order approximation of the Good–Girifalco equation (18), for a surface tension of the liquid γ ($\gamma > \gamma_c$) close to the critical surface tension γ_c of the solid. Thus, a better plot of the contact angle is $\cos \theta$ versus $\gamma^{\frac{1}{2}}$, i.e.:

$$\cos \theta = -1 + 2 \left(\frac{\gamma_c}{\gamma} \right)^{\frac{1}{2}}. \quad (\text{eq. 2})$$

A linear approximation of eq. 2 in the vicinity of γ_c (Fox-Zisman) gives:

$$\cos \theta \approx 1 - \left(\frac{\gamma - \gamma_c}{\gamma} \right) \quad (\text{eq. 3})$$

implying that when $\cos \theta = 1$ then $\gamma = \gamma_c$. This relationship is presented graphically in Fig. 1d. It is made by fitting the data for the test liquids, using a linear regression analysis, to $\cos \theta = 1.0$, as described by Zisman (17). As a result, the critical surface energy determined for the ODS SAM is $\gamma_c = 19.8 \pm 1.5 \text{ mN m}^{-1}$. In considering surface tensions, the “more energetic” component is wetted by the “less energetic”. Since γ_c is assimilated to the surface tension (i.e. surface energy) of the solid, all liquids that have a surface tension $\gamma > \gamma_c$ will not wet this solid (i.e. $\gamma > 0^\circ$), and conversely, all liquids with $\gamma < \gamma_c$ will wet the solid surface (i.e. $\gamma = 0^\circ$). Thus, the ODS SAM will undergo complete wetting of any liquid that has a surface tension below $\gamma_c = 19.8 \text{ mN m}^{-1}$. This value compares favorably with literature values determined by Tillman et al. ($\gamma_c = 20.2 \text{ mN m}^{-1}$) (14) and Kulkarni et al. ($\gamma_c = 20.7 \text{ mN m}^{-1}$) (19) using the same method.

Here, the line fit of data obtained for H₂O, formamide, and n-alkanes, was made considering that the ODS SAM is homogeneous and does not exhibit large roughness and polar contributions, known to be able to critically influence contact angles (20, 21). Starting from this postulate, we can also consider that, because n-alkane liquids have no polar contribution in their surface tensions (contrary to water and formamide), a more accurate line fit is obtained when fitting the data using only n-alkane liquids (inset box in Fig. 1d). The result is $\gamma_c = 21.4 \pm 0.5 \text{ mN m}^{-1}$, that is probably an estimation closer to the “real” surface tension of the ODS substrate.

Conclusion

In this article we considered a simple, efficient and inexpensive apparatus for equilibrium contact angle measurements that proved to be adequate for measuring contact angles, and thus to estimate correctly the critical surface tension, using the model derived from the theory of Good and Girifalco. The experimental results, summarized in Table 2, were obtained with ImageJ. This free and easily accessible image analysis software (with macros), returned precise and stable values of the contact angles in both relatively high ($\theta \geq 90^\circ$) and rather low ($\theta \leq 40^\circ$) degree regions. The set-up

developed in this work can be a valuable instrument when a low cost routine characterization of the surface is needed. It can be used for student laboratory instruction in educational institutions as well as for performing surface studies for actual research applications, for instance in biomedical fields.

Literature cited

- Lamour, G.; Journiac, N.; Souès, S.; Bonneau, S.; Nassoy, P.; Hamraoui, A. *Colloids Surf. B* **2009**, *72*, 208-218.
- Feng, X.; Matranga, C.; Vidic, R.; Borguet, E. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 19949-19954.
- Fomenko, V.; Gusev, E. P.; Borguet, E. *J. Appl. Phys.* **2005**, *97*, 083711.
- Seo, K.; Borguet, E. *Langmuir* **2006**, *22*, 1388-1391.
- Moroseac, M.; Skala, T.; Veltruska, K.; Matolin, V.; Matolinova, I. In XPS and SSIMS studies of Pd/SnOx system: reduction and oxidation in hydrogen containing air. In *22nd European Conference on Surface Science (ECOSS 22), September 7-12, 2003 (Prague, Czech Republic)*; Surf. Sci. 2004, Vol. 566, pp 1118-1123.
- Bodlaki, D.; Borguet, E. *J. Appl. Phys.* **2004**, *95*, 4675-4680.
- Kabza, K.; Gestwicki, J. E.; McGrath, J. L. *J. Chem. Educ.* **2000**, *77*, 63-65.
- Degennes, P. G. *Rev. Mod. Phys.* **1985**, *57*, 827-863.
- Young, T. *Philos. Trans. R. Soc. London* **1805**, *95*, 65-87.
- Barankin, M. D.; Gonzalez, E.; Habib, S. B.; Gao, L.; Guschl, P. C.; Hicks, R. F. *Langmuir* **2009**, *25*, 2495-2500.
- Nihonyanagi, S.; Eftekhari-Bafrooei, A.; Hines, J.; Borguet, E. *Langmuir* **2008**, *24*, 5161-5165.
- Rasband, W. Image J, version 1.42., 2009; National Institute of Health; <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>.
- Brugnara, M. Contact Angle plug-in (for ImageJ software), 2006; marco.brugnara@ing.unitn.it; <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugin-ins/contact-angle.html>.
- Tillman, N.; Ulman, A.; Schildkraut, J. S.; Penner, T. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6136-6144.
- Flinn, D. H.; Guzonas, D. A.; Yoon, R. H. *Colloids Surf. A* **1994**, *87*, 163-176.
- Angst, D. L.; Simmons, G. W. *Langmuir* **1991**, *7*, 2236-2242.
- Zisman, W. A. *Adv. Chem. Ser.* **1964**, *43*, 1-51.
- Good, R. J.; Girifalco, L. A. *J. Phys. Chem.* **1960**, *64*, 561-565.
- Kulkarni, S. A.; Mirji, S. A.; Mandale, A. B.; Gupta, R. P.; Vijayamohan, K. P. *Mater. Lett.* **2005**, *59*, 3890-3895.
- Chow, T. S. *J. Phys. Condens. Matter* **1998**, *10*, L445-L451.
- Zografi, G.; Tam, S. S. *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65*, 1145-1149.

Bibliographie

- [1] Harrison RG. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *Journal of Experimental Zoology*. 1910;9:787–848.
- [2] Goldberg S. Studies on mechanics of development of visual pathways in chick-embryo. *Developmental Biology*. 1974;36:24–43.
- [3] Das GD, Lammert GL, McAllister JP. Contact guidance and migratory cells in developing cerebellum. *Brain Research*. 1974;69:13–29.
- [4] Adler J. Method for measuring chemotaxis and use of method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia-Coli*. *Journal of General Microbiology*. 1973;74:77–91.
- [5] Letourneau PC. Possible roles for cell-to-substratum adhesion in neuronal morphogenesis. *Developmental Biology*. 1975;44:77–91.
- [6] Letourneau PC. Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. *Developmental Biology*. 1975;44:92–101.
- [7] Harris A. Behavior of cultured cells on substrata of variable adhesiveness. *Experimental Cell Research*. 1973;77:285–297.
- [8] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126:677–689.
- [9] Nguyen QT, Sanes JR, Lichtman JW. Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nature Neuroscience*. 2002;5:861–867.
- [10] Richardson PM, Issa VMK, Shemie S. Regeneration and retrograde degeneration of axons in the rat optic-nerve. *Journal of Neurocytology*. 1982;11:949–966.
- [11] Anders JJ, Hurlock JA. Transplanted glial scar impedes olfactory bulb reinnervation. *Experimental Neurology*. 1996;142:144–150.
- [12] Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Research Bulletin*. 1999;6:377–391.
- [13] Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004;5:146–156.
- [14] Schnell L, Schwab ME. Axonal regeneration in the rat spinal-cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth-inhibitors. *Nature*. 1990;343:269–272.
- [15] Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, Barde YA, Schwab ME. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal-cord lesion. *Nature*. 1994;367:170–173.
- [16] Murnane AC, Brown K, Keith CH. Preferential initiation of PC12 neurites in directions of changing substrate adhesivity. *Journal of Neuroscience Research*. 2002;67:321–328.
- [17] Mitchison T, Kirschner M. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron*. 1988;1:761–772.
- [18] Suter DM, Forscher P. Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *Journal of Neurobiology*. 2000;44:97–113.
- [19] Zheng JQ. Turning of nerve growth cones induced by localized increases in intracellular calcium ions. *Nature*. 2000;403:89–93.

