

Université de Montréal

**L'influence d'une surface nanoporeuse de titane sur
l'activité de cellules ostéoblastiques**

par Dainelys Guadarrama Bello

Département de Stomatologie
Faculté de Médecine Dentaire

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maître en Sciences (M.Sc)
en Sciences Biomédicales-Option Médecine expérimentale

Avril, 2017

© Dainelys Guadarrama Bello, 2017

Résumé

Afin d'améliorer la performance et l'intégration des biomatériaux dans le tissu hôte, l'intérêt actuel est d'exploiter des approches de nanotechnologie pour produire des biomatériaux possédant des surfaces bioactives. Il est connu que l'interaction des cellules avec la surface des biomatériaux détermine la réponse du tissu hôte et le succès d'un implant. La topographie est l'un des principaux facteurs influençant l'activité fonctionnelle des cellules en contact avec des biomatériaux. Cependant, les mécanismes impliqués demeurent imprécis. Notre groupe a exploité un traitement chimique simple afin de créer des surfaces de titane nanoporeuses uniques qui expriment une influence cellulaire sélective, favorisant ainsi la formation osseuse *in vivo* et *in vitro*. Dans ce travail, nous avons réduit la durée du traitement afin d'obtenir une surface nanotopographique mono-planaire, puis évaluer l'influence d'une telle surface sur la formation par des cellules pré-ostéoblastiques MC3T3-E1 d'adhésions focales et de filopodes, ainsi que sur l'expression de gènes codant pour différentes protéines associées à l'adhésion et la signalisation cellulaire. Des disques de titane commercialement pur (cp-Ti) ont été traités avec un mélange d'acide sulfurique et de peroxyde d'hydrogène (50/50 v/v) pendant 1.5 heures. La caractérisation par microscopie électronique à balayage à haute résolution et pour microscopie à force atomique a confirmé la formation d'une surface effectivement mono-planaire caractérisée par des nanopores d'une taille moyenne de 20 ± 5 nm. Les cellules ont été mises en culture pour des périodes de 6, 24 et 72 heures sur des disques contrôles polis et avec une surface nanoporeuse. L'analyse de l'expression de la vinculine par immunofluorescence a révélé un plus grand nombre d'adhésions focales par les cellules sur la surface traitée. Le PCR quantitatif a également montré une augmentation significative de l'expression des gènes pour différents marqueurs d'adhésions focales, telles que paxilline, taline, et différentes intégrines comme par exemple les intégrines $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\alpha 5$. Par microscopie électronique à balayage, les cellules sur la surface nanoporeuse révèlent une présence plus importante de filopodes vis à vis des surfaces contrôles. Ces structures affichent de manière unique de très petites protrusions membranaires latérales d'entre 10-15 nm qui suivent les bords des nanopores. L'augmentation des adhésions focales, l'abondance des filopodes et de leurs petites protrusions pourraient engendrer interaction accrue avec la surface et modifier les relations biomécaniques à l'échelle nanométrique pour déclencher des cascade régulant la prolifération cellulaire.

Mots-clés : nanotopographie, filopodes, adhésions focales, expression des gènes.

Abstract

To improve the performance and integration of biomaterials in the host tissue, the focus is presently on exploiting nanotechnology approaches to produce biomaterials with bioactive surfaces. It is known that the cell-biomaterial interactions determine the response of the host tissue and therefore the success of implants. Topography is a key factor that influences the functional activity of cells; however, the mechanisms implicated remain unclear. Our group has exploited a simple chemical treatment to create unique nanoporous titanium surfaces that selectively influence cell behaviour and favor osteogenic activity both *in vitro* and *in vivo*. In this work, we have reduced treatment time in order to obtain a monoplanar nanostructured surface, and we have evaluated its influence on the formation of focal adhesions, filopodia, and on gene expression for different cell adhesion and signaling proteins by MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. Commercially pure titanium (cp-Ti) was treated with a mixture of H₂SO₄/H₂O₂ (50/50 v/v) for 1.5h. Characterization by high-resolution field-emission scanning electron microscopy and atomic force microscopy characterization showed the formation of a nanoporous surface with a mean pore diameter of 20 ± 5 nm. Cells were cultured and plated on polished (control) and nanotextured discs for periods of 6, 24 and 72 hours. Immunofluorescence analysis of vinculin expression revealed the formation of more focal adhesions by cells seeded on nanostructured surfaces. Quantitative PCR likewise showed significant increase of gene expression for various focal adhesion markers, including paxillin, talin, and different integrins such as integrin $\alpha 1$, $\beta 1$ and $\alpha 5$. As compared to controls, scanning electron microscopy of cells on the treated surface revealed the presence of more filopodia. These uniquely displayed very small lateral membrane protrusions between 10-15 nm that appeared to follow the walls of the nanopores. Together with the increase in focal adhesions, the abundance of filopodia and associated protrusions could contribute to the adhesive interaction with the surface and modify the nanoscale biomechanical relationships to trigger cellular cascades regulating cell proliferation.

Keywords: nanotopography, filopodia, focal adhesions, gene expression.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des sigles et des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xi
Chapitre I – Introduction.....	1
Chapitre 2 – État des connaissances et mise en contexte.....	2
2.1 Ostéointégration.....	2
2.2 Titane.....	2
2.3 Méthodes de modification de la surface du titane au niveau nanométrique.....	4
2.4 Méthodes d'analyses superficielles et l'interaction cellule/surface.....	7
2.4.1 Microscopie électronique à balayage.....	7
2.4.2 Microscopie à force atomique.....	9
2.4.3 Microscopie de fluorescence.....	10
2.4.4 RT-PCR.....	11
2.5 Comportement cellulaire sur des surfaces de titane modifiées.....	12
2.5.1 Morphologie de la cellule.....	12
2.5.2 Adhésions focales.....	14
2.5.3 Expression génique.....	15
2.6 Objectif.....	16
Chapitre 3 – Article: A controlled nanoporous surface promotes the maturation of focal adhesions and the formation of filopodia with distinctive nanoscale protrusions.....	17
3.1 – Abstract.....	18
3.2 – Introduction.....	19
3.3 – Materials and Methods.....	21
3.3.1 – Surface Modification.....	21
3.3.2 – Surface Characterization.....	21
3.3.3 – Cell Culture.....	21

3.3.4 – Cell Morphology and Cell Spreading (Scanning Electron Microscopy)	22
3.3.5 – Immunofluorescence Visualization of Focal Contacts and Cell Attachment	22
3.3.6 – Image Analysis.....	23
3.3.7 – Gene Expression	23
3.4 – Results.....	25
3.4.1 – Characterization of Substrate Topography	25
3.4.2 – Cell Number.....	28
3.4.3 – Immunofluorescence Microscopy.....	28
3.4.4 – Cell Morphology and Cell Adhesion	31
3.4.5 – Gene Expression	33
3.5 Discussion.....	35
3.6 Conclusion	39
3.7 References.....	40
3.8 Mesures de Force d’Adhésion. Résultats Préliminaires	46
Chapitre 4 – Conclusions et perspectives	48
Bibliographie.....	51
Annexes.....	i

Liste des tableaux

Tableau I. Classification du Cp-Ti selon la composition (% en poids).	3
Tableau II. Les propriétés mécaniques des différents grades du Cp-Ti.	4
Tableau III. Méthodes de modification de la surface de titane au niveau nanométrique.....	5
Tableau IV. Oligonucleotide Primer Sequences for Real-Time PCR.	25

Liste des figures

Figure 1. Morphologie de la surface du titane après l'application des différents traitements chimiques : A) Décapage à l'acide, B) Traitement avec H ₂ O ₂ et C) Traitement alcalin.	6
Figure 2. Schéma du microscope électronique à balayage.	8
Figure 3. Schéma du microscope à force atomique.	9
Figure 4. Étapes du protocole d'immunomarquage.	10
Figure 5. Schéma des filopodes et lamellipodes développés par la cellule pendant le sondage de l'environnement superficiel.	13
Figure 6. Différentes étapes dans la formation des adhésions focales (A) et organisation des protéines dans les adhésions focales (B).	14
Figure 7. SEM images of the titanium surface after (A) mechanical polishing and (B, inset) treatment with H ₂ SO ₄ /H ₂ O ₂ for 1.5 h. (C) shows the size distribution of the nanopores. N.B. Figure 1 of the article.	26
Figure 8. AFM 3D topographies of polished (A) and chemically treated (C) surfaces. Corresponding line sections: (B) and (D). N.B. Figure 2 of the article.	27
Figure 9. Cell count by immunofluorescence microscopy after 6, 24, and 72 h of cells grown on the control and nanoporous surfaces. N.B. Figure 3 of the article.	28
Figure 10. Fluorescence micrographs of MC3T3-E1 cells on control and nanoporous surfaces successively cultured for 6, 24, and 72 h. Stained with DAPI (blue) for nuclei, rhodamine/phalloidin (red) for actin, and anti-vinculin (green) for vinculin. Although cell adhesions were found on both surfaces, they were more abundant on the nanoporous surface. Scale bar = 10 μm. N.B. Figure 4 of the article.	29
Figure 11. (A) Example of the focal adhesion maps generated using Image J based on vinculin immunofluorescence of MC3T3-E1 cells after 6, 24 and 72 h of culture on control and nanoporous surfaces. (B) Quantitative evaluation of the focal complexes. (C) Measurements of the cell area. (D) Percentage of the cell area surface occupied by the focal adhesions; vinculin area/cell area was significantly higher on the nanoporous surfaces. Error bars	

represent standard deviation; * statistical significant difference $p < 0.05$. N.B. Figure 5 of the article.....30

Figure 12. Length distribution of (A) focal complexes (FXs) and focal adhesions (FAs), and (B) fibrillar adhesions (FBs) formed by MC3T3-E1 cultured for 24 h on control and nanoporous surfaces. FAs in a range of 1-3 μm were more abundant on the control surface, while those $> 3 \mu\text{m}$ and FBs were more numerous on the nanoporous surface. N.B. Figure 6 of the article.....31

Figure 13. SEM micrographs of MC3T3-E1 cells (A, C) on control and (B, D) nanoporous surfaces grown for (A, B) 24 and (C, D) 72 h. Filopodia are indicated with arrows. N.B. Figure 7 of the article..... 32

Figure 14. Helium ion electron microscopy (HIM) images of MC3T3-E1 grown for 72 h on a nanoporous surface showing the presence of nanoscale protrusions (arrows) emanating from (A) the cell body and (B) form a filopodium. N.B. Figure 8 of the article..... 33

Figure 15. Comparative gene expression profile of (A) focal adhesion markers, (B) integrins, and (C) Rho family GTPases by MC3T3-E1 cells cultured on control and nanoporous surfaces. Error bars represent standard deviation; * statistical significant difference $p < 0.05$. N.B. Figure 9 of the article. 34

Figure 16. Images AFM des filopodes sur la surface polie (A et B) et la surface nanoporeuse (C et D) scannée avec une déflexion de la pointe de 6V (A et C) et avec une déflexion de 8V (B et D). Dans la figure B, le cercle représente le déplacement du filopode..... 47

Figure 17. Représentation de la technique utilisée pour les mesures des forces. A, B et C représentent l’augmentation de la déflexion de la pointe AFM..... i

Liste des sigles et des abréviations

ACTN1 : *Alpha-actinin*

AFM : Microscopie à force atomique

ATCC : *American Type Culture Collection*

Cdc42 : *Cell division control protein 42 homolog*

cDNA : *Complementary deoxyribonucleic acid*

Cp-Ti : Titane commercialement pur

DAPI : 4',6-Diamidino-2-phénylindole

FAK : *Focal adhesion kinase*

FAs : *Focal adhesions*

FBs : *Fibrillar adhesions*

FXs : *Focal complexes*

GAPDH : *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

HA : Hydroxyapatite

hFOB : *Human fetal osteoblast*

HIM : *Helium ion electron microscopy*

hMSCs : *Human mesenchymal stem cells*

HR-FESEM : Microscopie électronique à balayage à haute résolution

ITG α 1 : *Integrin α 1*

ITG β 1 : *Integrin β 1*

ITG α 5 : *Integrin α 5*

ITG α V : *Integrin α V*

M : Molaire

MC3T3-E1 : Cellules ostéogéniques de souris

PB : Tampon de phosphate

PDMS : *Polydimethylsiloxane*

PTEN : *Phosphatase and tensin homolog*

Pxn : *Paxillin*

Ra : *Roughness Average*

Rac1 : *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*

RNA : Acide ribonucléique

ROCK1 : Rho associated coiled-coil containing protein Kinase 1

RhoA : Ras homolog family member A

RT : Température ambiante

Rq : *Root-mean-square*

RT-PCR : Réaction en chaîne par polymérase en temps réel

SEM : Microscopie électronique à balayage

TCPS : *Tissue culture polystyrene*

Tln : *Talin*

UV : Rayonnement ultraviolet

Vcl : *Vinculin*

À ma famille

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier mon directeur de recherche, le professeur Antonio Nanci, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ma recherche dans son groupe et d'avoir été le promoteur de ce travail, pour son intérêt, ses bons conseils, ainsi que pour sa patience et disponibilité. Je voudrais remercier par la suite ma codirectrice de recherche, la professeure Antonella Badia, pour ses multiples conseils. Sans votre aide, la réalisation de ce projet n'aurait jamais eu lieu.

Mes remerciements vont également à mes amis et collègues du groupe, avec qui j'ai partagé des moments inoubliables. Aurélien, Katia, Sandra, Dominick, Doaa, Ana, Renan, Giovanna et Luiz, un gros merci pour être comme une famille pour moi. Sans votre aide, je n'aurais jamais pu réaliser ce mémoire.

La réalisation d'un tel projet ne peut se faire sans l'appui des gens qu'on aime. Un grand merci à toute ma famille, qui m'a fortement encouragé tout le long de mes études, spécialement mon mari Adrian pour son soutien au fils des ans. Merci mon po.

Je remercie également tout le personnel de soutien de l'Université de Montréal, spécialement Patricia Moraille, pour son expertise et ses bonnes suggestions toujours très utiles.

Je voudrais remercier les membres de mon jury, Dr. James D. Wuest et Dr. Stéphane Roy, d'avoir gentiment accepté d'évaluer mon mémoire.

Finalement, je voudrais remercier le Réseau de Recherche en Santé Buccodentaire et Osseuse (RSBO) et la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal pour leur contribution financière.

Chapitre I – Introduction

Malgré les nombreux travaux s'intéressant aux interactions cellules-topographies (1-5), la communauté scientifique n'a pas encore pu déterminer avec certitude quelles caractéristiques topographiques permettent le déclenchement de fonctions cellulaires spécifiques. Dans cette étude, nous avons choisi d'aborder ce problème en utilisant des surfaces de titane modifiées à l'échelle nanométrique dont les caractéristiques pourraient intervenir sur les mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse aux matériaux. Le titane est un métal très largement utilisé en orthopédie et en médecine dentaire pour la fabrication d'implants osseux.

Ainsi, la recherche actuelle dans le domaine des biomatériaux est dirigée sur les diverses stratégies pour l'obtention de surfaces capables de promouvoir l'adhésion cellulaire. Dans le but d'améliorer l'ostéointégration, un grand nombre de solutions ont été proposées tel que le traitement chimique, communément utilisé pour augmenter l'épaisseur de la couche d'oxyde de titane. Il a été démontré que les interactions des cellules avec la surface des biomatériaux peuvent réguler l'activité cellulaire et déterminer l'intégration de ceux-ci dans le corps. Notre laboratoire a développé une méthode de modification physico-chimique de la surface des métaux à intérêt médical (6, 7). Cette méthode crée des surfaces nanoporeuses qui affectent le comportement cellulaire de façon différentielle et promeuvent la formation osseuse. Nous avons également été les premiers à démontrer que ces surfaces nanostructurées favorisent la formation de nombreux filopodes, qui vont eux-mêmes émettre de petites structures de taille nanométrique (6). Nous croyons que la force d'attachement de ces structures aux surfaces nanotexturisées engendre une cascade de signalisation biomécanique qui module le comportement cellulaire. Une compréhension poussée de l'interaction de la cellule à l'implant est nécessaire pour mieux contrôler le processus d'ostéointégration, ce qui permettra d'adapter intentionnellement les surfaces de l'implant en fonction des patients. Étant donné que l'adhésion cellulaire est un facteur très important dans les premières étapes du processus d'ostéointégration, nos résultats contribueront de manière significative à la connaissance sur ce sujet, ce qui permettra d'améliorer le succès des implants, surtout dans des conditions où l'état osseux du patient est compromis.