- [20] Gomez TM, Robles E, Poo M, Spitzer NC. Filopodial calcium transients promote substrate-dependent growth cone turning. *Science*. 2001;291:1983–1987.
- [21] Arregui CO, Carbonetto S, McKerracher L. Characterization of neural cell adhesion sites: Point contacts are the sites of interaction between integrins and the cytoskeleton in PC12 cells. *Journal of Neuroscience*. 1994;14:6967–6977.
- [22] Woo S, Gomez TM. Rac1 and RhoA promote neurite outgrowth through formation and stabilization of growth cone point contacts. *Journal of Neuroscience*. 2006;26:1418–1428.
- [23] Fan YW, Cui FZ, Hou SP, Xu QY, Chen LN, Lee IS. Culture of neural cells on silicon wafers with nano-scale surface topography. *Journal of Neuroscience Methods*. 2002;120:17–23.
- [24] Badami AS, Kreke MR, Thompson MS, Riffle JS, Goldstein AS. Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates. *Biomaterials*. 2006;27:596–606.
- [25] Staii C, Viesselmann C, Ballweg J, Shi L, Liu Gy, Williams JC, Dent EW, Coppersmith SN, Eriksson MA. Positioning and guidance of neurons on gold surfaces by directed assembly of proteins using atomic force microscopy. *Biomaterials*. 2009;30:3397–3404.
- [26] Xiong Y, Lee AC, Suter DM, Lee GU. Topography and nanomechanics of live neuronal growth cones analyzed by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*. 2009;96:5060–5072.
- [27] Stenger DA, Pike CJ, Hickman JJ, Cotman CW. Surface determinants of neuronal survival and growth on self-assembled monolayers in culture. *Brain Research*. 1993;630:136–147.
- [28] Lee MH, Brass DA, Morris R, Composto RJ, Ducheyne P. The effect of non-specific interactions on cellular adhesion using model surfaces. *Biomaterials*. 2005;26:1721–1730.
- [29] Ren YJ, Zhang H, Huang H, Wang XM, Zhou ZY, Cui FZ, An YH. In vitro behavior of neural stem cells in response to different chemical functional groups. *Biomaterials*. 2009;30:1036–1044.
- [30] Saha K, Keung AJ, Irwin EF, Li Y, Little L, Schaffer DV, Healy KE. Substrate modulus directs neural stem cell behavior. *Biophysical Journal*. 2008;95:4426–4438.
- [31] Janmey PA, Winer JP, Murray ME, Wen Q. The hard life of soft cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 2009;66:597–605.
- [32] Leipzig ND, Shoichet MS. The effect of substrate stiffness on adult neural stem cell behavior. *Biomaterials*. 2009;30:6867–6878.
- [33] Teixeira AI, Ilkhanizadeh S, Wigenius JA, Duckworth JK, Inganas O, Hermanson O. The promotion of neuronal maturation on soft substrates. *Biomaterials*. 2009;30:4567–4572.
- [34] Flanagan LA, Ju YE, Marg B, Osterfield M, Janmey PA. Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport*. 2002;13:2411–2415.
- [35] Arkles B. Tailoring surfaces with silanes. *Chemtech*. 1977;7:766–778.
- [36] Wise SA, May WE. Effect of C-18 surface coverage on selectivity in reversed-phase liquid-chromatography of polycyclic aromatic-hydrocarbons. *Analytical Chemistry*. 1983;55:1479–1485.
- [37] Impens NREN, van der Voort P, Vansant EF. Silylation of micro-, meso- and non-porous oxides: A review. *Microporous and Mesoporous Materials*. 1999;28:217–232.
- [38] Senaratne W, Andruzzi L, Ober CK. Self-assembled monolayers and polymer brushes in biotechnology: Current applications and future perspectives. *Biomacromolecules*. 2005;6:2427–2448.
- [39] Barrias CC, Martins MCL, Almeida-Porada G, Barbosa MA, Granja PL. The correlation between the adsorption of adhesive proteins and cell behaviour on hydroxyl-methyl mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials*. 2009;30:307–316.
- [40] Romanova EV, Oxley SP, Rubakhin SS, Bohn PW, Sweedler JV. Self-assembled monolayers of alkanethiols on gold modulate electrophysiological parameters and cellular morphology of cultured neurons. *Biomaterials*. 2006;27:1665–1669.

- [41] Ulman A. An introduction to ultrathin organic films: from Langmuir–Blodgett to self-assembly. San Diego: Academic press; 1991.
- [42] Ulman A. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chemical Reviews*. 1996;96:1533–1554.
- [43] Mougin K, Haidara H, Castelein G. Controlling the two-dimensional adhesion and organization of colloidal gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2001;193:231–237.
- [44] Mougin K, Haidara H. Wetting of thin liquid films at nanoscale heterogeneous surfaces. *Europhysics Letters*. 2003;61:660–666.
- [45] Cooper TM, Campbell AL, Crane RL. Formation of polypeptide-dye multilayers by an electrostatic self-assembly technique. *Langmuir*. 1995;11:2713–2718.
- [46] Kleinfeld D, Kahler KH, Hockberger PE. Controlled outgrowth of dissociated neurons on patterned substrates. *Journal of Neuroscience*. 1988;8:4098–4120.
- [47] Kapur R, Rudolph AS. Cellular and cytoskeleton morphology and strength of adhesion of cells on self-assembled monolayers of organosilanes. *Experimental Cell Research*. 1998;244:275–285.
- [48] Sukenik CN, Balachander N, Culp LA, Lewandowska K, Merritt K. Modulation of cell-adhesion by modification of titanium surfaces with covalently attached self-assembled monolayers. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1990;24:1307–1323.
- [49] Schwarz US, Bischofs IB. Physical determinants of cell organization in soft media. *Medical Engineering & Physics*. 2005;27:763–772.
- [50] de Gennes PG, Brochard-Wyart F, Quéré D. Capillarité: Interfaces mobiles. In: *Gouttes, bulles, perles et ondes*. Paris: Belin; 2005. pp. 11–37.
- [51] Adamson AW, Gast AP. The solid-liquid interface-contact angle. In: *Physical chemistry of surfaces*. 6th ed. New York: Wiley Interscience; 1997. pp. 347–389.
- [52] Van Oss CJ, Chaudhury MK, Good RJ. Monopolar surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1987;28:35–64.
- [53] Van Oss CJ, Chaudhury MK, Good RJ. Interfacial Lifshitz–van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chemical Reviews*. 1988;88:927–941.
- [54] Israelachvili J. Intermolecular and surface forces. 2nd ed. London: Academic Press; 1992.
- [55] Zebda A, Sabbah H, Ababou-Girard S, Solal F, Godet C. Surface energy and hybridization studies of amorphous carbon surfaces. *Applied Surface Science*. 2008;254:4980–4991.
- [56] Keesom WH. The second virial coefficient for rigid spherical molecules, whose mutual attraction is equivalent to that of a quadruplet placed at their center. *Proceedings of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences of Amsterdam*. 1915;18:636–646.
- [57] Debye P. Die van der Waalsschen kohasionskräfte. *Physikalische Zeitschrift*. 1920;21:178–186.
- [58] London FZ. Zur theorie und systematik der molekularkraft. *Zeitschrift für Physik*. 1930;63:245–279.
- [59] Lifshitz EM. The theory of molecular attractive forces between solids. *Soviet Physics*. 1956;2:73–83.
- [60] Taddei MM, Mendes TNC, Farina C. An introduction to dispersive interactions. *European Journal of Physics*. 2010;31:89–99.
- [61] Fowkes FM. Acid-base interactions in polymer adhesion. In: Mittal KL, editor. *Physicochemical aspects of polymer surfaces*. vol. 2. New York: Plenum; 1983. .
- [62] de Gennes PG, Brochard-Wyart F, Quéré D. Mouillage et forces à longue portée. In: *Gouttes, bulles, perles et ondes*. Paris: Belin; 2005. pp. 83–97.
- [63] Bonn D, Ross D. Wetting transitions. *Reports on Progress in Physics*. 2001;64:1085–1163.
- [64] Bhushan B. *Handbook of Micro/Nanotribology*. 2nd ed. New York: CRC Press; 1995.

- [65] Isaacs ED, Shukla A, Platzman PM, Hamann DR, Barbiellini B, Tulk CA. Covalency of the hydrogen bond in ice: A direct X-ray measurement. *Physical Review Letters*. 1999;82:600–603.
- [66] Bongrand P. Ligand-receptor interactions. *Reports on Progress in Physics*. 1999;62:921–968.
- [67] Manz A, Pamme N, Iossifidis D. *Bioanalytical chemistry*. London: Imperial College Press; 2004.
- [68] Mao SL, Gao CS, Lo CHL, Wirsching P, Wong CH, Janda KD. Phage-display library selection of high-affinity human single-chain antibodies to tumor-associated carbohydrate antigens sialyl Lewis(x) and Lewis(x). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96:6953–6958.
- [69] Nicholson MW, Barclay AN, Singer MS, Rosen SD, van der Merwe PA. Affinity and kinetic analysis of L-selectin (CD62L) binding to glycosylation-dependent cell-adhesion molecule-1. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:763–770.
- [70] Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. Measuring bonds between surface-associated molecules. *Journal of Immunological Methods*. 1996;196:105–120.
- [71] Barclay AN. Concluding remarks and the challenge from the immune system. *Faraday Discussions*. 1998;111:345–350.
- [72] Bongrand P. Adhesion of cells. In: Lipowsky R, Sackmann E, editors. *Structure and dynamics of membranes*. vol. 1. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.; 1995. pp. 755–892.
- [73] Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules .1. *New England Journal of Medicine*. 1996;334:1526–1529.
- [74] Bell GI, Dembo M, Bongrand P. Cell-adhesion – competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophysical Journal*. 1984;45:1051–1064.
- [75] Tillman N, Ulman A, Schildkraut JS, Penner TL. Incorporation of phenoxy groups in self-assembled monolayers of trichlorosilane derivatives – effects on film thickness, wettability, and molecular-orientation. *Journal of the American Chemical Society*. 1988;110:6136–6144.
- [76] Angst DL, Simmons GW. Moisture absorption characteristics of organosiloxane self-assembled monolayers. *Langmuir*. 1991;7:2236–2242.
- [77] Flinn DH, Guzonas DA, Yoon RH. Characterization of silica surfaces hydrophobized by octadecyltrichlorosilane. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1994;87:163–176.
- [78] Kulkarni SA, Mirji SA, Mandale AB, Gupta RP, Vijayamohanan KP. Growth kinetics and thermodynamic stability of octadecyltrichlorosilane self-assembled monolayer on Si (100) substrate. *Materials Letters*. 2005;59:3890–3895.
- [79] Carraro C, Yauw OW, Sung MM, Maboudian R. Observation of three growth mechanisms in self-assembled monolayers. *Journal of Physical Chemistry B*. 1998;102:4441–4445.
- [80] Foisner J, Glaser A, Leitner T, Hoffmann H, Friedbacher G. Effects of surface hydrophobization on the growth of self-assembled monolayers on silicon. *Langmuir*. 2004;20:2701–2706.
- [81] Engelhardt H, Orth P. Alkoxy silanes for the preparation of silica based stationary phases with bonded polar functional-groups. *Journal of Liquid Chromatography*. 1987;10:1999–2022.
- [82] Tripp CP, Hair ML. Reaction of methylsilanols with hydrated silica surfaces – the hydrolysis of trichloromethylsilanes, dichloromethylsilanes, and monochloromethylsilanes and the effects of curing. *Langmuir*. 1995;11:149–155.
- [83] Salon MCB, Bayle PA, Abdelmouleh M, Boufi S, Belgacem MN. Kinetics of hydrolysis and self condensation reactions of silanes by NMR spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2008;312:83–91.
- [84] Brzoska JB, Shahidzadeh N, Rondelez F. Evidence of a transition-temperature for the optimum deposition of grafted monolayer coatings. *Nature*. 1992;360:719–721.

- [85] Peters RD, Nealey PF, Crain JN, Himpfel FJ. A near edge X-ray absorption fine structure spectroscopy investigation of the structure of self-assembled films of octadecyltrichlorosilane. *Langmuir*. 2002;18:1250–1256.
- [86] Wang MJ, Liechti KM, Wang Q, White JM. Self-assembled silane monolayers: Fabrication with nanoscale uniformity. *Langmuir*. 2005;21:1848–1857.
- [87] Lee S, Ishizaki T, Saito N, Takai O. Effects of humidity and solution age on growth of organosilane self-assembled monolayers. *Japanese Journal of Applied Physics*. 2008;47:6416–6421.
- [88] Legrand AP. *The surface properties of silica*. Chichester: Wiley; 1998.
- [89] Kanan SA, Tze WTY, Tripp CP. Method to double the surface concentration and control the orientation of adsorbed (3-aminopropyl)dimethylethoxysilane on silica powders and glass slides. *Langmuir*. 2002;18:6623–6627.
- [90] Blitz JP, Murthy RSS, Leyden DE. The role of amine structure on catalytic activity for silylation reaction with cab-o-sil. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1988;126:387–392.
- [91] Rogers SL, Letourneau PC, Palm SL, McCarthy J, Furcht LT. Neurite extension by peripheral and central nervous-system neurons in response to substratum-bound fibronectin and laminin. *Developmental Biology*. 1983;98:212–220.
- [92] Greene LA, Aletta JM, Rukenstein A, Green SH. PC12 pheochromocytoma cells: Culture, nerve growth factor treatment, and experimental exploitation. *Methods in Enzymology*. 1987;147:207–216.
- [93] Yamamoto H, Ogawa T, Nishida A. Molecular-weight dependence of wettability and molecular adsorption of poly-L-lysine at the air-water-interface. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1995;176:105–110.
- [94] Yavin E, Yavin Z. Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine-coated surface. *Journal of Cell Biology*. 1974;62:540–546.
- [95] Elbert DL, Hubbell JA. Self-assembly and steric stabilization at heterogeneous, biological surfaces using adsorbing block copolymers. *Chemistry & Biology*. 1998;5:177–183.
- [96] West JK, Latour R, Hench LL. Molecular modeling study of adsorption of poly-L-lysine onto silica glass. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1997;37:585–591.
- [97] Zhuravlev LT. Concentration of hydroxyl-groups on the surface of amorphous silicas. *Langmuir*. 1987;3:316–318.
- [98] Fisher JC. The fracture of liquids. *Journal of Applied Physics*. 1948;19:1062–1067.
- [99] Yoshida W, Castro RP, Jou JD, Cohen Y. Multilayer alkoxy silane silylation of oxide surfaces. *Langmuir*. 2001;17:5882–5888.
- [100] Porter MD, Bright TB, Allara DL, Chidsey CED. Spontaneously organized molecular assemblies .4. Structural characterization of normal-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared-spectroscopy, and electrochemistry. *Journal of the American Chemical Society*. 1987;109:3559–3568.
- [101] Guyotsonnest P, Superfine R, Hunt JH, Shen YR. Vibrational spectroscopy of a silane monolayer at air solid and liquid solid interfaces using sum-frequency generation. *Chemical Physics Letters*. 1988;144:1–5.
- [102] Song SY, Chu RQ, Zhou JF, Yang SG, Zhang JY. Formation and tribology study of amide-containing stratified self-assembled monolayers: Influences of the underlayer structure. *Journal of Physical Chemistry C*. 2008;112:3805–3810.
- [103] Wasserman SR, Whitesides GM, Tidswell IM, Ocko BM, Pershan PS, Axe JD. The structure of self-assembled monolayers of alkylsiloxanes on silicon – a comparison of results from ellipsometry and low-angle X-ray reflectivity. *Journal of the American Chemical Society*. 1989;111:5852–5861.
- [104] Maoz R, Sagiv J. On the formation and structure of self-assembling monolayers .1. A comparative ATR-wettability study of Langmuir-Blodgett and adsorbed films on flat substrates and glass microbeads. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1984;100:465–496.