Chapitre 2 – État des connaissances et mise en contexte

2.1 Ostéointégration

Initialement, le concept d'ostéointégration a été défini comme une connexion structurale et fonctionnelle entre l'os vivant et la surface d'un implant (8). Cette idée a évolué, désormais un implant est considéré comme ostéointégré lorsqu'un contact direct est présente entre l'implant et l'os sans la présence de mouvements progressifs entre eux (9). En pratique, cela signifie que l'ostéointégration est un mécanisme d'ancrage pour fixer de manière fiable et prévisible des composants dans l'os vivant et que celui-ci doit être capable de persister dans toutes les conditions normales de chargement sans nécessairement y avoir des connexions (10).

De manière générale, lors de la mise en place d'un implant dans l'os, une série de processus biologiques mène à une intégration forte de l'implant. Au début, il y a une étape de saignement durant laquelle les leucocytes vont déclencher une réponse immunitaire, alors que les plaquettes vont favoriser la coagulation résultant en la formation d'un caillot. Ce dernier va être progressivement dégradé afin de permettre la colonisation des cellules chargées de former le nouvel os. Finalement, les cellules ostéoprogénitrices vont migrer vers la surface de l'implant pour y former du nouvel os qui sera par la suite remodelé (11).

Certains facteurs peuvent affecter le processus d'ostéointégration et le succès d'un implant, tel que la nature de l'implant, la qualité osseuse, l'âge et l'état de santé du patient. Les caractéristiques les plus importantes associées à l'implant sont la géométrie, la composition chimique, la forme et la topographie de la surface. Les traitements superficiels pour accroître la bioactivité de l'implant sont aussi très importants. Établir une bonne stabilité primaire de l'implant lors de son placement dans un environnement aseptique pour éviter des infections, est un des facteurs clés pour la réussite du processus d'ostéointégration (12).

2.2 Titane

Le titane et ses alliages sont très utilisés dans le domaine biomédical et constituent avec les aciers inoxydables et les alliages de cobalt-chrome l'une des grandes familles de

métaux choisis pour la fabrication d'implants dentaires, orthopédiques et cardiovasculaires (13-16). Les facteurs qui font du titane un des matériaux choisis pour la fabrication d'implants sont son excellente biocompatibilité, ses propriétés mécaniques appropriées et sa grande résistance à la corrosion (17, 18). Le titane forme une couche mince et amorphe d'oxyde d'environ 5 nm instantanément au contact avec l'air, l'humidité ou les fluides physiologiques. Cette couche d'oxyde augmente la stabilité chimique du titane en empêchant la libération d'ions métalliques, assurant ainsi la biocompatibilité du métal à l'intérieur du corps humain. Le titane est également caractérisé par son module d'élasticité et une basse densité semblables aux caractéristiques mécaniques de l'os (19, 20).

Les normes internationales définissent quatre grades de titane commercialement pur (Cp-Ti) pour des applications biomédicales. Les différents grades sont classés en fonction de la quantité d'éléments interstitiels minoritaires contenus dans l'alliage en question (Tableau I) (15, 21).

Tableau I. Classification du Cp-Ti selon la composition (% en poids).

Élément	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
Azote max.	0,03	0,03	0,05	0,05
Carbone max.	0,1	0,1	0,1	0,1
Hydrogène max.	0,0125	0,0125	0,0125	0,0125
Fer max.	0,2	0,30	0,30	0,5
Oxygène max.	0,18	0,25	0,35	0,4
Titane	99,5	99,3	99,2	98,9

Ainsi, plus la teneur en éléments interstitiels est élevée, plus le grade du Cp-Ti augmente (de I à IV), résultant en une augmentation de la résistance mécanique et une diminution de la ductilité (Tableau II) (15, 21).

Tableau II. Les propriétés mécaniques des différents grades du Cp-Ti.

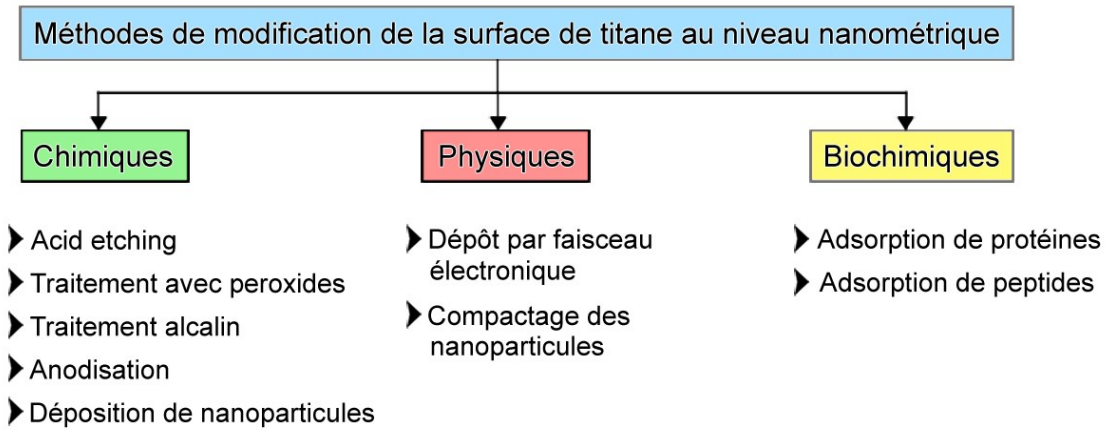
Grade	Résistance à la traction (MPa)	Limite élastique au 0,2 % (MPa)	Allongement à la rupture (%)
I	240	170	24
II	345	275	20
III	450	380	18
IV	550	483	15

2.3 Méthodes de modification de la surface du titane au niveau nanométrique

Malgré les excellents attributs du titane pour la fabrication d'implants, ceux-ci ne sont pas suffisants à assurer le succès d'un implant puisque le titane n'est pas bioactif, une propriété influençant grandement le succès de l'implant. Les surfaces bioactives favorisent l'adhésion des ostéoblastes, la formation de tissu osseux par ces dernières, résultant en meilleure ostéointégration (22). Il a été démontré que la topographie de la surface à l'échelle nanométrique a la capacité d'influencer sélectivement le comportement des cellules en contact avec les biomatériaux (1, 4, 5). Les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire se produisent à travers des intégrines, qui se regroupent conduisant au recrutement des protéines nécessaires à la formation des adhésions focales (5). La recherche actuelle s'est ainsi orientée sur les diverses stratégies à l'obtention de surfaces nanostructurées capables de promouvoir l'adhésion cellulaire et d'activer les voies de signalisation intracellulaires impactant sur le devenir de la cellule.

Les matériaux nanométriques exhibent des caractéristiques de surface à l'échelle nanométrique (1-100 nm) ou sont composés de sous-unités de taille nanométrique (23). Plusieurs méthodes ont été utilisées pour générer des surfaces nanotopographiques sur le titane afin d'évaluer les effets sur le comportement des cellules (Tableau III).

Tableau III. Méthodes de modification de la surface de titane au niveau nanométrique.



Parmi les méthodes les plus utilisées pour doter la surface de titane de caractéristiques nanométriques, on retrouve des approches chimiques, physiques et biochimiques (23). Les méthodes biochimiques utilisent des biomolécules pour inciter les réponses cellule/tissu. Ces approches sont reliées à l'adsorption, la rétention et la libération de biomolécules. Des surfaces modifiées biochimiquement à partir de biomolécules telles que des peptides immobilisés en surface, des protéines et des facteurs de croissance induisent des réponses cellule/tissu spécifiques. Cependant, les méthodes biochimiques ont des inconvénients liés au processus de liaison des produits bioactifs. Par exemple, il est nécessaire de faire une fonctionnalisation de la surface du titane par silanisation afin d'assurer l'attachement des biomolécules, ce qui accroît la complexité de la technique (24). De plus, le coût de départ des réactifs est très onéreux, ce qui ajoute au coût déjà très élevé des implants.

Les méthodes physiques telles que le dépôt par faisceau électronique en phase vapeur et le compactage de nanoparticules ont aussi été utilisées pour modifier la surface du titane à l'échelle nanométrique. Cependant, l'application de ces techniques nécessite des équipements spéciaux compliquant leurs accessibilités et leur exploitation commerciales.

Ainsi, les méthodes chimiques demeurent les plus simples et abordables en comparaison des méthodes décrites préalablement. Ces dernières modifient la surface du titane par des réactions chimiques, généralement d'oxydation, en provoquant une augmentation de la rugosité ainsi que la formation des produits plus bioactifs. Les traitements peuvent être réalisés

de manière rapide et, dans la plupart des cas, ne nécessitent pas d'équipements spéciaux. En outre, le prix des réactifs utilisés est avantageux. Les méthodes chimiques les plus courantes sont le décapage à l'acide (*acid etching*), l'oxydation par peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le traitement alcalin par hydroxyde de sodium (NaOH) ainsi que l'électrodéposition (anodisation) (25-28).

Le décapage à l'acide est largement utilisé pour l'élimination des oxydes natifs et d'autres contaminants présents à la surface du titane. Ce traitement implique généralement des mélanges binaires d'acides, notamment l'acide nitrique (HNO_3), l'acide sulfurique (H_2SO_4), l'acide fluorhydrique (HF) ou de l'acide chlorhydrique (HCl). L'attaque par acide modifie la topographie de la surface au niveau micrométrique en provoquant en même temps la formation d'une nouvelle couche mince d'oxyde, qui a une épaisseur d'environ 10 nm. Cette couche est composée principalement de TiO_2 amorphe (Figure 1A) (25, 26, 29).

Le traitement avec H_2O_2 permet d'oxyder la surface du titane, en provoquant la formation d'une couche mince, poreuse et amorphe composée principalement d'un mélange de peroxy complexes de titane. Cette structure amorphe se cristallise en phase anatase du dioxyde de titane lorsqu'elle est chauffée à des températures supérieures à $300\text{ }^\circ\text{C}$, ce qui permet d'obtenir une surface hautement bioactive (Figure 1B) (30). Le traitement avec de l'hydroxyde de sodium permet une surface nanostructurée constituée d'un mélange de dioxyde de titane (généralement le rutile) et du titanate de sodium (Figure 1C). Dans ce traitement on utilise des solutions concentrées de NaOH entre 5 et 10 M à une température de $60\text{ }^\circ\text{C}$, pendant 24 heures (27, 31).

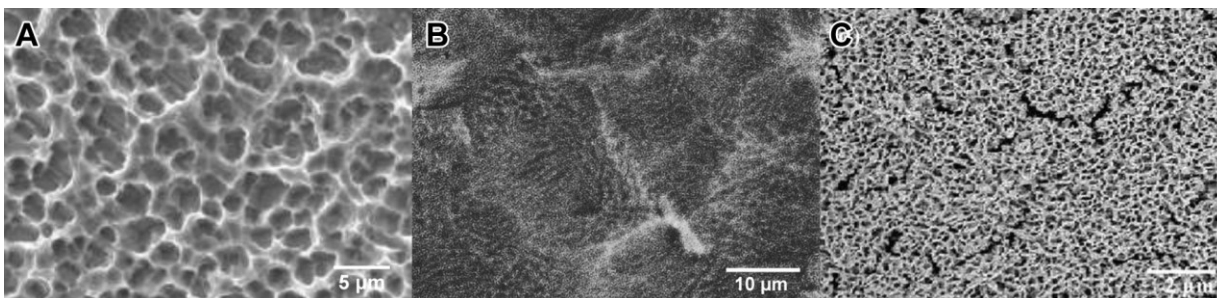


Figure 1. Morphologie de la surface du titane après l'application des différents traitements chimiques : A) Décapage à l'acide, B) Traitement avec H_2O_2 et C) Traitement alcalin.

2.4 Méthodes d'analyses superficielles et l'interaction cellule/surface

2.4.1 Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (*SEM*, sigle en anglais) est une technique couramment utilisée pour caractériser la topographie et la structure des matériaux. Cette technique permet d'analyser la surface de matériaux solides tels que des semi-conducteurs, métaux, céramiques, polymères ainsi que des matériaux nanostructurés grâce à sa haute résolution qui est de l'ordre 1-3 nm dans le cas d'un appareil avec canon à effet de champs. Le fonctionnement du microscope est basé sur l'émission d'électrons produits par une cathode et la détection de signaux provenant de l'interaction de ces électrons avec l'échantillon. Le microscope électronique utilise un faisceau d'électrons primaires qui passe à travers d'une colonne soumise à haut vide. Dans cette colonne, le faisceau initial est concentré par une série de lentilles électromagnétiques. Le faisceau d'électrons balaye la surface de l'échantillon grâce au système de bobines de balayage, en provoquant la formation d'électrons secondaires de basse énergie, d'électrons retrodispersés ainsi que de rayons X caractéristiques. (Figure 2) (32).

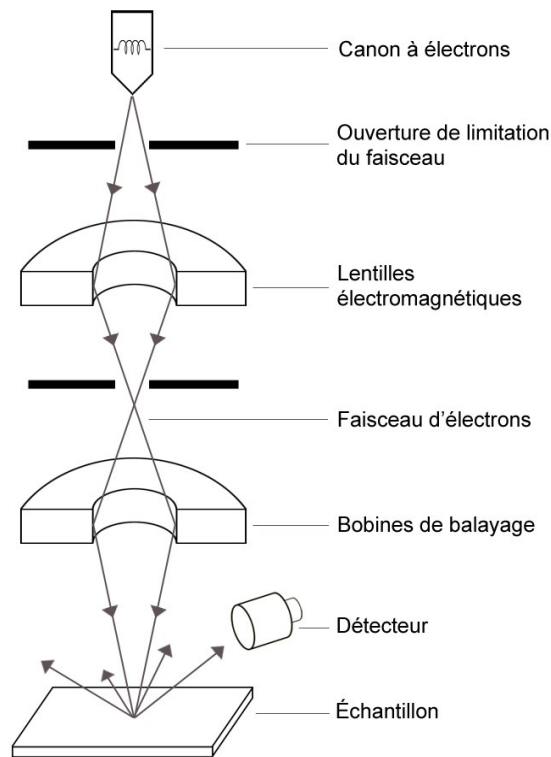


Figure 2. Schéma du microscope électronique à balayage.

Les électrons secondaires sont accélérés vers un détecteur qui va amplifier le signal. Ce signal numérique est interprété comme intensité de la couleur afin de former l'image finale. Ainsi, les régions qui génèrent la plus grande quantité d'électrons secondaires aura une couleur plus brillant et celles avec moins des électrons secondaires seront plus foncées.

Cet appareil d'analyse peut fournir rapidement des informations sur la morphologie et la composition chimique d'un substrat solide. Plus récemment, des microscopes qui utilisent les ions d'hélium au lieu des électrons (*HIM*, sigle en anglais) ont été utilisées afin d'améliorer encore plus le contraste et la résolution des images. Dans cette étude, ces deux techniques nous permettront de connaître les caractéristiques superficielles des disques de titane utilisés comme contrôle et après le traitement chimique. De plus, elles nous permettront de faire la caractérisation morphologique des cellules cultivées sur les deux surfaces en étude.

2.4.2 Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (*AFM*, sigle en anglais) est une des techniques privilégiées pour l'étude des matériaux à l'échelle nanométrique, offrant un contraste et une quantification topographique plus intéressante que les images obtenues par SEM. Cette technique, qui fait partie des microscopies à sonde locale, est basée sur l'interaction d'une pointe fine avec la surface du matériau à analyser.

Le microscope à force atomique (schéma Figure 3) utilise un cantilever muni d'une pointe très fine, généralement fabriquée en silicium ou nitrure de silicium. Au même temps que la pointe explore la surface, un laser focalisé sur le cantilever et réfléchi sur des photodiodes registre la variation d'hauteur de la pointe. L'intensité (réponse) des interactions entre la pointe et la surface permet d'obtenir de l'information sur la topographie, ainsi que les propriétés mécaniques et physicochimiques de la surface. Les mesures sont principalement obtenues en mode contact, *tapping* ou non contact. Grâce aux caractéristiques de la pointe, il est possible d'obtenir une haute résolution à l'échelle nanométrique (d'environ 0.1 nm) (33, 34).

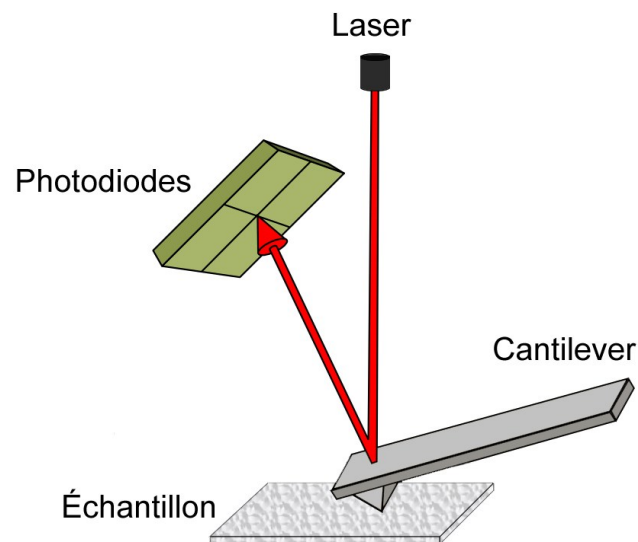


Figure 3. Schéma du microscope à force atomique.