- [105] Wirth MJ, Fatunmbi HO. Horizontal polymerization of mixed trifunctional silanes on silica – a potential chromatographic stationary phase. *Analytical Chemistry*. 1992;64:2783–2786.
- [106] Feng X, Matranga C, Vidic R, Borguet E. A vibrational spectroscopic study of the fate of oxygen-containing functional groups and trapped CO₂ in single-walled carbon nanotubes during thermal treatment. *Journal of Physical Chemistry B*. 2004;108:19949–19954.
- [107] Fomenko V, Gusev EP, Borguet E. Optical second harmonic generation studies of ultrathin high-*k* dielectric stacks. *Journal of Applied Physics*. 2005;97:083711.1–083711.8.
- [108] Owens DK, Wendt RC. Estimation of surface free energy of polymers. *Journal of Applied Polymer Science*. 1969;13:1741–1747.
- [109] Zisman WA. Contact angle, wettability and adhesion. *Advances in Chemistry Series*. 1964;43:1–51.
- [110] Rugar D, Hansma P. Atomic force microscopy. *Physics Today*. 1990;43:23–30.
- [111] Bodlaki D, Borguet E. In situ second-harmonic generation measurements of the stability of Si(111)-H and kinetics of oxide regrowth in ambient. *Journal of Applied Physics*. 2004;95:4675–4680.
- [112] Moroseac M, Skala T, Veltruska K, Matolin V, Matolinova I. XPS and SSIMS studies of Pd/SnOx system: Reduction and oxidation in hydrogen containing air. In: 22nd European Conference on Surface Science (ECOSS 22); Sep 7–12, 2003; Prague, Czech Republic. vol. 566 of *Surface Science*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.; 2004. pp. 1118–1123.
- [113] Shen YR. Sum-frequency generation. In: *The principles of nonlinear optics*. New York: Wiley Interscience; 1984. pp. 67–85.
- [114] Spiker RC, Levin IW. Raman-spectra and vibrational assignments for dipalmitoyl phosphatidylcholine and structurally related molecules. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1975;388:361–373.
- [115] Eftekhari-Bafrooei A, Borguet E. Effect of surface charge on the vibrational dynamics of interfacial water. *Journal of the American Chemical Society*. 2009;131:12034–12035.
- [116] Piron A. Génération de seconde harmonique aux interfaces liquide-liquide. Thèse: Chimie; École Polytechnique Fédérale de Lausanne; 2001. N° 2360.
- [117] Kabza K, Gestwicki JE, McGrath JL. Contact angle goniometry as a tool for surface tension measurements of solids, using Zisman plot method – a physical chemistry experiment. *Journal of Chemical Education*. 2000;77:63–65.
- [118] de Gennes PG. Wetting – statics and dynamics. *Reviews of Modern Physics*. 1985;57:827–863.
- [119] Chow TS. Wetting of rough surfaces. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 1998;10:L445–L451.
- [120] Zografi G, Tam SS. Wettability of pharmaceutical solids – estimates of solid-surface polarity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1976;65:1145–1149.
- [121] Young T. An essay on the cohesion of fluids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 1805;95:65–87.
- [122] Barankin MD, Gonzalez I Eleazar, Habib SB, Gao L, Guschl PC, Hicks RF. Hydrophobic films by atmospheric plasma curing of spun-on liquid precursors. *Langmuir*. 2009;25:2495–2500.
- [123] Shapiro B, Moon H, Garrell RL, Kim CJ. Equilibrium behavior of sessile drops under surface tension, applied external fields, and material variations. *Journal of Applied Physics*. 2003;93:5794–5811.
- [124] Bonn D, Eggers J, Indekeu J, Meunier J, Rolley E. Wetting and spreading. *Reviews of Modern Physics*. 2001;81:739–805.
- [125] Johnson RE, Dettre RH. *Surface and colloid science*. vol. 2. New York: Wiley Interscience; 1969.

- [126] Zisman WA. Influence of constitution on adhesion. *Industrial and Engineering Chemistry*. 1963;55:19–38.
- [127] Kwok DY, Li D, Neumann AW. Evaluation of the Lifshitz–van der Waals acid-base approach to determine interfacial-tensions. *Langmuir*. 1994;10:1323–1328.
- [128] Zisman WA. Constitutional effects on adhesion and abhesion. In: Weiss P, editor. *Adhesion and Cohesion*. New York: American Elsevier Publishing Co., Inc.; 1962. pp. 176–208.
- [129] Good RJ, Girifalco LA. A theory for estimation of surface and interfacial energies .3. Estimation of surface energies of solids from contact angle data. *Journal of Physical Chemistry*. 1960;64:561–565.
- [130] de Gennes PG, Brochard-Wyart F, Quéré D. Hystérésis et élasticité des lignes triples. In: *Gouttes, bulles, perles et ondes*. Paris: Belin; 2005. pp. 69–82.
- [131] Hansma PK, Elings VB, Marti O, Bracker CE. Scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy – application to biology and technology. *Science*. 1988;242:209–216.
- [132] Giessibl FJ. Atomic-resolution of the silicon (111)-(7×7) surface by atomic-force microscopy. *Science*. 1995;267:68–71.
- [133] Garcia R, Perez R. Dynamic atomic force microscopy methods. *Surface Science Reports*. 2002;47:197–301.
- [134] Lamour G, Eftekhari-Bafrooei A, Borguet E, Souès S, Hamraoui A. Neuronal adhesion and differentiation driven by nanoscale surface free-energy gradients. *Biomaterials*. 2010;31:3762–3771.
- [135] Parikh AN, Allara DL, Azouz IB, Rondelez F. An intrinsic relationship between molecular-structure in self-assembled N-alkylsiloxane monolayers and deposition temperature. *Journal of Physical Chemistry*. 1994;98:7577–7590.
- [136] Cassie ABD, Baxter S. Wettability of porous surfaces. *Transactions of the Faraday Society*. 1944;40:546–551.
- [137] Lamour G, Journiac N, Souès S, Bonneau S, Nassoy P, Hamraoui A. Influence of surface energy distribution on neuritogenesis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009;72:208–218.
- [138] Frey BL, Corn RM. Covalent attachment and derivatization of poly(L-lysine) monolayers on gold surfaces as characterized by polarization-modulation FT-IR spectroscopy. *Analytical Chemistry*. 1996;68:3187–3193.
- [139] Liu BF, Ma J, Xu QY, Cui FZ. Regulation of charged groups and laminin patterns for selective neuronal adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2006;53:175–178.
- [140] Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature Neuroscience*. 2003;6:43–50.
- [141] Cleveland DW, Monteiro MJ, Wong PC, Gill SR, Gearhart JD, Hoffman PN. Involvements of neurofilaments in the radial growth of axons. *Journal of Cell Science, Supplement*. 1991;15:85–95.
- [142] Lee MK, Cleveland DW. Neurofilament function and dysfunction – involvement in axonal growth and neuronal disease. *Current Opinion in Cell Biology*. 1994;6:34–40.
- [143] Chan WKH, Yabe JT, Pimenta AF, Ortiz D, Shea TB. Growth cones contain a dynamic population of neurofilament subunits. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 2003;54:195–207.
- [144] Helfand BT, Chang L, Goldman RD. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *Journal of Cell Science*. 2004;117:133–141.
- [145] Lin CH, Forscher P. Cytoskeletal remodeling during growth cone-target interactions. *Journal of Cell Biology*. 1993;121:1369–1383.
- [146] Dent EW, Gertler FB. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*. 2003;40:209–227.