La microscopie à force atomique a été également utilisée dans le domaine biomédicale pour faire des mesures de force d'adhésion entre des cellules et des différents substrats (35).

Dans ce cas, la pointe est utilisée pour déplacer des structures cellulaires et, en mesurant la force latérale, il est possible de déterminer la force d'adhésion cellulaire.

Au cours de ce travail, nous allons utiliser cette technique afin d'apporter des informations complémentaires à celles du SEM sur les caractéristiques de surfaces de titane polis/ou modifiées chimiquement. L'AFM est un outil qui n'a jamais été utilisé auparavant pour mesurer la force d'interaction des filopodes et des petites protrusions développées par la cellule sur des surfaces de ce type (Technique utilisée pour les mesures préliminaires de force d'adhésion dans l'Annexe 1). Étant donné que la détermination des mesures de force par AFM est très complexe, puisqu'il faut séparer la contribution de la surface de celle de la cellule, nous chercherons à obtenir des surfaces nanoporeuses avec une rugosité minimale. Afin d'accomplir ceci, nous allons exploiter l'influence du temps de traitement et/ou de la concentration des solutions.

2.4.3 Microscopie de fluorescence

L'immunofluorescence est une technique qui permet la visualisation intra- et extra cellulaire de sites antigéniques à l'aide de fluorochromes. Pour appliquer cette technique, il faut suivre un protocole de six étapes principales résumées dans la Figure 4.

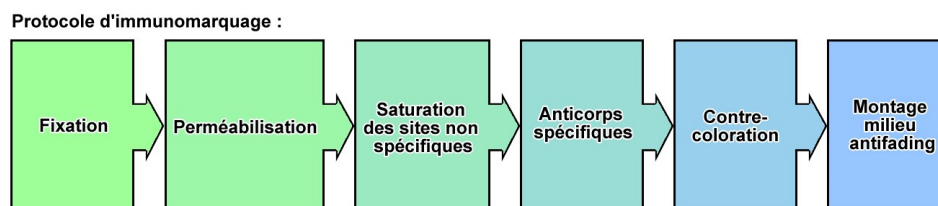


Figure 4. Étapes du protocole d'immunomarquage.

L'immunofluorescence directe utilise un anticorps couplé à un fluorochrome dirigé contre la molécule d'intérêt, aussi appelée antigène. Le fluorochrome est une substance chimique qui émet de la lumière si elle est excitée à une certaine longueur d'onde, permettant par la suite l'observation avec un microscope à fluorescence. L'immunofluorescence indirecte est basée sur l'utilisation d'un anticorps primaire spécifique dirigé contre l'antigène recherché et ensuite un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome qui possède une haute affinité pour l'anticorps primaire.

Grace à cette technique, nous évaluerons la distribution des filaments d'actine et la présence de vinculine, une protéine présente majoritairement dans les adhésions focales. Cette protéine cytosquelettique est impliquée dans l'adhésion ainsi que dans la migration cellulaire. Les données acquises nous permettront de visualiser si les adhésions focales varient d'une surface à l'autre et permettra de déterminer si la nanoporosité de la surface influence les adhésions focales.

2.4.4 RT-PCR

La PCR en temps réel est une méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase où les données sont recueillies en temps réel durant la réaction afin de connaître la quantité d'amplicons produites à partir d'une simple copie d'une séquence particulière d'acides nucléiques. Dans un premier temps, nous choisissons la séquence qui va être spécifiquement amplifiée et détectée. La PCR quantitative mesure le nombre d'amplicon (portion d'ADN définie par une couple d'amorces) produit. L'amplification est réalisée de façon constante à un taux exponentiel à l'aide d'une ADN polymérase thermostable. À chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total ou d'amplicon est mesurée grâce à un marqueur fluorescent, dans notre cas le SYBR Green, qui vient se lier aux acides nucléiques double brins. D'autres sondes fluorescentes se fixent spécifiquement sur une séquence d'ADN donnée (technologie Taqman et Beacon). Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN (soit à cause d'un "quencher" soit car la fluorescence nécessite un ADN double brin). Un seuil de fluorescence est établi par le programme de l'appareil de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil, alors nous obtenons un numéro de cycle PCR appelé "Ct" (sigles en anglais pour *Cycle Threshold*). Cette valeur nous permet de quantifier l'ADN de façon absolue ou relative.

L'utilisation de cette technique nous permettra de quantifier les différences dans le niveau d'expression d'une cible spécifique (gène) entre différents échantillons, par exemple dans un échantillon traité ou non traité. Dans notre cas, elle nous permettra de déterminer s'il y a une différence du niveau d'expression entre la surface contrôle et celle nanostructurée des (a) protéines associées aux adhésions focales et aux projections cellulaires, (b) différentes intégrines et (c) petites GTPases.

2.5 Comportement cellulaire sur des surfaces de titane modifiées

Il est connu que les caractéristiques physico-chimiques et morphologiques de la surface d'un implant telles que la rugosité, la topographie, la composition chimique et de l'énergie superficielle peuvent influencer sur la réponse cellulaire initiale des ostéoblastes. Cette réponse aura une influence sur la qualité et la stabilité du tissu osseux formé autour de l'implant, ce qui détermine sa performance à long terme (36).

Les expériences préliminaires utilisant la nanotopographie ont montré que les caractéristiques à cette échelle peuvent influencer de façon significative la morphologie cellulaire, l'adhésion, la prolifération et la régulation des gènes (37, 38). Différents mécanismes ont été proposés mais ceux qui interviennent dans la réponse cellulaire sont encore incertains (39).

2.5.1 Morphologie de la cellule

Dans les premières étapes de l'interaction cellule-surface, les cellules détectent l'environnement à travers deux types de protrusion cellulaires ayant une géométrie distincte (40-43). Les filopodes sont des protrusions minces de la membrane plasmique contenant des filaments d'actine, tandis que les lamellipodes sont latéralement plus étendus et se composent d'un réseau de filaments d'actine réticulés (44). Ces structures fonctionnent comme des «antennes» ou des «tentacules» que les cellules utilisent pour sonder leur microenvironnement (Figure 5). Cependant, les rôles des filopodes semblent diversifiés et, dans la plupart des cas, restent vagues (45). Aucun mécanisme concluant n'a été proposé sur la façon dont les filopodes peuvent reconnaître les caractéristiques topographiques et quel rôle jouent les forces de traction des filopodes dans la directionnalité et la migration des cellules (43).

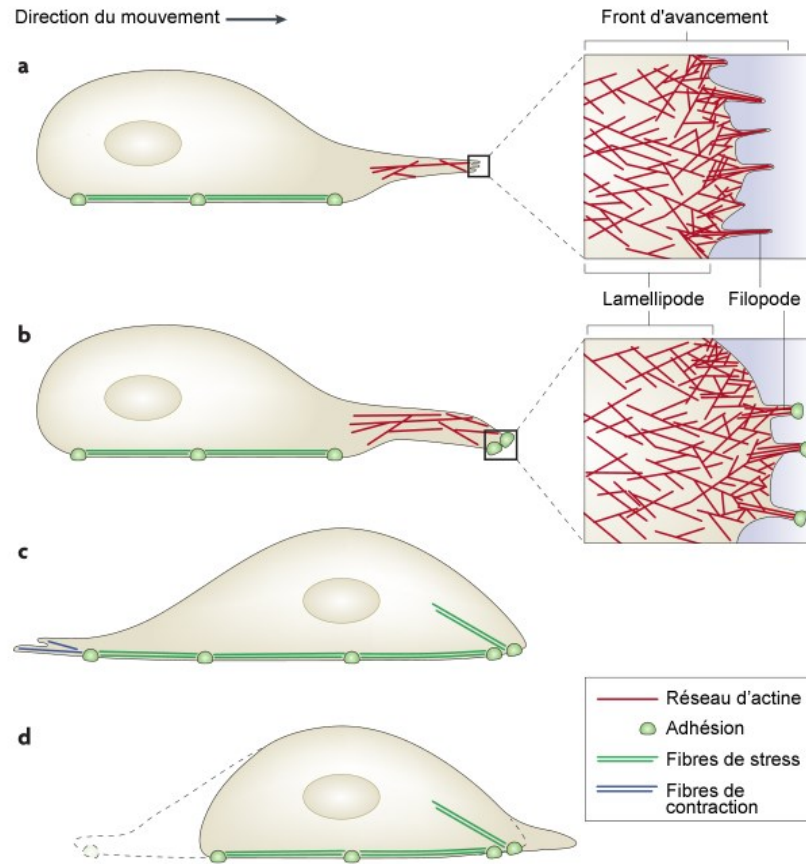


Figure 5. Schéma des filopodes et lamellipodes développés par la cellule pendant le sondage de l'environnement superficiel.

La nanotopographie représente un outil pour moduler à la fois l'adhérence et la propagation cellulaire positivement ou négativement. La nanotopographie peut également contrôler la morphologie cellulaire. Différentes études ont montré l'effet de la topographie à l'échelle nanométrique sur les mécanismes d'étalement de la cellule. Lavenus *et al.* (46) ont évalué différents substrats de titane avec des nanopores de 30, 150 et 300 nm de diamètre préparés par dépôt physique en phase vapeur sur l'adhésion des cellules souches mésenchymateuses humaines. Ces cellules ont développé une morphologie cellulaire plus ramifiée sur la surface avec des nanopores de 30 nm par rapport aux autres diamètres. Les résultats obtenus dans cette étude (l'expression des intégrines, la morphologie cellulaire et la différenciation ostéoblastique) ont permis aux auteurs de conclure que les nanopores de 30 nm favorisent la différenciation ostéoblastique précoce et, par conséquent, l'ostéointégration

rapide des implants de titane. D'autre part, Bo Su *et al.* (47) ont étudié différentes structures d'oxyde de titane avec des nanopiliers de 15, 55 et 100 nm de hauteur obtenus par anodisation. Dans ce cas, les nanopiliers de 15 nm d'hauteur ont montré les meilleurs résultats de réponse cellulaire, tel qu'indiqué par la formation d'un cytosquelette hautement organisé et de grandes adhésions focales.

2.5.2 Adhésions focales

Pendant l'étalement cellulaire, les filopodes contenant des intégrines vont former les sites d'adhésion initiaux, comme de petits points, présents à la périphérie de la cellule dans le lamellipode (Figure 6A) (45). Par la suite, d'autres composantes, telles que la taline, la focal adhesion kinase (FAK), la vinculine, la tensine, la zyxine, l'alpha actinine et la paxilline, sont recrutées à ces sites pour former des adhésions focales situées plus centralement (36, 45, 48). Enfin, les adhésions focales et les structures de F-actine se réorganisent, conduisant à la formation des adhésions focales ancrées aux fibres de stress d'actine (Figure 6B).

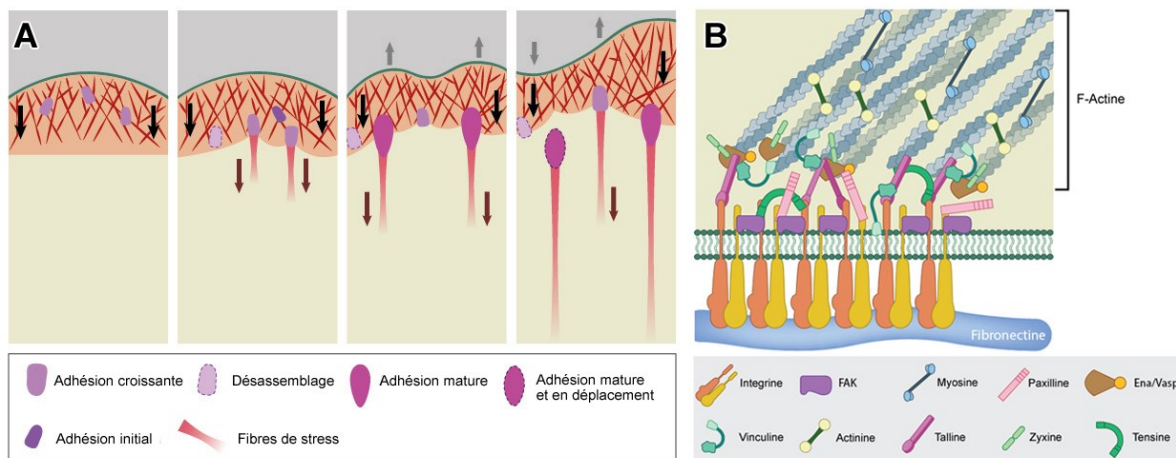


Figure 6. Différentes étapes dans la formation des adhésions focales (A) et organisation des protéines dans les adhésions focales (B). Adapté à partir de (49, 50).

De récentes études ont montré que la formation des adhésions focales est sensible à l'arrangement spatial et à la présentation des ligands dans les matrices extracellulaires (51, 52). Une variation à l'échelle nanométrique dans la topographie du substrat peut affecter directement la conformation et le regroupement des intégrines et donc l'organisation des protéines dans les adhésions focales (5). Lamers *et al.* (4) ont proposé un modèle basé sur la

distance maximale entre les intégrines pour la formation des adhésions focales matures et la signalisation intracellulaire normale. Cette distance serait ≤ 75 nm ; si les distances deviennent plus grandes la signalisation est altérée et la réponse cellulaire changera. Les topographies avec des rainures supérieures à 75 nm peuvent provoquer une diminution du regroupement des intégrines et une réduction de la maturation des adhésions focales. D'autre part, Huang *et al.* (53) ont rapporté qu'un désordre local des ligands dans la matrice extracellulaire avec un espacement supérieure à 70 nm en moyenne pourrait favoriser le regroupement des intégrines.

Park *et al.* (3) ont étudié l'effet de différentes surfaces formées par des nanotubes de TiO₂ orientés verticalement avec des diamètres entre 15 et 100 nm sur des cellules souches mésenchymateuses. Cette étude a montré qu'un espacement inférieur à 30 nm représente une échelle de longueur efficace pour la formation de regroupements des intégrines et de contacts focaux par rapport aux surfaces lisses de TiO₂.

Malgré le nombre de résultats qui démontrent l'effet de la nanotopographie sur la formation des adhésions focales, un consensus n'est toujours pas établi sur quelle est la meilleure topographie.

2.5.3 Expression génique

Une modification de la surface du titane à l'échelle nanométrique permet de moduler l'expression des gènes favorisant l'adhésion et la différenciation cellulaire (37). La régulation de l'expression génique est le mécanisme fondamental permettant la différenciation cellulaire, la morphogenèse et l'adaptabilité d'un organisme vivant à son environnement. Différentes topographies à l'échelle nanométrique ont été étudiées pour élucider les mécanismes par lesquels les caractéristiques physiques de la surface se traduisent en signaux moléculaires.

Takebe *et al.* (54) ont modifié la surface du Ti à l'échelle nanométrique pour étudier l'effet sur l'expression génique des cellules épithéliales gingivales. Sur les surfaces modifiées par déposition de cristaux d'hydroxyapatite, les cellules ont montré une augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, la laminine-5 (chaîne $\gamma 2$ et $\alpha 3$) et le FAK par rapport aux cellules sur le Ti ainsi que sur la surface obtenue par anodisation. Les auteurs ont suggéré que la couche mince d'HA avec une surface nanotopographique pourrait réguler et améliorer l'adhésion des cellules épithéliales médiées par l'intégrine et l'expression génique associée.

2.6 Objectif

L'intérêt de notre recherche porte sur l'obtention d'une surface mono-planaire nanostructurée à partir d'un traitement simple d'oxydation chimique. Afin d'évaluer le potentiel de cette surface pour des applications médicales, nous allons étudier son influence sur la formation d'adhésions focales cellulaires et de filopodes. De plus, nous allons également examiner comment les caractéristiques physico-chimiques de la surface obtenue guident l'expression génique des protéines associées à des adhésions focales et les projections cellulaires en utilisant des cellules pré-ostéoblastiques.

Notre hypothèse est que l'interaction des adhésions focales, des filopodes et leurs protrusions avec la surface nanostructurée de titane engendrent une cascade de signalisation biomécanique qui module le comportement cellulaire. En faisant varier les caractéristiques physiques de la surface des implants à l'échelle nanométrique telles que la rugosité et la nanoporosité, nous pensons qu'il est possible d'obtenir des résultats similaires qu'avec l'utilisation des molécules bioactives telles que des protéines et des facteurs de croissance et ceci sans risque d'effets secondaires.

Chapitre 3 – Article: A controlled nanoporous surface promotes the maturation of focal adhesions and the formation of filopodia with distinctive nanoscale protrusions

Dainelys Guadarrama Bello^a, Aurélien Fouillen^{a,b}, Antonella Badia^c and Antonio Nanci^{a,b*}

^aLaboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials, Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, C.P 6128 succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C3J7, Canada.