- [147] Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1976;73:2424–2428.
- [148] Ryden M, Hempstead B, Ibanez CF. Differential modulation of neuron survival during development by nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:16322–16328.
- [149] Mischel PS, Umbach JA, Eskandari S, Smith SG, Gundersen CB, Zampighi GA. Nerve growth factor signals via preexisting TrkA receptor oligomers. *Biophysical Journal*. 2002;83:968–976.
- [150] Aizawa M, Koyama S, Kimura K, Haruyama T, Yanagida Y, Kobatake E. Electrically stimulated modulation of cellular function in proliferation, differentiation, and gene expression. *Electrochemistry*. 1999;67:118–125.
- [151] Drubin DG, Feinstein SC, Shooter EM, Kirschner MW. Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *Journal of Cell Biology*. 1985;101:1799–1807.
- [152] Wehrman T, He X, Raab B, Dukipatti A, Blau H, Garcia KC. Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron*. 2007;53:25–38.
- [153] Wujek JR, Akeson RA. Extracellular matrix derived from astrocytes stimulates neuritic outgrowth from PC12 cells in vitro. *Brain research*. 1987;431:87–97.
- [154] Fujii DK, Massaglia SL, Savion N, Gospodarowicz D. Neurite outgrowth and protein synthesis by PC12 cells as a function of substratum and nerve growth factor. *Journal of Neuroscience*. 1982;2:1157–1175.
- [155] Guo Y, Li M, Mylonakis A, Han J, MacDiarmid AG, Chen X, Lelkes PI, Wei Y. Electroactive oligoaniline-containing self-assembled monolayers for tissue engineering applications. *Biomacromolecules*. 2007;8:3025–3034.
- [156] Azoitei N, Wirth T, Baumann B. Activation of the IkappaB kinase complex is sufficient for neuronal differentiation of PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*. 2005;93:1487–1501.
- [157] Bush AB, Borden LA, Greene LA, Maxfield FR. Nerve growth-factor potentiates bradykinin-induced calcium influx and release in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*. 1991;57:562–574.
- [158] Jiang H, Takeda K, Lazarovici P, Katagiri Y, Yu ZX, Dickens G, Chabuk A, Liu XW, Ferrans V, Guroff G. Nerve growth factor (NGF)-induced calcium influx and intracellular calcium mobilization in 3T3 cells expressing NGF receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:26209–26216.
- [159] Yu JZ, Rasenick MM. Tau associates with actin in differentiating PC12 cells. *FASEB Journal*. 2006;20:1452–1461.
- [160] Cueille N, Blanc CT, Popa-Nita S, Kasas S, Catsicas S, Dietler G, Riederer BM. Characterization of MAP1B heavy chain interaction with actin. *Brain Research Bulletin*. 2007;71:610–618.
- [161] Kalil K, Dent EW. Touch and go: Guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton. *Current Opinion in Neurobiology*. 2005;15:521–526.
- [162] Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003;112:453–465.
- [163] Ishikawa R, Kohama K. Actin-binding proteins in nerve cell growth cones. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2007;105:6–11.
- [164] Nogales E, Wang HW. Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: How and why? *Current Opinion in Cell Biology*. 2006;18:179–184.
- [165] Gardner MK, Hunt AJ, Goodson HV, Odde DJ. Microtubule assembly dynamics: New insights at the nanoscale. *Current Opinion in Cell Biology*. 2008;20:64–70.

- [166] Kawauchi T, Hoshino M. Molecular pathways regulating cytoskeletal organization and morphological changes in migrating neurons. *Developmental Neuroscience*. 2008;30:36–46.
- [167] Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein Tau. *Molecular Biology of the Cell*. 1992;3:1141–1154.
- [168] Black MM, Slaughter T, Fischer I. Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is concentrated in the distal region of growing axons. *Journal of Neuroscience*. 1994;14:857–870.
- [169] Takemura R, Okabe S, Umeyama T, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. Increased microtubule stability and alpha-tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or Tau. *Journal of Cell Science*. 1992;103:953–964.
- [170] Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. Physical and chemical properties of purified Tau factor and the role of Tau in microtubule assembly. *Journal of Molecular Biology*. 1977;116:227–247.
- [171] Mandelkow E, Mandelkow EM. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology*. 1995;7:72–81.
- [172] Hameroff S, Penrose R. Orchestrated reduction of quantum coherence in brain microtubules: A model for consciousness. *Mathematics and Computers in Simulation*. 1996;40:453–480.
- [173] Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*. 2000;33:95–130.
- [174] Hopker VH, Shewan D, Tessier-Lavigne M, Poo M, Holt C. Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature*. 1999;401:69–73.
- [175] Ramón y Cajal SR. A quelle époque apparaissent les expansions des cellules nerveuses de la moëlle épinière du poulet ? *Anatomomischer Anzeiger*. 1890;5:609–613;631–639.
- [176] Mogilner A, Rubinstein B. The physics of filopodial protrusion. *Biophysical Journal*. 2005;89:782–795.
- [177] Laishram J, Kondra S, Avossa D, Migliorini E, Lazzarino M, Torre V. A morphological analysis of growth cones of DRG neurons combining atomic force and confocal microscopy. *Journal of Structural Biology*. 2009;168:366–377.
- [178] Bukoreshtliev NV, Wang X, Hodneland E, Gurke S, Barroso JFV, Gerdes HH. Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. *FEBS Letters*. 2009;583:1481–1488.
- [179] Bridgman PC, Dailey ME. The organization of myosin and actin in rapid frozen nerve growth cones. *Journal of Cell Biology*. 1989;108:95–109.
- [180] Letourneau PC. Differences in the organization of actin in the growth cones compared with the neurites of cultured neurons from chick-embryos. *Journal of Cell Biology*. 1983;97:963–973.
- [181] Cojoc D, Difato F, Ferrari E, Shahapure RB, Laishram J, Righi M, Di Fabrizio EM, Torre V. Properties of the force exerted by filopodia and lamellipodia and the involvement of cytoskeletal components. *PLoS One*. 2007;2:e1072.1–e1072.8.
- [182] Krause M, Dent EW, Bear JE, Loureiro JJ, Gertler FB. Ena/VASP proteins: Regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2003;19:541–564.
- [183] Kwiatkowski AV, Rubinson DA, Dent EW, van Veen JE, Leslie JD, Zhang JY, Mebane LM, Philippar U, Pinheiro EM, Burds AA, Bronson RT, Mori S, Fassler R, Gertler FB. Ena/VASP is required for neuritogenesis in the developing cortex. *Neuron*. 2007;56:441–455.
- [184] Wen ZX, Zheng JQ. Directional guidance of nerve growth cones. *Current Opinion in Neurobiology*. 2006;16:52–58.
- [185] Franze K, Gerdemann J, Weick M, Betz T, Pawlizak S, Lakadamyali M, Bayer J, Rillich K, Gögler M, Lu YB, Reichenbach A, Janmey P, Käs J. Neurite branch retraction is caused by a threshold-dependent mechanical impact. *Biophysical Journal*. 2009;97:1883–1890.