^bDepartment of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, C.P 6128 succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C3J7, Canada.

^cDepartment of Chemistry, Faculty of Arts and Sciences, Université de Montréal, C.P 6128 succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C3J7, Canada.

dainelys.guadarrama.bello@umontreal.ca

aurelien.fouillen@umontreal.ca

antonella.badia@umontreal.ca

Corresponding Author

Antonio Nanci

Faculté de Médecine Dentaire

Université de Montréal

C.P. 6128, succ. Centre-ville

Montréal (Québec) H3C 3J7

E-mail: antonio.nanci@umontreal.ca

Phone: 514 343-5846

Fax: 514 343-2233

Author contributions: D. Guadarrama Bello and A. Nanci participated in the design of the experiments, in the interpretation of results and writing of the manuscript. D. Guadarrama Bello performed most of the experimental work and the entire data analysis. A. Fouillen carried out the biomolecular analysis, helped in the design of the fluorescence experiments and the revision of the manuscript. A. Badia supervised the AFM analysis and interpretation and helped in the revision of the manuscript. The project was under the supervision of A. Nanci. This manuscript was submitted to Acta Biomaterialia journal.

3.1 – Abstract

While topography is a key determinant of the cellular response to biomaterials, the mechanisms implicated in the cell-surface interactions are complex and still not fully elucidated. In this context, we have examined the effect of nanoscale topography on the formation of filopodia, focal adhesions, and on gene expression of proteins associated with cell adhesion and sensing. Commercially pure titanium discs were treated for oxidative nanopatterning with a solution of H₂SO₄/H₂O₂ 50:50 (v/v). Scanning electron microscopy and atomic force microscopy characterizations showed that this facile chemical treatment efficiently creates a unique nanoporous surface with a root-mean-square roughness of 11.5 nm and pore diameter of 20 ± 5 nm. Osteogenic cells were cultured on polished (control) and nanotextured discs for periods of 6, 24, and 72 h. Immunofluorescence analysis revealed an increase in adhesion formation per cell area and in the focal adhesion length, and maturity on the nanoporous surface. Gene expression for various focal adhesion markers, including paxillin and talin, and different integrins (e.g. α1, β1, and α5) was also significantly increased. Interestingly, scanning electron microscopy imaging revealed the presence of more filopodia on cells grown on the nanoporous surface. These cell extensions displayed abundant and distinctive nanoscale lateral protrusions in the range of 10-15 nm diameter that molded the nanopore walls. Together the increase in focal adhesions, the abundance of filopodia and associated protrusions could contribute to strengthening the adhesive interaction of cells with the surface and thereby alter the nanoscale biomechanical relationships that trigger cellular cascades regulating cell behavior.

Keywords: Nanotopography, Filopodia, Focal adhesions, Gene expression.

3.2 – Introduction

Many naturally-occurring surfaces possess sophisticated topographical structures which impart them with exceptional properties. The superhydrophobic self-cleaning, nanostructured surface of lotus leaves completely repels water, the superadhesive microscopic brushes of gecko fingers drastically increase the contact with the surface, and the nanopillars of cicada wings are extremely effective at breaking down the walls of bacterial cells to provide bactericidal properties (1, 2). These examples clearly demonstrate that physical structuring of surfaces can be as effective, if not more, as chemical modification in engineering materials with specific properties. This approach is exploited in the present work.

Surface topography is a key factor that influences the functional activity of cells in contact with biomaterials, but the mechanisms are complex and remain unclear at all size scales (3-6). In the past few years, there has been an increasing interest in understanding the effects of different surface features of various length scales on cell adhesion and proliferation, and on osteogenic activity (6). Because cells naturally grow and thrive on nanostructured extracellular matrices, the focus has now shifted to nanoscale topographies and their capacity to selectively influence cell behavior, including that of stem cells (7-10).

In the early stages of cell-surface interaction, cells sense the environment through lamellipodia and filopodia (11-13), which are also involved in cell migration and cell-cell interaction processes (12, 14). During cell spreading, cells initially form nascent adhesions, as small dots, present at the leading edge of the cell in lamellipodia, known as focal complexes (FXs). These structures normally transform into focal adhesions (FAs), located at the cell periphery and more centrally, associated with the end of stress fibers in cells (15). These sites are constituted of several proteins, including vinculin, talin, paxillin, tensin, zyxin, focal adhesion kinase (FAK), and alpha-actinin (14, 16). FAs may become more elongated and form mature adhesions named fibrillar adhesions (FBs) (17). FAs link the actin-rich cytoskeleton of cells with the extracellular matrix through integrins to mediate cell adhesion, migration, mechanosensing and signaling events (18, 19). They provide to the cells an appropriate and specific adhesion depending on their environment to mediate tissue formation and immune responses (19). Quantification and characterization of FAs provide information on cellular activity and dynamics. Vinculin, the most abundant protein in adhesion complexes, is

commonly used as a marker for focal adhesions because of its presence in both FXs and FAs (6, 20, 21).

Several methods have been successfully used to generate nanotextured surfaces of various materials to evaluate the effects on cell behavior. Park *et al.* (22) reported how bioactive ion surface modification and associated ion release increase the osteogenic activity of the nanostructured Ti surface, inducing focal adhesion development and the expression of numerous genes as *vinculin*, *talin* and *RhoA* of human multipotent adipose stem cells. Also, in this study, it was found that mesenchymal stem cell morphology depends on the organization of nanopits created by electron beam lithography. It also been shown that disordered morphologies sustain the formation of larger adhesions by mesenchymal stem cells when compared to planar or pitted ones (120 nm in diameter) with a square geometry (23).

In previous studies, we have used simple chemical treatments to create unique and reproducible oxide surface layers on metals such as Ti and Ti₆Al₄V (24-28). The resulting nanoporous surface network exhibits the ability to promote selectively cell activity *in vitro* and osteogenesis *in vivo*, while simultaneously providing antimicrobial capacity (29-31). This nanotopography stimulates the formation of filopodia that exhibit very small nanoscale lateral protrusions (24). Similar projections, substantially larger in size and referred to as “nanopodia”, have also been reported in the case of surfaces with nanoscale protrusions and for endothelial and cancer cells (32-34).

The aim of this study with pre-osteoblastic cells is to examine how a nanoporous Ti surface affects the formation of adhesions and sensing structures as well as the gene expression of proteins associated with focal adhesions, cellular projections, integrins and Rho Family GTPases. Particular attention is given to filopodia and associated nanoscale lateral protrusions because these could greatly influence the interaction with surfaces by increasing contact area and interaction force.

3.3 – Materials and Methods

3.3.1 – Surface Modification

Nanoscale topographies were produced on commercially pure grade II titanium discs (cp-Ti) of approximately 12 mm diameter and 2 mm thickness. The samples were first polished in three stages, using silicon carbide abrasive paper, Texmet carpet with MetaDi Fluid and 9 μm Diamond Suspension followed by MicroFloc carpet with distilled water and MasterMet solution (SiO_2). The polished discs were rinsed with distilled water in an ultrasonic bath and subsequently cleaned in 70% ethanol and dried in air. This surface served as the control. To generate the nanoporous surfaces, polished discs were treated for 1.5 h with a solution consisting of equal volumes of concentrated H_2SO_4 (98% mass fraction) and 30% H_2O_2 at room temperature (RT) as previously described (25), followed by several washes in distilled water. Before seeding the cells, the control and freshly treated discs were sterilized using 70% ethanol and UV light.

3.3.2 – Surface Characterization

The surfaces of the control and chemically-treated discs were examined using either a GeminiSEM 500 (Zeiss GmbH, Oberkochen, Germany) or JEOL JSM-7400F (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) operated at 1.5 kV. The average pore diameter was measured using Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/features.html>). Additionally, the surface topography and roughness [root-mean-square (Rq) and arithmetic mean (Ra)] were analyzed by atomic force microscopy (AFM) with an ICON scanning probe microscope (Bruker Nano Surfaces, Santa Barbara, CA) operated in air using the PeakForce QNM mode and a sharp microlever probe (type-MLCT, Bruker AFM Probes Americas) with nominal tip radius of 2 nm and spring constant of 0.6 N/m.

3.3.3 – Cell Culture

Mouse calvaria-derived osteogenic cells MC3T3-E1 subclone 4 from American Type Culture Collection (ATCC) were cultured in Alpha Minimum Essential Medium with Earle's salts, L-glutamine, ribonucleosides and deoxyribonucleosides supplemented with 10% fetal bovine serum at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 . Cells were plated on

polished cp-Ti and chemically-treated discs placed in 12-well plates at a cell density of 10,000 cells/disc. The cells were grown for periods of 6, 24 and 72 h.

3.3.4 – Cell Morphology and Cell Spreading (Scanning Electron Microscopy)

For morphological analysis, cells were fixed for 1 h at 4 °C in 2.5% glutaraldehyde and subsequently rinsed three times with 0.1 M sodium phosphate buffer (PB), pH 7.3, and incubated for 1 h in 1% osmium tetroxide at 4 °C. The cells were dehydrated through an ethanol series (30%, 50%, 70%, 90%, 95% and two times 100%) followed by drying in a critical point drier (Balzers CPD 030, Hudson, NH, USA). Characterization of the cell morphology on the polished and chemically-treated surfaces was carried out by FE-SEM as above. A Orion helium ion microscope (HIM) (Carl Zeiss Microscopy, Peabody, MA) operated at an imaging voltage of 35 kV, aperture size of 5 mm and a beam blanker current of 0.5 pA was used for higher resolution images of the nanoscale lateral protrusions emitted by the filopodia on the chemically-treated surface.

3.3.5 – Immunofluorescence Visualization of Focal Contacts and Cell Attachment

To visualize focal adhesions, two samples of cells grown on control and chemically-treated surfaces were fixed at 6, 24, and 72 h of culture for 30 min at 4 °C using periodate-lysine-paraformaldehyde in PB. After fixation, cells were washed in PB and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PB for 10 min. Nonspecific binding sites were blocked with 5% skim milk in PB for 1 h. The specific primary antibody (1:200; Monoclonal Anti-Vinculin Clone hVIN-1 Sigma, MO, USA) was diluted in blocking solution and the samples were incubated for 2 h. Rhodamine-phalloidin (1:150, Life Technologies) was simultaneously added for the duration of this incubation. The incubation was followed by Alexa Fluor 488 (green fluorescence) conjugated goat anti-mouse secondary antibody (1:400, Life technologies) diluted in blocking solution as well. All steps of the incubations were performed in a humidified environment at RT in the dark. Between each incubation step, the samples were washed three times (5 min each) in PB. The discs were mounted face up on glass slides,

and cell nuclei were stained and mounted with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI, dihydrochloride, Molecular Probes, Invitrogen) covered with round-glass coverslips. The samples were analyzed with a Zeiss Axio Imager M2 Optical Microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). High-magnification immunofluorescence imaging was used to study the cytoskeleton distribution and the adhesion sites of the cells.

3.3.6 – Image Analysis

To estimate the size of the focal adhesions, the area occupied by vinculin staining was quantified and expressed as a percentage of the cell area. For each substrate, 11 individual cells were evaluated after 6, 24, and 72 h from two independent experiments. Immunofluorescence images were taken at 63× to obtain optimal quality for processing. The captured color images were separated into single channel images in greyscale using the ImageJ split channel command. After thresholding, automated detection of vinculin was employed to estimate the mean number and area of vinculin contacts, as well as the total cell area (35, 36). To quantify the adhesion length, images taken from the 24 h cultures were used to measure the length of each individual vinculin point. These were classified in ranges (< 1 μm, 1 μm-5μm, > 5μm) and expressed as a percentage of the total measurements. The data was presented as the mean value ± standard error (SE). A t-test analysis using OriginPro 8.5 was performed on the data to determine if differences between the control and chemically-treated surfaces were statistically significant. For cell counts, the entire substrate was surveyed photographically at 10× magnification and the DAPI stained nuclei from adherent cells were automatically detected and counted using ImageJ.

3.3.7 – Gene Expression

Quantitative real-time PCR was carried out at 24 h after cell seeding to evaluate the gene expression levels of *paxillin (Pxn)*, *vinculin (Vcl)*, *talin (Tln)*, *focal adhesion kinase (FAK)*, *alpha-actinin (ACTN1)*, *RhoA*, *Cdc42*, *Rac1*, *Rock1*, *PTEN*, *integrin α1 (ITGa1)*, *integrin β1 (ITGβ1)*, *integrin α5 (ITGa5)*, and *integrin αV (ITGaV)* in MC3T3-E1 cells grown on the control and chemically-treated surfaces. Following an incubation of 24 h, the samples were washed in PB, and the total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen-Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. The amount of total RNA from

each sample was quantified using a BioDrop DUO micro-volume spectrophotometer (Montreal Biotech Inc, Canada). The oligonucleotide primers designed with Primer 3 (SourceForge) used in this study are listed in Table 1. Real-time PCR reactions were performed in 20 μ L of PCR mixture containing 3.5 ng of each cDNA sample and specific primers, and using the QuantiNovaTM SYBR[®] Green PCR kit (Qiagen). The following conditions were used: 50 °C for 10 min, followed by 95 °C for 2 min, then 60 cycles of 95 °C for 5 sec. and 60 °C for 10 s using the Light Cycle 480 PCR system (Roche). Gene expression was normalized to GAPDH and expressed relative to the control discs using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (37).

Tableau IV. Oligonucleotide Primer Sequences for Real-Time PCR. N.B. Table 1 of the article.

Gene	primer sequence (5'-3'; F: forward; R: reverse) Primers (5'-3')	Product length (bp)
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)</i>	F: TGGACAGCACTGACTTCCAG R: CAAAGCATCGACCAGTGCTA	190
<i>Paxillin (Pxn)</i>	F: CAGCTCCCCATTTCTGATGT R: ACCTGAGGGTTCACAACCAG	138
<i>Vinculin (Vcl)</i>	F: ACCTGCAGACCAAAACCAAC R: CTTACCGACTCCACGGTCAT	134
<i>Talin (Tln)</i>	F: TCCAGTACCACACTGGGTCA R: CAGATGGTGCTTTCAGCGTA	146
<i>PTK2 protein tyrosine kinase 2 (Ptk2) FAK</i>	F: AAGGCTCAGAGGTGCCTGTA R: TGGAGACATCCTGCACAGAG	131
<i>Integrin subunit beta 1 (ITGβ1)</i>	F: GGGAGGGGCTTTCTTCTATG R: GCATTCACAAACACGACACC	138
<i>Integrin subunit alpha 1 (ITGa1)</i>	F: GCCTTCATGTGTCTGCTTGA R: GGGGAAATCCAAGTTTCCAT	180
<i>Integrin subunit alpha 5 (ITGa5)</i>	F: ACCACCTGCAGAAACGAGAGGC R: TGGCCCAAACCTCACAGCGCA	217
<i>Integrin subunit alpha V (ITGaV)</i>	F: TCCCACCGCAGGCTGACTTCAT R: TCGGGTTTCCAAGGTCGCACAC	126
<i>Actinin alpha 1 (ACTN1)</i>	F: TTTTGGTAACACCAGGCACA R: CTGCTTGTCATCCGTCTTGA	146
<i>Cdc42 cell division cycle 42</i>	F: CTGCTATGAACGCATCTCCA R: CATGAGTGCATGTGGGTAGG	149
<i>Rac1 RAS-related C3 botulinum substrate 1</i>	F: CCTTGACTCTGCTTGGGAAG R: AGCCAGCTTGTCACTGTCCT	143
<i>Ras homolog family member A (RhoA)</i>	F: TTTGCATCGTCCTGAGTCTG R: TGAAACCTTCCCACACACAA	143
<i>Rock1</i>	F: CCTGCCCTAGAGTGTCGAAG R: CACACCCTGCACCTTACCTT	102
<i>PTEN</i>	F: AGCATGTTTCTGCGACCTCT R: ACGGTTCCCTCACTGAACAC	114

3.4 – Results

3.4.1 – Characterization of Substrate Topography

Topographies of the cp-Ti before and after oxidative chemical treatment are shown in Figure 1. The micrograph of the polished titanium used as the control (Figure 1A) shows a

smooth surface without topographical features. On the other hand, acid etching of this surface resulted in the formation of a unique network characterized by three-dimensional interconnected nanopores (Figure 1B). The nanopores were uniformly distributed across the titanium surface. This nanotextured surface is consistent with previous results reported for longer treatment time (25). The mean pore size diameter was 20 ± 5 nm (Figure 1C).

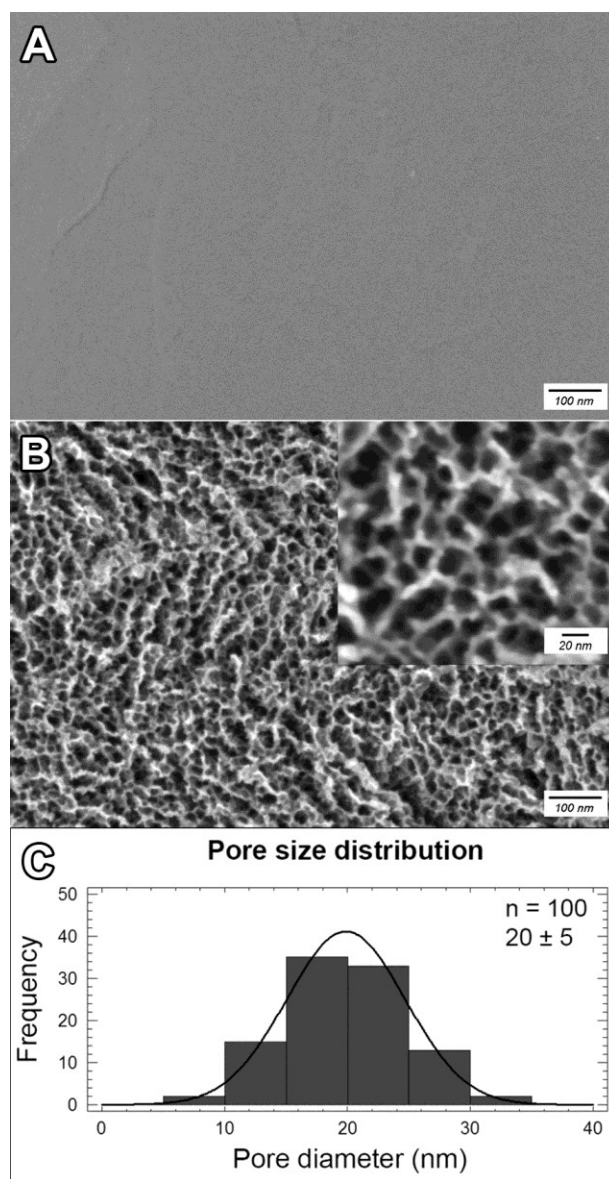


Figure 7. SEM images of the titanium surface after (A) mechanical polishing and (B, inset) treatment with H₂SO₄/H₂O₂ for 1.5 h. (C) shows the size distribution of the nanopores. N.B. Figure 1 of the article.

AFM roughness analyses of the polished versus chemically treated titanium discs (Figure 2) revealed R_q values of 0.60 ± 0.05 nm compared to 11.5 ± 0.9 nm, and R_a values of 0.50 ± 0.03 nm compared to 9.2 ± 0.7 nm. The nanopores exhibited depths ranging from 10 to 25 nm.

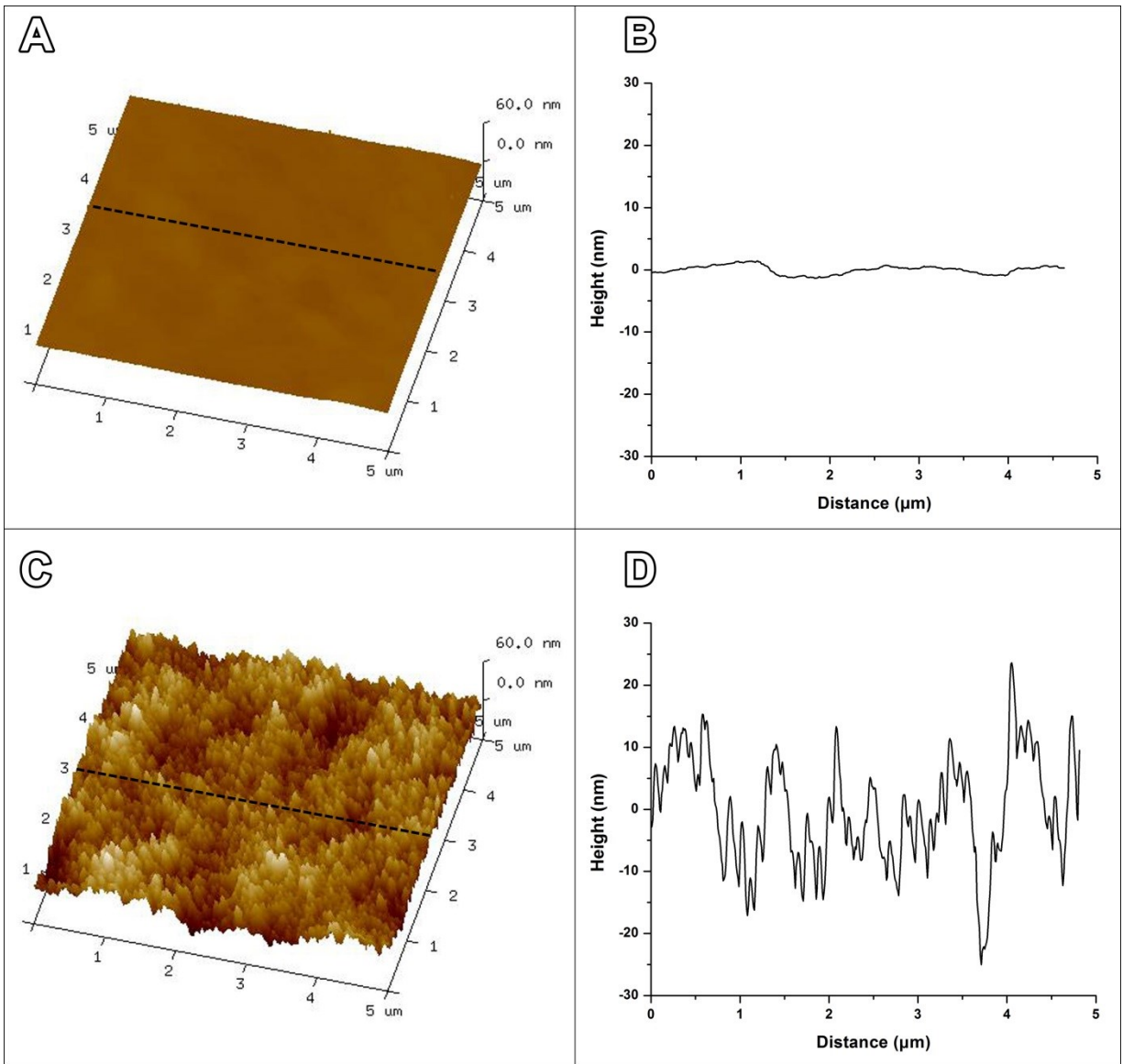


Figure 8. AFM 3D topographies of polished (A) and chemically treated (C) surfaces. Corresponding line sections: (B) and (D). N.B. Figure 2 of the article.

3.4.2 – Cell Number

The number of adherent cells was measured to estimate the influence of nanoporosity on MC3T3-E1 cell growth. At all time intervals, there were more cells on the nanoporous surface, but the number was significantly higher (~ 24%) only at 72 h of culture (Figure 3).

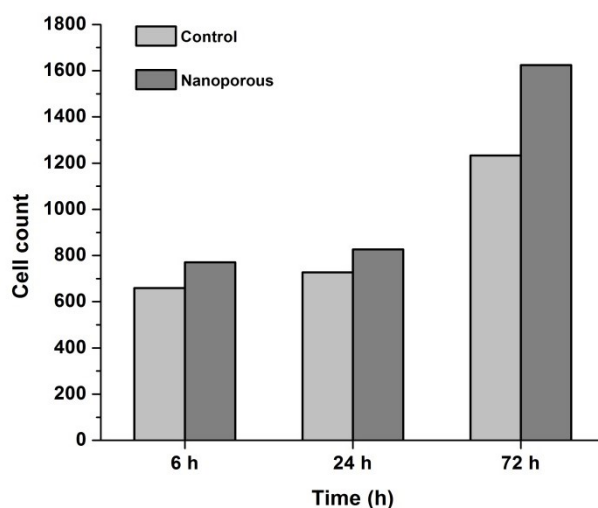


Figure 9. Cell count by immunofluorescence microscopy after 6, 24, and 72 h of cells grown on the control and nanoporous surfaces. N.B. Figure 3 of the article.

3.4.3 – Immunofluorescence Microscopy

Focal adhesions constitute the sites that cells use to transmit mechanical force and regulatory signals to the substrate (38). For this reason, we quantified and compared the size of the focal adhesions formed by MC3T3-E1 cells on control and nanoporous surfaces. Immunofluorescence images of cells cultured for 6, 24 and 72 h showed no differences in the organization of the actin cytoskeleton (Figure 4). Independently of the surface, they both contained well-defined actin stress fibers but revealed more vinculin-rich plaques on the nanoporous surface (Figure 4).

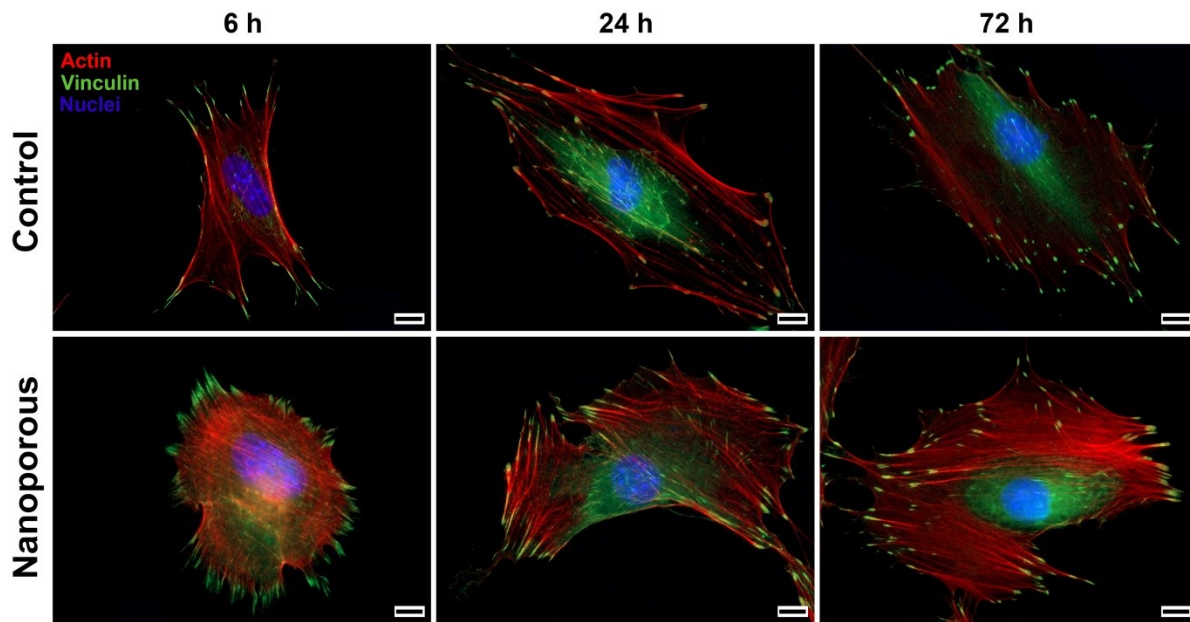


Figure 10. Fluorescence micrographs of MC3T3-E1 cells on control and nanoporous surfaces successively cultured for 6, 24, and 72 h. Stained with DAPI (blue) for nuclei, rhodamine/phalloidin (red) for actin, and anti-vinculin (green) for vinculin. Although cell adhesions were found on both surfaces, they were more abundant on the nanoporous surface. Scale bar = 10 μ m. N.B. Figure 4 of the article.

Image J software was used to calculate the average focal adhesion area expressed as the percentage of the cell spreading area in order to normalize the results against cell size. (Scheme Figure 5A). There was no statistical difference in number of focal contacts and cell area between the control and nanoporous surfaces (Figure 5B and 5C). As seen in Figure 5D, in the early stages of cell adhesion and spreading, the vinculin-reactive labeled area on the nanoporous surface was twice that on the control surface. Even though the number of focal adhesions increased (Figure 5B), their relative area with respect to the cells progressively decreased over time because the cells became larger (Figure 5C and 5D).

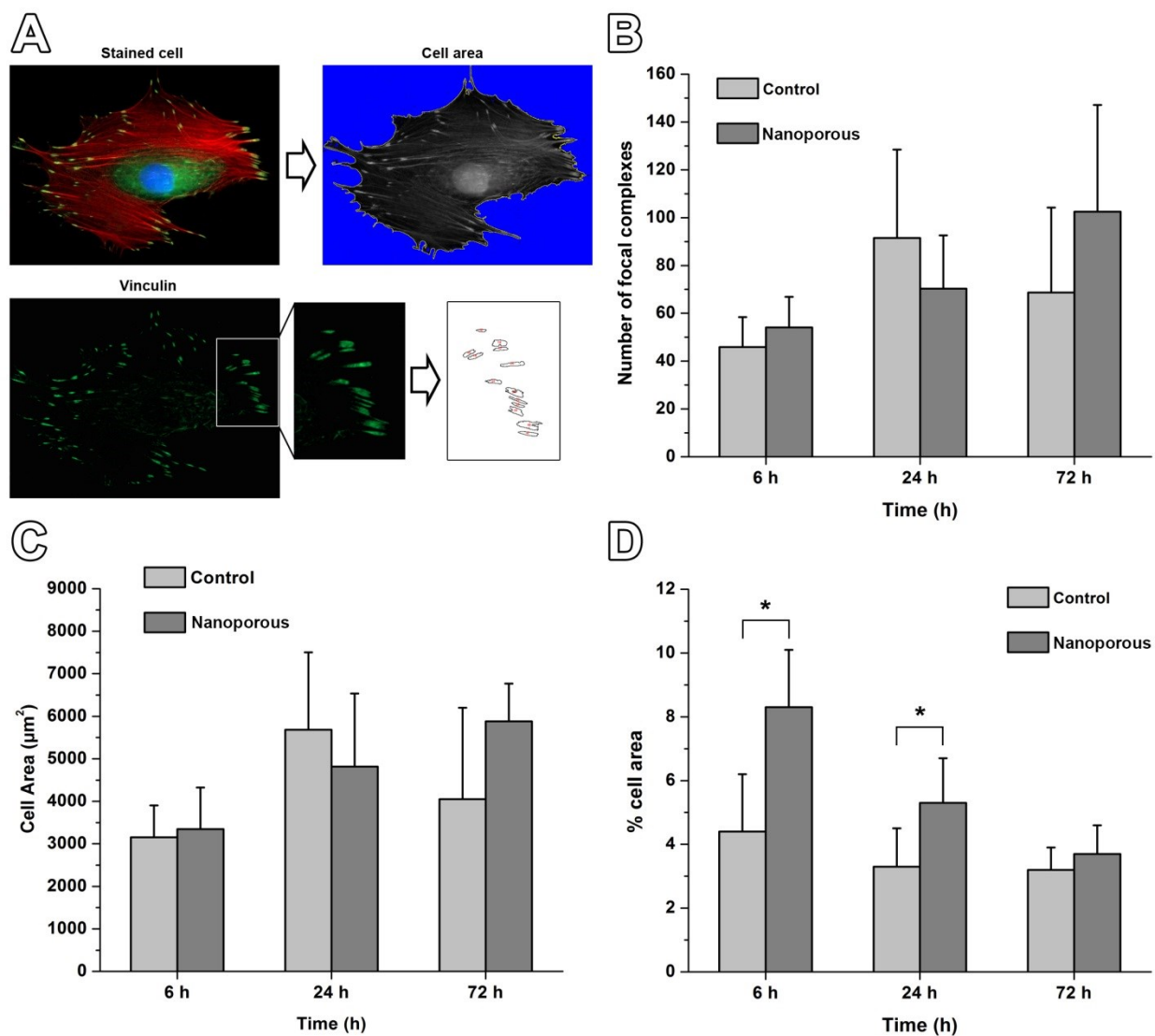


Figure 11. (A) Example of the focal adhesion maps generated using Image J based on vinculin immunofluorescence of MC3T3-E1 cells after 6, 24 and 72 h of culture on control and nanoporous surfaces. (B) Quantitative evaluation of the focal complexes. (C) Measurements of the cell area. (D) Percentage of the cell area surface occupied by the focal adhesions; vinculin area/cell area was significantly higher on the nanoporous surfaces. Error bars represent standard deviation; * statistical significant difference $p < 0.05$. N.B. Figure 5 of the article.

In this study, we also investigated the influence of nanotopography on the size of the adhesion complexes. Quantification of their distribution by vinculin immunolabeling showed significant differences in the length of these complexes in MC3T3-E1 cells cultured on the

control and nanoporous surfaces (Figure 6). There was a strong tendency to form mature focal adhesions on the nanoporous (18.6%) versus the control (3.6%) surface (Figure 6B).