- [186] Ye T, Wynn D, Dudek R, Borguet E. Photoreactivity of alkylsiloxane self-assembled monolayers on silicon oxide surfaces. *Langmuir*. 2001;17:4497–4500.
- [187] Ye T, McArthur EA, Borguet E. Mechanism of UV photoreactivity of alkylsiloxane self-assembled monolayers. *Journal of Physical Chemistry B*. 2005;109:9927–9938.
- [188] Greene LA. Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. *Journal of Cell Biology*. 1978;78:747–755.
- [189] Ohnuma K, Hayashi Y, Furue M, Kaneko K, Asashima M. Serum-free culture conditions for serial subculture of undifferentiated PC12 cells. *Journal of Neuroscience Methods*. 2006;151:250–261.
- [190] Seo JY, Kim JS, Ghang JH, Kang TC, Suh JG, Kim EG, Kim JI, Kim J, Lee JY, Park JB. Nerve growth factor induces proliferation of PC12 cells through Cdc42. *Neuroreport*. 2003;14:1277–1281.
- [191] Marsh L, Letourneau PC. Growth of neurites without filopodial or lamellipodial activity in the presence of cytochalasin-B. *Journal of Cell Biology*. 1984;99:2041–2047.
- [192] Theodoropoulos PA, Gravanis A, Tsapara A, Margioris AN, Papadogiorgaki E, Galanopoulos V, Stournaras C. Cytochalasin-B may shorten actin-filaments by a mechanism independent of barbed-end capping. *Biochemical Pharmacology*. 1994;47:1875–1881.
- [193] Radler J, Sackmann E. Imaging optical thicknesses and separation distances of phospholipid-vesicles at solid-surfaces. *Journal de Physique II*. 1993;3:727–748.
- [194] Simson R, Wallraff E, Faix J, Niewohner J, Gerisch G, Sackmann E. Membrane bending modulus and adhesion energy of wild-type and mutant cells of *Dictyostelium* lacking talin or cortexillins. *Biophysical Journal*. 1998;74:514–522.
- [195] Seifert U, Lipowsky R. Adhesion of vesicles. *Physical Review A*. 1990;42:4768–4771.
- [196] McNally HA, Rajwa B, Sturgis J, Robinson JP. Comparative three-dimensional imaging of living neurons with confocal and atomic force microscopy. *Journal of Neuroscience Methods*. 2005;142:177–184.
- [197] Higgins D, Banker GA, Goslin K. Primary dissociated cell cultures. In: *Culturing nerve cells*. 2nd ed. Cambridge, MA: MIT Press; 1998. pp. 37–78.
- [198] Gordonweeks PR. Growth cones – the mechanism of neurite advance. *Bioessays*. 1991;13:235–239.
- [199] Aletta JM, Lewis SA, Cowan NJ, Greene LA. Nerve growth-factor regulates both the phosphorylation and steady-state levels of microtubule-associated protein 1.2 (MAP1.2). *Journal of Cell Biology*. 1988;106:1573–1581.
- [200] Tsao H, Aletta JM, Greene LA. Nerve growth-factor and fibroblast growth-factor selectively activate a protein-kinase that phosphorylates high-molecular-weight microtubule-associated-proteins – detection, partial-purification, and characterization in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265:15471–15480.
- [201] Challacombe JF, Snow DM, Letourneau PC. Actin filament bundles are required for microtubule reorientation during growth cone turning to avoid an inhibitory guidance cue. *Journal of Cell Science*. 1996;109:2031–2040.
- [202] Foley JD, Grunwald EW, Nealey PF, Murphy CJ. Cooperative modulation of neuritogenesis by PC12 cells by topography and nerve growth factor. *Biomaterials*. 2005;26:3639–3644.
- [203] Haq F, Anandan V, Keith C, Zhang G. Neurite development in PC12 cells cultured on nanopillars and nanopores with sizes comparable with filopodia. *International Journal of Nanomedicine*. 2007;2:107–115.
- [204] Lopez CA, Fleischman AJ, Roy S, Desai TA. Evaluation of silicon nanoporous membranes and ECM-based microenvironments on neurosecretory cells. *Biomaterials*. 2006;27:3075–3083.

- [205] Haynes CA, Norde W. Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1994;2:517–566.
- [206] Schaffner AE, Barker JL, Stenger DA, Hickman JJ. Investigation of the factors necessary for growth of hippocampal neurons in a defined system. *Journal of Neuroscience Methods*. 1995;62:111–119.
- [207] Bellion M, Santen L, Mantz H, Haehl H, Quinn A, Nagel A, Gilow C, Weitenberg C, Schmitt Y, Jacobs K. Protein adsorption on tailored substrates: Long-range forces and conformational changes. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2008;20:404226.1–404226.11.
- [208] Richert L, Lavalle P, Vautier D, Senger B, Stoltz JF, Schaaf P, Voegel JC, Picart C. Cell interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomacromolecules*. 2002;3:1170–1178.
- [209] Yeung KM, Lu ZJ, Cheung NH. Adsorption of bovine serum albumin on fused silica: elucidation of protein-protein interactions by single-molecule fluorescence microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009;69:246–250.
- [210] Baujard-Lamotte L, Noinville S, Goubard F, Marque P, Pauthe E. Kinetics of conformational changes of fibronectin adsorbed onto model surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2008;63:129–137.
- [211] Dent EW, Kwiatkowski AV, Mebane LM, Philippar U, Barzik M, Rubinson DA, Gupton S, van Veen JE, Furman C, Zhang JY, Alberts AS, Mori S, Gertler FB. Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nature Cell Biology*. 2007;9:1347–1359.
- [212] Cecchini M, Ferrari A, Beltram F. PC12 polarity on biopolymer nanogratings. In: *Proceedings of the 17th International Vacuum Congress/13th International Conference on Surface Science/International Conference on Nanoscience and Technology*; Jul 02–06, 2007; Stockholm, Sweden. vol. 100 of *Journal of Physics Conference Series*. Bristol: IOP Publishing Ltd; 2008. pp. 012003.1–012003.4.
- [213] Matta LL, Aranda-Espinoza H. Neuronal systems & modeling; strong adhesion identifies potential neurite extension and polarization sites in PC12 cells. *Biophysical Journal*. 2008;94:1055–1057.
- [214] Ryan PL, Foty RA, Kohn J, Steinberg MS. Tissue spreading on implantable substrates is a competitive outcome of cell-cell vs. cell-substratum adhesivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:4323–4327.
- [215] Challacombe JF, Snow DM, Letourneau PC. Dynamic microtubule ends are required for growth cone turning to avoid an inhibitory guidance cue. *Journal of Neuroscience*. 1997;17:3085–3095.
- [216] Graham BP, van Ooyen A. Mathematical modelling and numerical simulation of the morphological development of neurons. *BMC Neuroscience*. 2006;7:S9.1–S9.12.
- [217] Bray D. Model for membrane movements in neural growth cone. *Nature*. 1973;244:93–96.
- [218] Hentschel HGE, Fine A. Instabilities in cellular dendritic morphogenesis. *Physical Review Letters*. 1994;73:3592–3595.
- [219] Hentschel HGE, Fine A. Early dendritic and axonal morphogenesis. In: van Ooyen A, editor. *Modeling Neural Development*. Cambridge, MA: MIT Press; 2003. pp. 49–74.
- [220] Van Veen MP, van Pelt J. Neuritic growth-rate described by modeling microtubule dynamics. *Bulletin of Mathematical Biology*. 1994;56:249–273.
- [221] McLean DR, van Ooyen A, Graham BP. Continuum model for tubulin-driven neurite elongation. *Neurocomputing*. 2004;58:511–516.
- [222] Graham BP, Lauchlan K, McLean DR. Dynamics of outgrowth in a continuum model of neurite elongation. *Journal of Computational Neuroscience*. 2006;20:43–60.
- [223] Davenport RW, Dou P, Rehder V, Kater SB. A sensory role for neuronal growth cone filopodia. *Nature*. 1993;361:721–724.
- [224] Aletta JM, Greene LA. Growth cone configuration and advance – a time-lapse study using video-enhanced differential interference contrast microscopy. *Journal of Neuroscience*. 1988;8:1425–1435.