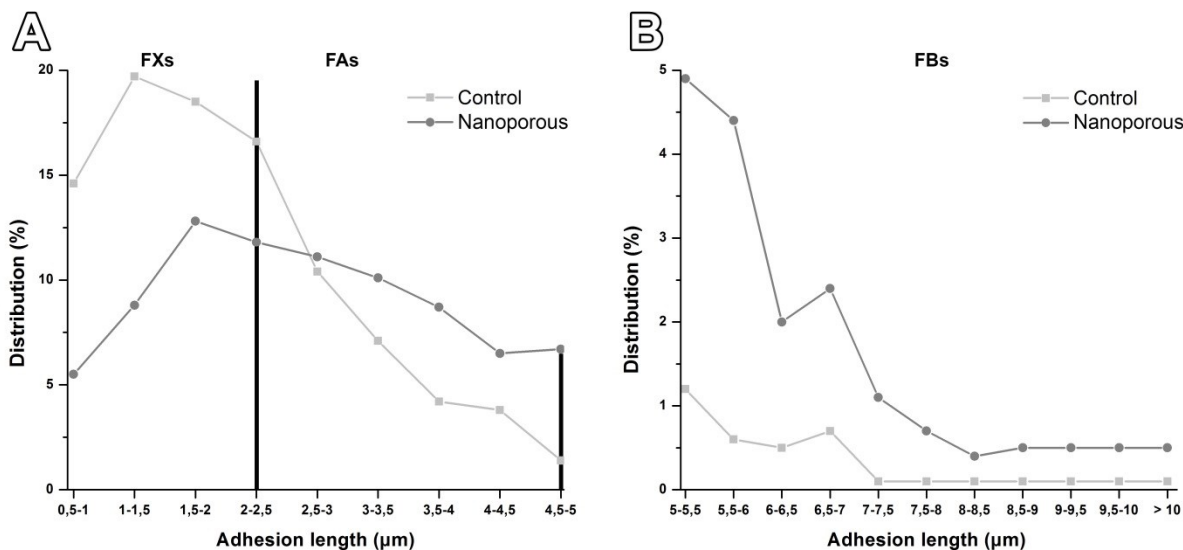


Figure 12. Length distribution of (A) focal complexes (FXs) and focal adhesions (FAs), and (B) fibrillar adhesions (FBs) formed by MC3T3-E1 cultured for 24 h on control and nanoporous surfaces. FAs in a range of 1-3 μm were more abundant on the control surface, while those > 3 μm and FBs were more numerous on the nanoporous surface. N.B. Figure 6 of the article.

3.4.4 – Cell Morphology and Cell Adhesion

SEM analysis at 24 h (Figure 7A, B) and 72 h (Figure 7C, D) revealed no significant differences in cell shape on the chemically-treated and control surfaces, but the cells on the nanoporous surface extended more filopodia and these were generally longer and more intimately associated with the surface. In fact, they appeared flatten compared to the more rounded aspect of filopodia on the control surface.

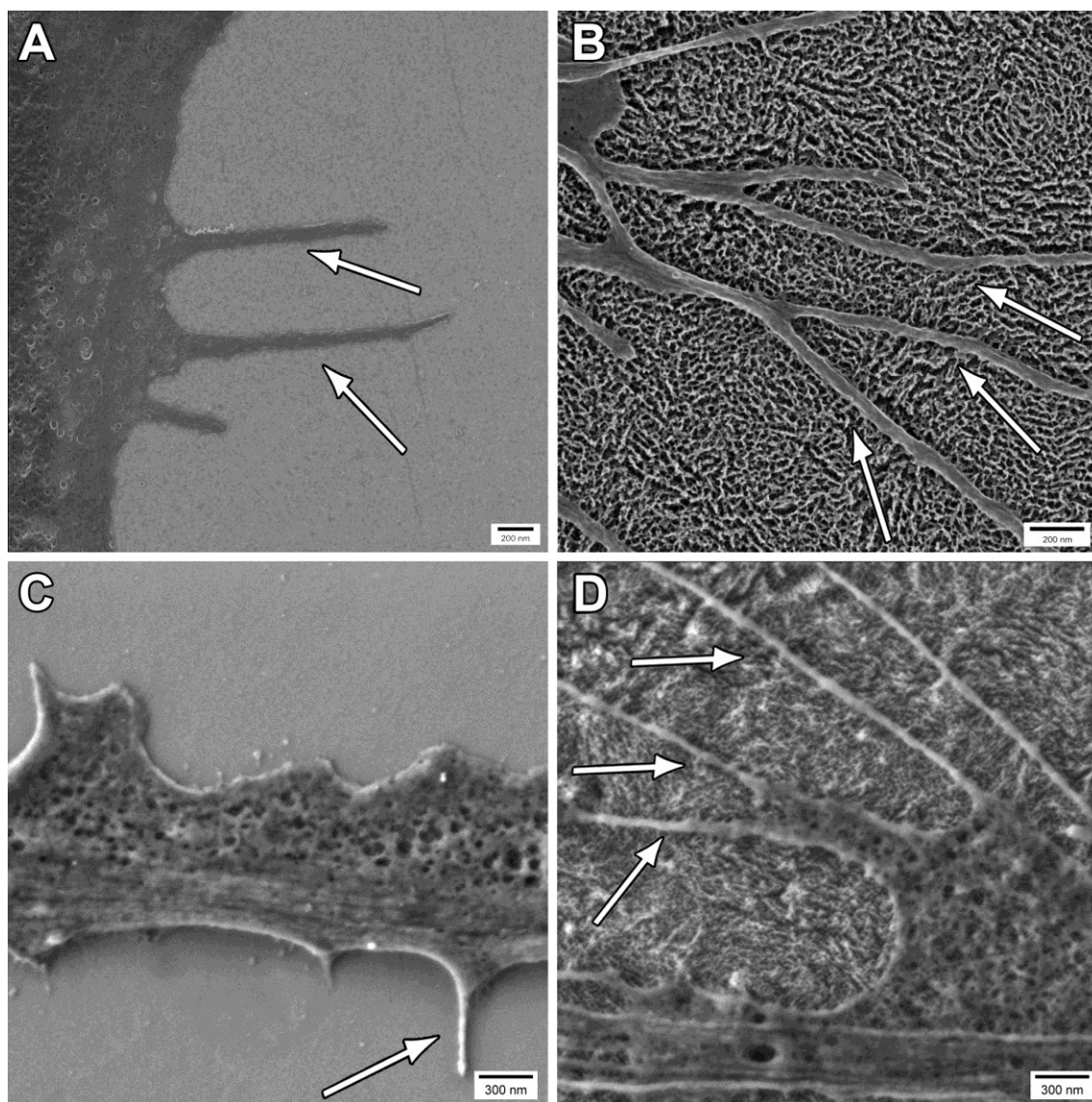


Figure 13. SEM micrographs of MC3T3-E1 cells (**A, C**) on control and (**B, D**) nanoporous surfaces grown for (**A, B**) 24 and (**C, D**) 72 h. Filopodia are indicated with arrows. N.B. Figure 7 of the article.

In addition, HIM imaging revealed ultra-small nanoscale lateral membrane protrusions emanating from the cell body (Figure 8A) and more frequently from the filopodia (Figure 8B). These nanoscale lateral protrusions seemed to extend along and mold the narrow walls of the nanopores.

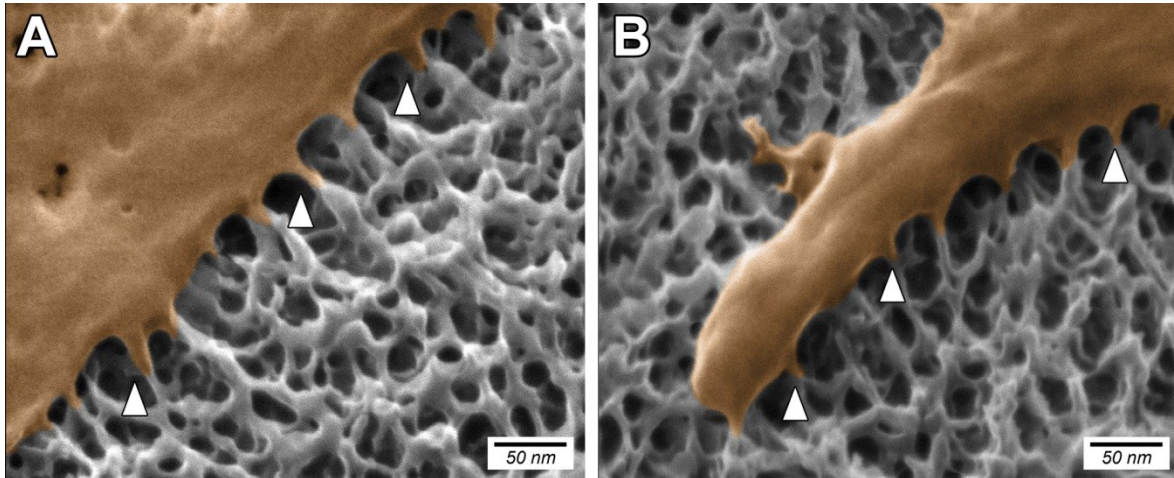


Figure 14. Helium ion electron microscopy (HIM) images of MC3T3-E1 grown for 72 h on a nanoporous surface showing the presence of nanoscale protrusions (arrows) emanating from (A) the cell body and (B) form a filopodium. N.B. Figure 8 of the article.

3.4.5 – Gene Expression

The expression of focal adhesion markers, integrins, and Rho Family GTPases genes were analyzed by RT-qPCR at 24 h of culture. Comparative expression levels on the control and nanoporous surfaces, normalized against *GAPDH* mRNA expression, are represented in Figure 9. The mRNA expression encoding for focal adhesion markers, namely *vinculin*, *talin*, *paxillin*, and *ACTN1*, was upregulated on the nanoporous surface compared to the control surface, while *FAK* was lower (Figure 9A). However, only *talin* mRNA expression showed a statistically-significant difference. Expression of the integrin genes, $\alpha 1$, $\alpha 5$, αV , and $\beta 1$, (Figure 9B) and of *Rho family GTPases* genes, including *RhoA*, *Rock1*, *Cdc42*, *Rac1*, and *PTEN* (Figure 9C) was also upregulated on the nanoporous surface.

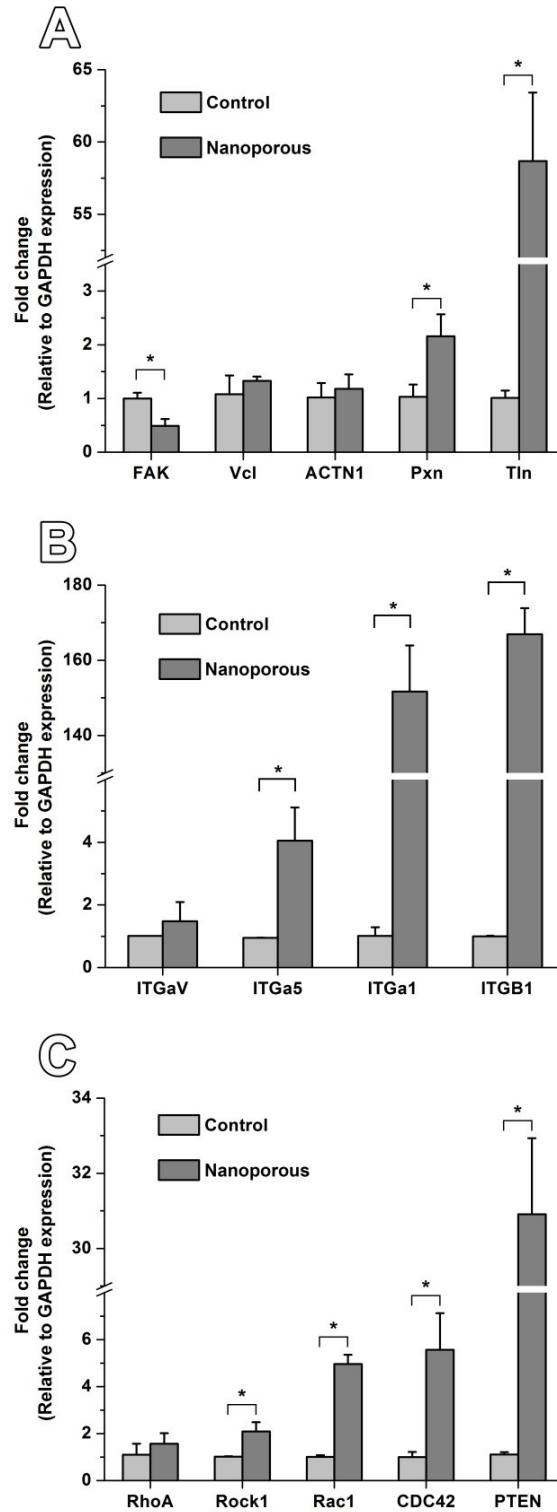


Figure 15. Comparative gene expression profile of (A) focal adhesion markers, (B) integrins, and (C) Rho family GTPases by MC3T3-E1 cells cultured on control and nanoporous surfaces. Error bars represent standard deviation; * statistical significant difference $p < 0.05$. N.B. Figure 9 of the article.

3.5 Discussion

Modulation of focal adhesion and filopodia formation are critical features for the integration of a biomaterial, yet the mechanisms implicated are still not precisely defined for all topographical length scales. In a previous study, we provided initial evidence that cells extend more filopodia on nanoporous titanium surfaces and that these develop extremely small nanoscale lateral protrusions (24). We now build on these two observations and for the first time examine the formation of focal adhesions as well as the expression of gene encoding for several molecules associated with mechanosensing on this surface. We also now provide a detailed and high-resolution structural analysis of the lateral protrusions that show their adaptation to the walls of the three-dimensional network of nanopores and their distinctiveness.

The influence of the size, geometry, and organization of nanoscale surface features on cell activity is still a subject of controversy (39, 40). We employed a shorter oxidative treatment time (1.5 h versus 2-4 h) than previously used in order to generate a mono-planar surface that is more amenable to eventual nanoscale biomechanical analysis. The average pore size (20 ± 5 nm) generated is comparable to that obtained with longer treatment times (22 ± 7 nm), but the RMS roughness of the nanoporous surface generated was considerably reduced from ~ 17 to ~ 12 nm (25). Nonetheless, the as-prepared nanoporous surface was efficient in enhancing the growth and activity of MC3T3-E1 osteogenic cells, similarly to what is obtained at longer surface treatment times with stem cells, osteogenic cells lines, and primary calvaria derived cells (10, 29). This suggests that pore size is a predominant factor in determining the cell response.

The higher cell numbers we have observed on the nanoporous surface correlate with a significant increase in the quantity and size of the focal adhesions, as well as their degree of maturity. The percentage of adhesion area in the initial period of culture doubled as compared to the control surface (8.3% versus 4.4%). This indicates that the physico-chemical characteristics of the nanoporous surface are capable of triggering the cellular mechanisms that regulate the formation and maturation of the focal adhesions (41).

Our results indicate that the focal adhesions are larger on the nanoporous surface compared to the control surface and that there is a greater tendency to form mature adhesions on the former. Larger focal adhesions lead to stronger interactions between the cytoskeleton and substrate (42). Lamers *et al.* (43) evaluated the influence of different nanotopographical cues on osteoblast adhesion, and demonstrated that an increase in groove size results in a significant decrease in focal adhesion length. They proposed that 75 nm is the maximal allowable distance between integrins for maturation and normal intracellular signaling. Integrins are the most important cell surface receptors for extracellular matrix molecules, playing a crucial role in cell adhesion (44). Nanoscale surface changes can significantly affect integrin conformation and clustering, and thereby alter the dynamic organization of signaling proteins in focal adhesions (45). The average pore diameter of 20 ± 5 nm obtained by our treatment is about twice that of an integrin head (45, 46), and could theoretically have a direct impact on their orientation and conformation. Our results are consistent with those of Park *et al.* (46), showing that TiO₂ nanotube diameters between 15 and 30 nm provide the optimum scale for integrin clustering and focal contact formation, thereby reaffirming the importance of controlling the size of surface features in order to achieve predictable cellular outcomes.

It has been proposed that certain nanostructured surfaces are either (a) pro-integrin clustering enhancing FAK/ERK signaling and RhoA activity or (b) anti-integrin clustering disrupting the activation of RhoA, and consequently limiting the formation of stress fibers (reviewed in Chen *et al.* (8)). Since our nanoporous surface upregulates the expression of *integrin $\alpha 1$, $\alpha 5$, αV , and $\beta 1$* , it can be considered as pro-integrin clustering. Three mechanisms can be envisaged by which the nanotopography induces initial focal adhesion assembly: (1) physico-chemical clustering of integrin, (2) accumulation of the integrin binding molecules on the surface, and/or (3) changing the conformation and presentation of integrin binding molecules. Growing cells in the absence of serum proteins during the initial culture period when the focal adhesions are first established would certainly help in determining the contribution of physico-chemical cueing as opposed to molecular cueing.

There is a solid body of data indicating that disordered nanotopographies enhance cytoskeletal organization, cell area, and the number and size of the focal contacts compared to ordered or regular ones (13, 47). While treatment with a mixture of H₂SO₄ and H₂O₂ generates

nanoporous surfaces that do not exhibit any apparent lateral order (28), it induces a definite increase in the focal adhesion number and expression of genes associated with them. This contrasts with the study of Dalby *et al.* (20) showing that both ordered and randomly nanopitted polycarbonate substrates cause a reduction in the focal adhesion numbers. These discrepancies may reflect differences in the bulk materials properties, treatment modalities, physico-chemical surface characteristics, and cell types used. They also highlight the uniqueness of our nanoporous surface.

Dalby *et al.* (48) reported that cells use filopodia to interact with nano-islands. McNamara *et al.* (34) subsequently showed that cells employed fine membrane projections, ~40 nm in diameter, to detect surface features smaller than 15 nm and termed these “nanopodia”. This term has also been used to describe 100-300 nm thick, F-actin-poor extensions emanating from the membrane of endothelial and prostate tumor cells that firmly attach to the matrix and can extend more than 100 μm to sense the environment and mediate intercellular interactions (32, 33). Thus, the term nanopodia has been used to define quite different structures. We report here that MC3T3-E1 cells develop more filopodia on the nanoporous surface. One of the functions attributed to filopodia is sensing of the extracellular environment. In this study, we showed how filopodia are able to recognize topographical features and intimately anchor to the nanoporous substrate. The lateral surface of the filopodia adopts a morphology that suggests fluidity and is characterized by the formation of ultra-small nanoscale lateral protrusions with dimensions in the range of 10-15 nm. These nanoscale lateral protrusions extend along and mold the narrow walls of the nanopores, and are likely incited in response to the limited surface provided by the very thin walls of the nanoporosities. Structurally these ultra-small, nanoscale lateral protrusions are distinct from what has been described as nanopodia. These protrusions substantially increase contact area and the adhesion strength of filopodia. Together with the increase in focal adhesions, the abundance of filopodia and associated protrusions could contribute to strengthening the adhesive interaction of cells with the surface and thereby alter the nanoscale biomechanical relationships that trigger cellular cascades regulating cell activity.

The findings of gene expression show that nanotopography can have a significant influence in the regulation of integrins in MC3T3-E1. The mRNA levels of *integrin $\alpha 1$* , *$\alpha 5$* ,

αV , and $\beta 1$ were upregulated on the nanoporous surface compared to the control surface, likely reflecting an increase in the focal adhesion formation. Diverse studies have shown that nanoscale features affect cell behavior and integrin-mediated cell adhesion on diverse materials. For example, Yim *et al.* (7) observed a decreased expression of the *integrin subunits* $\alpha 2$, $\alpha 6$, αV , $\beta 2$, $\beta 3$, and $\beta 4$ from human mesenchymal stem cells (hMSCs) cultured on 350 nm gratings of tissue culture polystyrene (TCPS) and polydimethylsiloxane (PDMS) compared to non-patterned controls. The authors suggest that the integrin downregulation is predominantly a nanotopography-mediated phenomenon because these two substrates have vastly different mechanical properties. Interestingly, in the present work, gene expression of the $\alpha 1$ and $\beta 1$ *integrins* was equally much higher on the nanoporous surface, indicating that $\alpha 1\beta 1$ integrin signaling is implicated in the observed effects. Because fibrillar adhesions are rich in integrin $\alpha 5\beta 1$ (49), we can also correlate the greater tendency to form mature or fibrillar adhesions with its upregulation by MC3T-E1 cells.

The formation of focal adhesions is a highly complex process that requires the assembly of multiple proteins to link the cell cytoskeleton with the substrate (50). There was a particular upregulation of the *talin* gene on the nanoporous surface. This encoding protein plays a key structural role in regulating the nanoscale architecture of FAs (51) and the activity of the integrin family of cell adhesion proteins by coupling integrins to F-actin (52). We can hypothesize that our nanoporous surface promotes the formation of focal adhesions through $\alpha 1\beta 1$ -talin-actin linkage. The expression of *paxillin* was doubled on the nanoporous surface while that of *vinculin* was similar. These results are very similar to those reported by Lim *et al.* (39) for human fetal osteoblastic (hFOB) cells on 14 nm nanopit-textured poly(L-lactic acid) and polystyrene. The gene expression result obtained for *vinculin* is somewhat expected, given the similarity in immunofluorescence labeling on the nanoporous and control surfaces. This protein is present in several types of focal adhesions independently of their localization and size. Rac1 and Cdc42 proteins, members of the Rho-family of GTPases, are implicated in the formation of lamellipodia and filopodia (53, 54). Consistent with the abundant presence of filopodia when the cells sense the nanotextured surface, we have found a higher expression of the genes for these two proteins. *RhoA* and *ROCK1* were also upregulated consistent with their role in regulating stress fiber formation and proliferation (53). Different studies (55-57) have

shown that inhibition of ROCK1 plays a role in the reduction of mesenchymal stem cell growth and differentiation on nanotopographies. The upregulation of ROCK1 expression we have observed is, therefore, consistent with the increase in cell proliferation on the nanoporous surfaces.

3.6 Conclusion

The study and understanding of the mechanism by which cells interact and respond to different topographies and chemical compositions are crucial for the development of new materials. We have shown that reducing the oxidative chemical treatment time to generate a mono-planar nanoporous surface with a pore diameter of 20 ± 5 nm is effective at improving osteogenic cell proliferation and increasing the focal adhesions and expression of related genes. In addition, the abundance of filopodia with nanoscale lateral protrusions is likely to make a major contribution to the cell adhesion strength. These results illustrate that by simply controlling the physico-chemical of surfaces one can modulate cellular signaling. This may represent an advantageous alternative to the use of bioactive agents for guiding tissue repair/regeneration around implantable metals, thereby improving their tissue integration. The mono-planar surface will also make possible the nanoscale biomechanical evaluation of the contribution of filopodia to increasing the strength of cell adhesion on nanoporous titanium surfaces, opening the door to understanding how local cellular biomechanical environments guide cell activity.

Acknowledgments

We thank K. Ponce for expert technical assistance in RNA extractions. We would also like to thank the Ion Microscopy Innovation Center at Carl Zeiss Microscopy (Peabody, MA) for performing the high-resolution helium ion microscopy (HIM) images.

Funding sources

This work was supported by the Canadian Institute of Health Research (CIHR) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). D. Guadarrama Bello is the recipient of the Scholarship from the Réseau de Recherche en Santé Buccodentaire

et Osseuse (RSBO). A. Nanci holds a Canada Research Chair in Calcified Tissues, Biomaterials, and Structural Imaging.

3.7 References

1. Nguyen S, Webb H, Mahon P, Crawford R, Ivanova E. Natural Insect and Plant Micro-/Nanostructured Surfaces: An Excellent Selection of Valuable Templates with Superhydrophobic and Self-Cleaning Properties. *Molecules*. 2014;19(9):13614.
2. Mendes PM. Cellular nanotechnology: making biological interfaces smarter. *Chemical Society Reviews*. 2013;42(24):9207-18.
3. Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric Control of Cell Life and Death. *Science*. 1997;276(5317):1425-8.
4. Bagherifard S, Ghelichi R, Khademhosseini A, Guagliano M. Cell Response to Nanocrystallized Metallic Substrates Obtained through Severe Plastic Deformation. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2014;6(11):7963-85.
5. Bagherifard S, Hickey DJ, de Luca AC, Malheiro VN, Markaki AE, Guagliano M, et al. The influence of nanostructured features on bacterial adhesion and bone cell functions on severely shot peened 316L stainless steel. *Biomaterials*. 2015;73:185-97.
6. Seo CH, Furukawa K, Montagne K, Jeong H, Ushida T. The effect of substrate microtopography on focal adhesion maturation and actin organization via the RhoA/ROCK pathway. *Biomaterials*. 2011;32(36):9568-75.
7. Yim EKF, Darling EM, Kulangara K, Guilak F, Leong KW. Nanotopography-induced changes in focal adhesions, cytoskeletal organization, and mechanical properties of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2010;31(6):1299-306.
8. Chen W, Shao Y, Li X, Zhao G, Fu J. Nanotopographical Surfaces for Stem Cell Fate Control: Engineering Mechanobiology from the Bottom. *Nano Today*. 2014;9(6):759-84.
9. Dalby MJ, Gadegaard N, Oreffo ROC. Harnessing nanotopography and integrin-matrix interactions to influence stem cell fate. *Nature Materials*. 2014;13(6):558-69.

10. Rosa AL, Kato RB, Castro Raucci LMS, Teixeira LN, de Oliveira FS, Bellesini LS, et al. Nanotopography Drives Stem Cell Fate Toward Osteoblast Differentiation Through $\alpha 1\beta 1$ Integrin Signaling Pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2014;115(3):540-8.
11. DeMali KA, Wennerberg K, Burridge K. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*. 2003;15(5):572-82.
12. Hoffmann B, Schäfer C. Filopodial focal complexes direct adhesion and force generation towards filopodia outgrowth. *Cell Adhesion & Migration*. 2010;4(2):190-3.
13. Gallagher JO, McGhee KF, Wilkinson CDW, Riehle MO. Interaction of animal cells with ordered nanotopography. *IEEE Transactions on NanoBioscience*. 2002;1(1):24-8.
14. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature Review Molecular Cell Biology*. 2008;9(6):446-54.
15. Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2004;1692(2-3):103-19.
16. Sista S, Wen C, Hodgson PD, Pande G. Expression of cell adhesion and differentiation related genes in MC3T3 osteoblasts plated on titanium alloys: role of surface properties. *Materials Science and Engineering: C*. 2013;33(3):1573-82.
17. Zaidel-Bar R, Ballestrem C, Kam Z, Geiger B. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *Journal of Cell Science*. 2003;116(22):4605-13.
18. Geiger B, Bershadsky A. Exploring the Neighborhood. *Cell*. 2002;110(2):139-42.
19. Case LB, Baird MA, Shtengel G, Campbell SL, Hess HF, Davidson MW, et al. Molecular mechanism of vinculin activation and nano-scale spatial organization in focal adhesions. *Nature Cell Biology*. 2015;17(7):880-92.
20. Biggs MJP, Richards RG, Gadegaard N, Wilkinson CDW, Dalby MJ. The effects of nanoscale pits on primary human osteoblast adhesion formation and cellular spreading. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2007;18(2):399-404.

21. Owen GR, Meredith D, Ap Gwynn I, Richards R. Focal adhesion quantification-a new assay of material biocompatibility? Review. *European cells & materials*. 2005;9:85-96; discussion 85-96.
22. Kim HS, Kim YJ, Jang JH, Park JW. Surface Engineering of Nanostructured Titanium Implants with Bioactive Ions. *Journal of Dental Research*. 2016;95(5):558-65.
23. Tsimbouri P, Gadegaard N, Burgess K, White K, Reynolds P, Herzyk P, et al. Nanotopographical Effects on Mesenchymal Stem Cell Morphology and Phenotype. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2014;115(2):380-90.
24. Tambasco de Oliveira P, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials*. 2004;25(3):403-13.
25. Yi J-H, Bernard C, Variola F, Zalzal SF, Wuest JD, Rosei F, et al. Characterization of a bioactive nanotextured surface created by controlled chemical oxidation of titanium. *Surface Science*. 2006;600(19):4613-21.
26. Richert L, Vetrone F, Yi J-H, Zalzal SF, Wuest JD, Rosei F, et al. Surface Nanopatterning to Control Cell Growth. *Advanced Materials*. 2008;20(8):1488-92.
27. Variola F, Lauria A, Nanci A, Rosei F. Influence of Treatment Conditions on the Chemical Oxidative Activity of H₂SO₄/H₂O₂ Mixtures for Modulating the Topography of Titanium. *Advanced Engineering Materials*. 2009;11(12):B227-B34.
28. Vetrone F, Variola F, Tambasco de Oliveira P, Zalzal SF, Yi J-H, Sam J, et al. Nanoscale Oxidative Patterning of Metallic Surfaces to Modulate Cell Activity and Fate. *Nano Letters*. 2009;9(2):659-65.
29. de Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007;80A(3):554-64.
30. Tavares MG, Tambasco de Oliveira P, Nanci A, Hawthorne AC, Rosa AL, Xavier SP. Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H₂SO₄/H₂O₂ enhances contact osteogenesis. *Clinical Oral Implants Research*. 2007;18(4):452-8.

31. Variola F, Zalzal SF, Leduc A, Barbeau J, Nanci A. Oxidative nanopatterning of titanium generates mesoporous surfaces with antimicrobial properties. *International Journal of Nanomedicine*. 2014;9:2319-25.
32. Zukauskas A, Merley A, Li D, Ang L-H, Sciuto TE, Salman S, et al. TM4SF1: a tetraspanin-like protein necessary for nanopodia formation and endothelial cell migration. *Angiogenesis*. 2011;14(3):345-54.
33. Lin C-I, Lau C-Y, Li D, Jaminet S-C. Nanopodia – thin, fragile membrane projections with roles in cell movement and intercellular interactions. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2014(86):10.3791/51320.
34. McNamara LE, Sjöström T, Seunarine K, Meek RMD, Su B, Dalby MJ. Investigation of the limits of nanoscale filopodial interactions. *Journal of Tissue Engineering*. 2014;5.
35. Horzum U, Ozdil B, Pesen-Okvur D. Step-by-step quantitative analysis of focal adhesions. *MethodsX*. 2014;1:56-9.
36. Cora-Cruz JJ, Difffoot-Carlo N, Sundaram PA. Vinculin expression in MC3T3-E1 cells in response to mechanical stimulus. *Data in Brief*. 2016;6:94-100.
37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
38. Schwarz US, Gardel ML. United we stand – integrating the actin cytoskeleton and cell–matrix adhesions in cellular mechanotransduction. *Journal of Cell Science*. 2012;125(13):3051-60.
39. Lim JY, Dreiss AD, Zhou Z, Hansen JC, Siedlecki CA, Hengstebeck RW, et al. The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography. *Biomaterials*. 2007;28(10):1787-97.
40. Milner KR, Siedlecki CA. Submicron poly(L-lactic acid) pillars affect fibroblast adhesion and proliferation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007;82A(1):80-91.
41. Yang J, McNamara LE, Gadegaard N, Alakpa EV, Burgess KV, Meek RMD, et al. Nanotopographical Induction of Osteogenesis through Adhesion, Bone Morphogenic Protein Cosignaling, and Regulation of MicroRNAs. *ACS Nano*. 2014;8(10):9941-53.

42. Diener A, Nebe B, Lüthen F, Becker P, Beck U, Neumann HG, et al. Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics. *Biomaterials*. 2005;26(4):383-92.
43. Lamers E, Horssen R, Riet J, Delft F, Lutttge R, Walboomers X, et al. The influence of nanoscale topographical cues on initial osteoblast morphology and migration. *European Cells & Materials*. 2010;20:329-43.
44. Sun Y-S, Liu J-F, Wu C-P, Huang H-H. Nanoporous surface topography enhances bone cell differentiation on Ti-6Al-7Nb alloy in bone implant applications. *Journal of Alloys and Compounds*. 2015;643, Supplement 1:S124-S32.
45. Kuhlman W, Taniguchi I, Griffith LG, Mayes AM. Interplay Between PEO Tether Length and Ligand Spacing Governs Cell Spreading on RGD-Modified PMMA-g-PEO Comb Copolymers. *Biomacromolecules*. 2007;8(10):3206-13.
46. Park J, Bauer S, von der Mark K, Schmuki P. Nanosize and Vitality: TiO₂ Nanotube Diameter Directs Cell Fate. *Nano Letters*. 2007;7(6):1686-91.
47. Curtis ASG, Casey B, Gallagher JO, Pasqui D, Wood MA, Wilkinson CDW. Substratum nanotopography and the adhesion of biological cells. Are symmetry or regularity of nanotopography important? *Biophysical Chemistry*. 2001;94(3):275-83.
48. Dalby MJ, Riehle MO, Johnstone H, Affrossman S, Curtis ASG. Investigating the limits of filopodial sensing: a brief report using SEM to image the interaction between 10 nm high nano-topography and fibroblast filopodia. *Cell Biology International*. 2004;28(3):229-36.
49. Heydarkhan-Hagvall S, Choi C-H, Dunn J, Heydarkhan S, Schenke-Layland K, MacLellan WR, et al. Influence of Systematically Varied Nano-Scale Topography on Cell Morphology and Adhesion. *Cell Communication & Adhesion*. 2007;14(5):181-94.
50. Yang L, Liu H, Lin Y. Biomaterial nanotopography-mediated cell responses: experiment and modeling. *International Journal of Smart and Nano Materials*. 2014;5(4):227-56.
51. Liu J, Wang Y, Goh WI, Goh H, Baird MA, Ruehland S, et al. Talin determines the nanoscale architecture of focal adhesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(35):E4864-E73.