- [225] Withers GS, James CD, Kingman CE, Craighead HG, Banker GA. Effects of substrate geometry on growth cone behavior and axon branching. *Journal of Neurobiology*. 2006;66:1183–1194.
- [226] Takatsuki H, Sakanishi A. Regulation of neurite outgrowth by extracellular Ca^{2+} for neural cells PC12 and PC12D. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2003;32:69–76.
- [227] Veksler A, Gov NS. Calcium-actin waves and oscillations of cellular membranes. *Biophysical Journal*. 2009;97:1558–1568.
- [228] Aoki K, Nakamura T, Matsuda M. Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279:713–719.
- [229] Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. 1992;70:389–399.
- [230] Renaudin A, Lehmann M, Girault J, McKerracher L. Organization of point contacts in neuronal growth cones. *Journal of Neuroscience Research*. 1999;55:458–471.
- [231] Nobes CD, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *Journal of Cell Biology*. 1999;144:1235–1244.
- [232] Dent EW, Kalil K. Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. *Journal of Neuroscience*. 2001;21:9757–9769.
- [233] Iuchi S, Hoffner G, Verbeke P, Djian P, H G. Oligomeric and polymeric aggregates formed by proteins containing expanded polyglutamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100:2409–2414.
- [234] Bothwell MA, Schechter AL, Vaughn KM. Clonal variants of PC12 pheochromocytoma cells with altered response to nerve growth factor. *Cell*. 1980;21:857–866.
- [235] Hong JH, Noh KM, Yoo YE, Choi SY, Park SY, Kim YH, Chung JM. Iron promotes the survival and neurite extension of serum-starved PC12 cells in the presence of NGF by enhancing cell attachment. *Molecules and Cells*. 2003;15:10–19.
- [236] Ferrari A, Faraci P, Cecchini M, Beltram F. The effect of alternative neuronal differentiation pathways on PC12 cell adhesion and neurite alignment to nanogratings. *Biomaterials*. 2010;31:2565–2573.
- [237] Yavin Z, Yavin E. Survival and maturation of cerebral neurons on poly(L-lysine) surfaces in the absence of serum. *Developmental Biology*. 1980;75:454–459.
- [238] Kennedy TE, Tessier-Lavigne M. Guidance and induction of branch formation in developing axons by target-derived diffusible factors. *Current Opinion in Neurobiology*. 1995;5:83–90.
- [239] Mrksich M, Chen CS, Xia YN, Dike LE, Ingber DE, Whitesides GM. Controlling cell attachment on contoured surfaces with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93:10775–10778.
- [240] Kasemo B. Biocompatibility of titanium implants – surface science aspects. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 1983;49:832–837.
- [241] Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement – a materials science perspective. *Biomaterials*. 1998;19:1621–1639.
- [242] Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhone RR, Sastry M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir*. 2005;21:10644–10654.
- [243] Braun D, Fromherz P. Fluorescence interference-contrast microscopy of cell adhesion on oxidized silicon. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*. 1997;65:341–348.

Glossaire

Adhésion cellulaire

Processus conduisant une cellule à développer des interactions spécifiques ou non-spécifiques avec un substrat d'adhésion. L'adhésion cellulaire engage la membrane de la cellule, les récepteurs constitués de protéines transmembranaires, et le cortex d'actine sous-membranaire, lui-même lié à de nombreuses autres protéines.

Cellules PC12

Lignée cellulaire utilisée en qualité de modèle de cellules neuronales. Ces cellules, bien qu'extraite d'une tumeur de glande surrénale de rat, expriment des récepteurs du facteur de croissance nerveux (NGF). Cette faculté leur permet d'adopter un phénotype neuronal dès lors qu'elles sont traitées par une concentration adéquate de NGF. Elles constituent donc une lignée de cellules tout à fait adaptée à l'étude des mécanismes de différenciation neuronale.

Cône de croissance

Structure située à l'extrémité d'une neurite en phase d'extension (ou de rétraction). C'est principalement au niveau du cône de croissance que la neurite recueille les informations, en provenance du milieu extracellulaire environnant, qui vont lui permettre d'orienter sa croissance dans une direction spécifique. C'est aussi souvent à ce niveau que la neurite initie des branchements. Le cône de croissance est le siège de l'activité combinée de nombreuses protéines et de filaments, dont les microtubules et les microfilaments d'actine.

Cytosquelette

Ensemble responsable de la forme qu'adopte une cellule. Le cytosquelette est essentiellement composé de trois types de polymères : les filaments d'actine ($\varnothing \approx 8$ nm), que l'on nomme aussi « microfilaments », les microtubules ($\varnothing \approx 25$ nm) et les filaments intermédiaires ($\varnothing \approx 11$ nm). Les plus dynamiques sont les microfilaments d'actine et les microtubules.

Différenciation neuronale

Processus conduisant une cellule à adopter les caractères phénotypiques (et notamment, *morphologiques*) propres aux cellules neuronales. Cela se traduit par l'initiation de neurites excitables électriquement, qui vont plus tard aboutir à la formation d'un axone et de dendrites, lesquels seront en mesure d'établir des connexions (\leftrightarrow « synapses ») avec d'autres cellules.

Énergie de surface

Nature de l'interaction non-spécifique générée par toute surface à son voisinage. Dans notre étude, cette énergie se décline en une composante dispersive (apolaire) que l'on écrit γ^d et en une composante non-dispersive (polaire) que l'on note γ^p . Ces notions sont décrites au [chapitre 1](#) de ce document. Leur détermination s'effectue par des techniques de mouillage, déployant le modèle Owens-Wendt. L'énergie critique *empirique* de surface γ_c est quant à elle déterminée suite à la construction d'un Zisman plot (cf. [chapitre 3](#)).

Filopode

Assemblage particulier de microfilaments d'actine organisés en faisceaux, notamment par le biais de la fascine, qui s'intercale entre chaque microfilament. Les sous-unités d'actine s'associent aussi avec la profiline et la mDir/formine, impliquées dans la régulation de la polymérisation des microfilaments à l'extrémité des filopodes. Les filopodes ont une largeur généralement comprise entre 100 et 800 nm, et sont principalement émis à partir du cône de croissance (ce mémoire démontre que ce n'est cependant pas toujours le cas, tout comme pour les lamellipodes).

Lamellipode

Assemblage particulier de microfilaments d'actine organisés en réseaux. La fixation d'un complexe Arp2/3 le long d'un microfilament d'actine fournit un site de polymérisation à partir duquel un nouveau microfilament est susceptible d'être initié. Il en résulte l'établissement d'un réseau régulier composé de microfilaments qui s'entrecroisent. La souplesse des microfilaments permet à l'ensemble de présenter un caractère hautement dynamique. Ainsi, le lamellipode se projette par ondulation sur la surface, et fournit en coopération avec les filopodes des sites potentiels pour l'initiation de points focaux d'adhésion.

Monocouche auto-assemblée

Nom donné aux films moléculaires recouvrant une surface plane, telle qu'un substrat de verre propre. Les monocouches auto-assemblées les plus connues sont celles élaborées à partir d'alcanethiols sur de l'or, et celles élaborées à partir d'alkylsiloxanes sur du verre (cas de notre étude). Les sous-unités monomériques composant ces monocouches sont généralement assemblés en phase liquide, mais aussi parfois en phase gazeuse.

Nanostructure

Structure dont le niveau d'organisation se situe aux échelles nanométriques (i.e. 10^{-9} – 10^{-7} m). Dans ce mémoire, le terme est employé pour décrire l'agencement des groupes chimiques (CH_3 , NH_2 , ou OH) les uns par rapport aux autres au niveau de la surface des lamelles de verre. Cet agencement, spécifique à chaque classe de substrat, est responsable d'une distribution spécifique des énergies de surfaces, et d'une rugosité propre.

Neurite

Prolongement du soma d'une cellule neuronale. La neurite est le terme employé pour décrire les axones ou dendrites n'étant pas encore connectés à d'autres cellules (neurones ou autres). Elle est donc en phase de croissance (et parfois de rétraction) et possède à son extrémité une structure particulière : le cône de croissance.

Rugosité

Ensemble des irrégularités d'une surface. La rugosité se traduit sous la forme de deux paramètres : le rms (« root mean square »), indice physique de la taille des aspérités, et la topographie, indice morphologique de la manière dont sont éventuellement arrangées les aspérités. Le rms représente la racine carrée de la moyenne des carrés de toutes les valeurs de hauteurs (en \vec{z}) mesurées pour une surface donnée (en \vec{x} , \vec{y}).

Substrat d'adhésion

Surface sur laquelle une cellule est susceptible d'adhérer. Cette surface est, soit celle d'une membrane cellulaire provenant d'une autre cellule (cas général pour tous les systèmes étudiés *in vivo*), soit celle d'un substrat spécifiquement préparé, tel que les lamelles de verre modifiées que nous utilisons dans cette étude (*in vitro*).

Index

- A**
acide
acétique 41, 47, 50, 90
sulphurique 47
Alzheimer (maladie d') 117
- B**
boîtes de pétri
F-350001 48, 107, 125
T25 107, 123, 125, 141
- C**
Cassie–Baxter (relation de) 102
cellules
3T3 114
gliales
astrocytes 26, 112, 114, 182
oligodendrocytes 112, 182
PC12 1.1 171–174
cytochalasine-B 127, 167–171
cytosquelette
actine-F 112–134, 143, 154, 167–171
microtubules 115–121, 133, 141–160
neurofilaments 112, 116
- D**
de Gennes 32, 96
Debye 33
- E**
ELISA 165
- F**
filopodes 117–121, 130–135, 161–163
flux rétrograde d'actine-F 119, 121
- G**
Gomez 163
Good–Girifalco (équation de) 63
- H**
hétérogénéités chimiques 149, 152, 163, 164, 203
Hamaker (constante de) 34
- Harrison 25
hystérèse 60, 66
- I**
I κ B kinase 114
ImageJ 59–61
ions
calcium 27, 114, 117, 159, 163, 165, 182
potassium 35
sodium 35, 159
- K**
Keesom 33
Kulkarni 64
- L**
lamellipodes 117–121, 130–135, 163
Letourneau 25, 158
Lifshitz 33, 61
liquides tests
 α -bromonaphtalène 62, 82, 93–100
diiodométhane 60, 62, 82, 93–100
formamide 59–64, 93–100
glycérol 62, 64, 82
n-alcanes
dodécane 62, 82
hexadécane 47, 49, 59, 62, 82, 88
octane 62, 82
tétradécane 62, 82
undécane 62, 82
London 33
- M**
Malassez (cellule de) 125, 135
marqueurs neuronaux
MAP1B 113–117, 133, 141, 152–154
Tau 113–117, 133, 143, 171
microscopie
à contraste de phase 125, 139–141, 146,
150, 156, 173
à force atomique 64–65
en milieu ambiant 69, 85, 95, 102–107,
130, 161
en milieu liquide 130, 146
interférentielle/RICM 128, 143, 163

- modélisation 45, 102, 159
- molécules de signalisation
- nétrines 120
 - sémaphorines 120
- morphologie
- des cellules 118, 145, 152, 173
 - des surfaces 53, 102, 107, 141
- moteurs moléculaires
- dynéines 115
 - kynésines 115
- N**
- nanoplots d'or 175–180
- nanorugosité 56, 87–101, 141–151, 164, 173, 180–182, 203
- nanotubes 118
- NGF 113, 126, 137–143, 165
- récepteurs du NGF
 - p75 113
 - TrkA 113
- O**
- Owens–Wendt 62, 66, 88, 96, 99, 181
- P**
- palladium 158
- piranha 47, 48, 69, 176
- points focaux d'adhésion 27, 121, 163
- polarisation
- de la lumière 56, 73, 74
 - des cellules 152, 154
 - des membranes 35, 159
 - des microfilaments 114
- protéines
- de l'adhésion
 - cadhérines 37
 - collagène 114, 129, 130, 172
 - FAK+ 163
 - fibronectine 114, 147, 155
 - intégrines 37, 121, 163
 - laminine 114
 - paxiline 163
 - vinculine 121, 163 - liées à l'actine
 - Arp2/3 118
 - Cdc42 163
 - ENA/VASP 118
 - fascine 118
 - myosines II 119, 121 - protéines-G
 - Rac1 121, 163
 - RhoA 121, 163
- R**
- Ramón y Cajal 117
- revues
- Biomaterials 67, 203
 - Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 103, 137, 191
 - Journal of Chemical Education 57, 215
- Richert 147
- rigidité 25, 27, 45, 115, 121, 139
- S**
- solvants
- chloroforme 47, 59, 68
 - hexanes 47, 49, 68–72
 - méthanol 47–49, 59, 72–84, 90, 103, 124
- spectroscopies
- IRTF 53, 67–72, 105
 - SFG 54–56, 72–81
- Steinberg 152
- Stenger 105
- synapse 25, 111, 112
- système nerveux
- central 25, 26, 111
 - périphérique 25, 26, 112
- T**
- téflon 48, 57, 69
- Tillman 64
- titane 28, 175
- topographie 25, 64, 84, 101, 107, 117, 145, 147
- treadmilling 114
- V**
- van der Waals 32–34, 45, 50, 61, 64, 90
- W**
- West 45
- Y**
- Young
- module de 46
 - relation de 57
- Z**
- Zisman plot 63, 83–101, 181

RÉSUMÉ

Les paramètres de surface contrôlent les fonctions des cellules, en coopération avec leurs codes génétiques. Des études récentes soulignent l'impact combiné des signaux chimiques, topographiques et mécaniques des substrats d'adhésion sur les processus de différenciation. Cette étude se focalise sur le paramètre énergétique, et plus spécialement, sur l'influence exercée par la distribution spatiale des énergies de surface sur la différenciation des cellules neuronales. Le modèle étudié est constitué par les cellules de la lignée PC12, capables de se différencier en neurones suite au traitement par le facteur de croissance nerveux (NGF). Les cellules sont cultivées sur des surfaces de verre modifiées par auto-assemblage de monocouches d'alkylsiloxanes ou de biopolymères. La modification de la nature chimique et du degré d'organisation des monocouches module la distribution des composantes dispersives et polaires de l'énergie de surface, à une échelle inférieure au micron. Sur des substrats très homogènes (dotés de terminaisons CH_3 , NH_2 , ou OH), l'adhésion des cellules PC12 est modulée par le degré d'affinité chimique, et peu de cellules initient des neurites. Inversement, sur des substrats localement très hétérogènes, les cellules adhèrent quel que soit le couple chimique produisant les hétérogénéités (NH_2/OH ou CH_3/OH), et elles génèrent un nombre important de neurites en moins de 48 h, sans traitement au NGF. Ce travail démontre que les hétérogénéités chimiques de surface exercent une influence critique sur les processus de régénérescence des cellules nerveuses, en induisant des gradients dans les énergies d'adhésion aux échelles nanométriques.

ABSTRACT

Significant advances have been made in understanding surface adhesion parameters. Several studies recently demonstrated the combined impact of chemical, spatial and mechanical cues of cell culture substrates in controlling cell functions, together with the genetic program of the cell. This study focus on the substratum physical cue that is surface energy, and in particular, on the influence of surface-energy spatial distribution on neuronal cell differentiation. The cell model under consideration is constituted by clonal-line PC12 pheochromocytoma-cells. PC12 cells have the ability to undergo terminal neuronal differentiation, typically when treated with nerve growth factor (NGF). In this study, PC12 cells were seeded on glass surfaces modified by the self-assembly of alkylsiloxanes or of biopolymers such as poly-L-lysine. By changing the structure, ordering and chemical nature of the self-assembled monolayers, the spatial distribution of surface-energy polar and dispersive components is altered. When seeded on well-ordered homogeneous substrates (with CH_3 , NH_2 , or OH terminal groups), PC12 cell adhesion is driven by chemical affinity, and only a few cells initiate neurites. Conversely, PC12 cell adhesion is guaranteed when seeded on highly disordered substrates, whatever couple of chemical groups (CH_3/OH or NH_2/OH) generates the surface heterogeneities. In addition, high levels of PC12 cell neuritogenesis are observed by less than 48 h of culture, and without NGF treatment. This work demonstrates that surface chemical heterogeneities, that generate nanoscale surface-energy gradients, are critical to biological processes such as nerve regeneration on biomaterials.