52. Critchley DR. Cytoskeletal proteins talin and vinculin in integrin-mediated adhesion. *Biochemical Society Transactions*. 2004;32(5):831-6.
53. Nobes CD, Hall A. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 1995;81(1):53-62.
54. Myers JP, Robles E, Ducharme-Smith A, Gomez TM. Focal adhesion kinase modulates Cdc42 activity downstream of positive and negative axon guidance cues. *Journal of Cell Science*. 2012;125(12):2918-29.
55. McMurray RJ, Gadegaard N, Tsimbouri PM, Burgess KV, McNamara LE, Tare R, et al. Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. *Nature Materials*. 2011;10(8):637-44.
56. Tsimbouri PM, McMurray RJ, Burgess KV, Alakpa EV, Reynolds PM, Murawski K, et al. Using Nanotopography and Metabolomics to Identify Biochemical Effectors of Multipotency. *ACS Nano*. 2012;6(11):10239-49.
57. Schmitz AAP, Govek E-E, Böttner B, Van Aelst L. Rho GTPases: Signaling, Migration, and Invasion. *Experimental Cell Research*. 2000;261(1):1-12.

3.8 Mesures de Force d'Adhésion. Résultats Préliminaires

L'étude du comportement biomécanique des cellules directement en contact avec les surfaces des biomatériaux est d'une importance cruciale. Certaines fonctions biologiques chez les cellules eucaryotes, telles que la migration, la différenciation, la prolifération cellulaire et la minéralisation, dépendent de l'interaction cellulaire avec la surface en terme de fixation, d'adhésion et de propagation de la cellule. Plus précisément, ces processus dépendent grandement de la structure du cytosquelette et de sa réponse à la matrice extracellulaire environnante (55).

La microscopie à force atomique a été utilisée pour caractériser les propriétés biomécaniques des cellules sur différents substrats (56, 57). Une meilleure compréhension de l'interaction entre les filopodes et les caractéristiques de la surface à l'échelle nanométrique est très pertinente pour la préparation des surfaces nanotopographiques capables de stimuler l'activité cellulaire.

Pour quantifier la force nécessaire pour détacher latéralement un filopode d'une surface avec une pointe d'AFM, nous pouvons établir une relation entre la déflexion de la pointe, mesurée en volts, et la force appliquée pour chaque échantillon. Si la déflexion de la pointe augmente, la force appliquée sera plus grande. Dans la Figure 16, nous pouvons observer comment une déflexion de 8 V est capable de détacher un filopode de la surface polie (Figure 16A, B). La même déflexion n'a pas réussi à détacher le filopode de la surface nanoporeuse (Figure 16C, D).

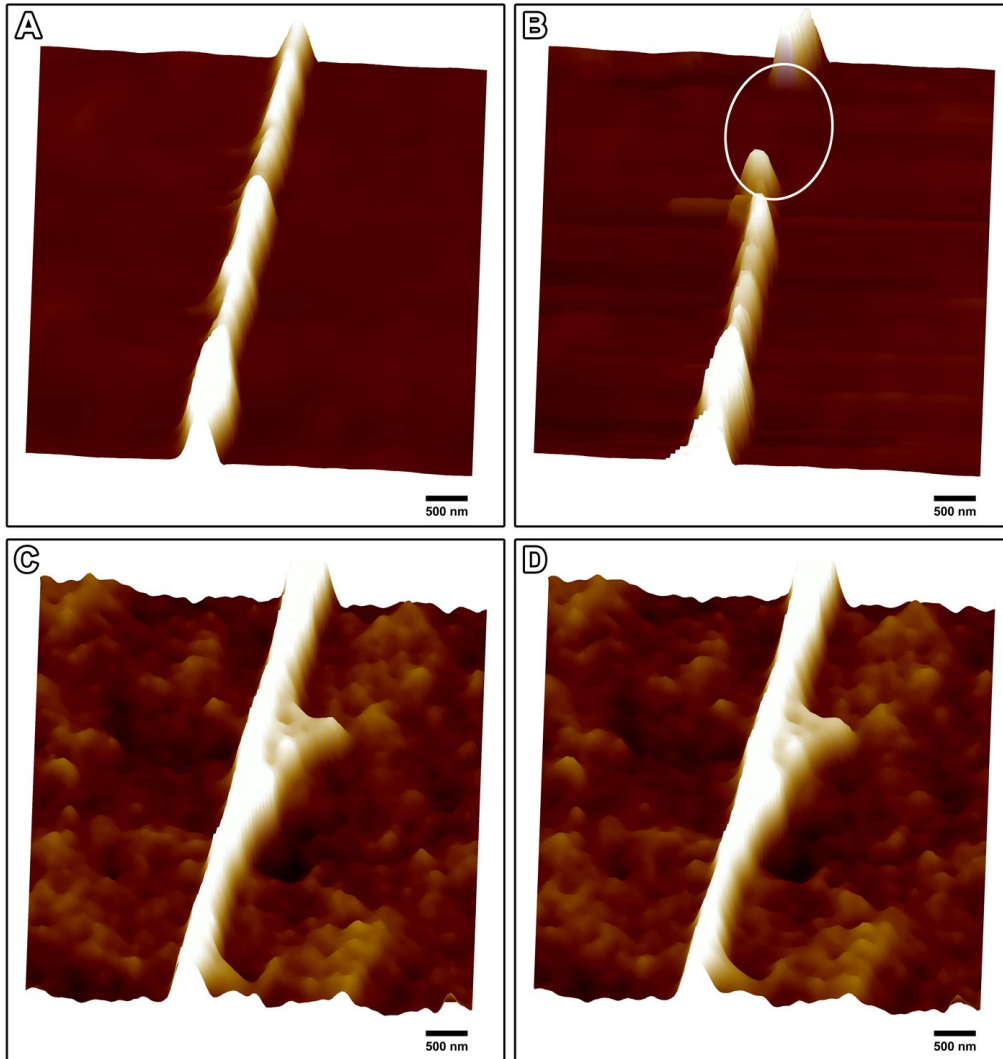


Figure 16. Images AFM des filopodes sur la surface polie (A et B) et la surface nanoporeuse (C et D) scannée avec une déflexion de la pointe de 6V (A et C) et avec une déflexion de 8V (B et D). Dans la figure B, le cercle représente le déplacement du filopode.

Le fait qu'une force plus élevée est nécessaire pour déplacer un filopode sur la surface de titane nanoporeuse indique que les filopodes sur cette surface présentent une adhérence globale plus élevée. Ce différentiel d'adhérence résulte fort probablement des fines protrusions membranaires latérales que les filopodes développent en réponse notre surface nanoporeuse (voir la section précédente).

Chapitre 4 – Conclusions et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons pu montrer comment une surface de titane créée par un traitement d'oxydation chimique simple, dans un temps plus court que précédemment rapporté, est capable de moduler la croissance et l'activité des cellules ostéogéniques MC3T3-E1. Le traitement avec un mélange d'acide sulfurique et de peroxyde d'hydrogène utilisé dans cette étude entraîne la formation d'un réseau tri-dimensionnel unique de nanopores à la surface de titane ayant une taille moyenne de 20 ± 5 nm. L'effet obtenu sur les cellules suggère que la taille des pores est un facteur prépondérant dans la détermination de la réponse cellulaire et est consistant avec ce qui a été rapporté sur d'autres types de surface.

Différentes théories ont été présentées dans la littérature pour expliquer l'influence de la nanotopographie dans la formation des adhésions focales par le regroupement des intégrines. Nos résultats montrent la formation de plus d'adhésions focales sur la surface nanoporeuse par rapport à la surface contrôle ainsi qu'une tendance plus grande à former des adhérences matures. Ceci suggère que la topographie obtenue favorise la formation du regroupement des intégrines, réaffirmant ainsi l'importance de contrôler la taille et les caractéristiques de la surface afin d'obtenir des résultats cellulaires prévisibles.

Les protrusions latérales de dimension nanométrique émises par les filopodes et qui moulent les parois étroites des nanopores, ainsi que l'augmentation des adhésions focales augmentent l'aire de contact avec la surface et la force d'interaction. Ceci pourrait effectivement jouer un rôle biomécanique important à l'échelle nanométrique susceptible de déclencher des cascades de signalisation régulant l'activité cellulaire. Ces protrusions latérales ultra-petites sont distinctes de ce qui a été décrit précédemment dans la littérature et pourraient constituer un nouveau mécanisme d'adhésion.

Malgré que diverses études aient investigué les effets de la topographie sur l'adhésion cellulaire, très peu concernent le rôle des filopodes. Ici, nous montrons que les filopodes émis par des cellules ostéoblastiques peuvent percevoir la surface nanoporeuse pour développer localement des interactions biomécaniques "plus rigides" avec le substrat, tel que suggéré par nos analyses de force en AFM. Il peut être extrapolé donc que la résistance accrue des filopodes peut contribuer à orchestrer la voie ostéogénique des cellules sur les biomatériaux.

Les résultats de l'expression génique montrent que la nanotopographie peut avoir une influence significative dans la régulation de certaines intégrines, telles que $\alpha 5\beta 1$, impliquées dans la formation des adhésions focales matures. Nous pouvons aussi émettre l'hypothèse que notre surface nanoporeuse favorise la signalisation cellulaire et la formation des adhésions focales par liaison $\alpha 1\beta 1$ -talin-actine avec le recrutement d'autres protéines.

Les résultats obtenus au cours de ce travail suggèrent que l'environnement biomécanique pourrait être exploité pour réguler l'activité cellulaire sans recourir à des agents bioactifs auxquels le corps réagit de façon différente selon l'état de santé et l'âge des patients.

Perspectives

À partir des connaissances acquises vis à vis l'influence des surfaces de titane à l'échelle nanométrique dans le comportement cellulaire, et plus spécifiquement sur la formation de filopodes et leurs petites protrusions membranaires latérales, le but des travaux futurs sera d'obtenir une compréhension plus profonde de la biomécanique cellulaire. Nous voulons faire une évaluation approfondie de la contribution des filopodes et leurs protrusions à l'augmentation de la force de l'adhésion cellulaire pour mieux comprendre comment les environnements biomécaniques locaux à l'échelle nanométrique guident l'activité cellulaire.

Les forces d'interactions des prolongements avec des surfaces nanostructurées et polies seront quantifiées en mesurant la force latérale nécessaire pour arracher ces structures de la surface avec une pointe AFM. Suite à l'analyse du matériel fixé, nous évaluerons les propriétés nanomécaniques sur des échantillons avec des cellules vivantes en culture. De plus, la technique de «*Peakforce Tapping*» sera utilisée pour caractériser les propriétés nanomécaniques des cellules et de leurs prolongements: module de Young, déformation élastique et dissipation.

Pour avoir une étendue plus large des résultats obtenus, nous allons exploiter le nanopatterning oxydatif et l'anodisation électrochimique sur d'autres métaux à intérêt médical comme l'acier inoxydable. De la même façon, le comportement d'autres lignées cellulaires telles les fibroblastes, les cellules ostéoblastiques UMR106 primaires, et les cellules souches seront analysées. L'ensemble des résultats obtenus nous permettra de pouvoir exploiter les

propriétés physico-chimiques des surfaces des biomatériaux afin de guider la réparation/régénération des tissus entourant l'implant, et ce sans l'ajout d'agents biologiques.

Bibliographie

1. Lim JY, Dreiss AD, Zhou Z, Hansen JC, Siedlecki CA, Hengstebeck RW, et al. The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography. *Biomaterials*. 2007;28(10):1787-97.
2. Milner KR, Siedlecki CA. Submicron poly(L-lactic acid) pillars affect fibroblast adhesion and proliferation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007;82A(1):80-91.
3. Park J, Bauer S, von der Mark K, Schmuki P. Nanosize and Vitality: TiO₂ Nanotube Diameter Directs Cell Fate. *Nano Letters*. 2007;7(6):1686-91.
4. Lamers E, Horssen R, Riet J, Delft F, Lutge R, Walboomers X, et al. The influence of nanoscale topographical cues on initial osteoblast morphology and migration. *European Cells & Materials*. 2010;20:329-43.
5. Chen W, Shao Y, Li X, Zhao G, Fu J. Nanotopographical Surfaces for Stem Cell Fate Control: Engineering Mechanobiology from the Bottom. *Nano Today*. 2014;9(6):759-84.
6. Tambasco de Oliveira P, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials*. 2004;25(3):403-13.
7. Yi J-H, Bernard C, Variola F, Zalzal SF, Wuest JD, Rosei F, et al. Characterization of a bioactive nanotextured surface created by controlled chemical oxidation of titanium. *Surface Science*. 2006;600(19):4613-21.
8. Brånemark PI HB, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery. Supplementum*. 1977;16:1-132.
9. PI. B. Osseointegration and its experimental background. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 1983;50(3):399-410.

10. Brånemark R BP, Rydevik B, Myers RR. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. *Journal of Rehabilitation Research and Development*. 2001;38(2):175-81.
11. Raghavendra S WM, Taylor TD. Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature. *International Journal Oral Maxillofacial Implants*. 2005;20(3):425-31.
12. Mavrogenis AF DR, Parvizi J, Babis GC. Biology of implant osseointegration. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*. 2009;9(2):61-71.
13. Wall I, Donos N, Carlqvist K, Jones F, Brett P. Modified titanium surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro. *Bone* 2009;45:17-26.
14. Yamamoto O, Alvarez K, Kikuchi T, Fukuda M. Fabrication and characterization of oxygen-diffused titanium for biomedical applications. *Acta Biomaterialia* 2009;5:3605-15.
15. Bádenas AC. Tratamientos de superficie sobre titanio comercialmente puro para la mejora de la osteointegración de los implantes dentales. PhD Thesis, Universitat Politècnica de Catalunya, 2005. <http://www.tdx.cat/handle/10803/6044> (Accès le 10 Jan, 2017)
16. Aksakal B, Hanyaloglu C. Bioceramic dip-coating on Ti-6Al-4V and 316L SS implant materials. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2008;19(5):2097-104.
17. Fleck C, Eifler D. Corrosion, fatigue and corrosion fatigue behaviour of metal implant materials, especially titanium alloys. *International Journal of Fatigue*. 2010;32(6):929-35.
18. Lee SY, Piao CM, Koak JY, Kim SK, Kim YS, Ku Y, et al. A 3-year prospective radiographic evaluation of marginal bone level around different implant systems. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2010;37(7):538-44.
19. Boon Sing Ng, Annergren I, Soutar AM, Khor KA, Jarfors AEW. Characterisation of a duplex TiO₂/CaP coating on Ti6Al4V for hard tissue replacement. *Biomaterials*. 2005;26(10):1087-95.

20. Xuanyong Liua PKC, Chuanxian Ding. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering R* 2004;47 49-121.
21. 67-00 NAF. Standard Specification for Unalloyed Titanium for Surgical Implant Applications. 2002.
22. Leonhardt Å, Dahlén G. Effect of titanium on selected oral bacterial species in vitro. *European Journal of Oral Sciences*. 1995;103(6):382-7.
23. Mendonça G, Mendonça DBS, Aragão FJL, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology – From micron- to nanotopography. *Biomaterials*. 2008;29(28):3822-35.
24. L. Luo ZYJ, D. B. Wei, X. F. He. Surface Modification of Titanium and its Alloys for Biomedical Application. *Advanced Materials Research*. 2014;887-888:1115-20.
25. Soncini M, Rodriguez y Baena R, Pietrabissa R, Quaglini V, Rizzo S, Zaffe D. Experimental procedure for the evaluation of the mechanical properties of the bone surrounding dental implants. *Biomaterials*. 2002;23(1):9-17.
26. Liu X, Chu PK, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2004;47(3–4):49-121.
27. Faure J, Balamurugan A, Benhayoune H, Torres P, Balossier G, Ferreira JMF. Morphological and chemical characterisation of biomimetic bone like apatite formation on alkali treated Ti6Al4V titanium alloy. *Materials Science and Engineering: C*. 2009;29(4):1252-7.
28. Park J-H, Lee D-Y, Oh K-T, Lee Y-K, Kim K-M, Kim K-N. Bioactivity of calcium phosphate coatings prepared by electrodeposition in a modified simulated body fluid. *Materials Letters*. 2006;60(21–22):2573-7.
29. Pereira BL, Tummler P, Marino CEB, Soares PC, Kuromoto NK. Titanium bioactivity surfaces obtained by chemical/electrochemical treatments. *Matéria (Rio de Janeiro)*. 2014;19:16-23.

30. Wu J-M, Hayakawa S, Tsuru K, Osaka A. Porous titania films prepared from interactions of titanium with hydrogen peroxide solution. *Scripta Materialia*. 2002;46(1):101-6.
31. Chen Y, Zheng X, Ji H, Ding C. Effect of Ti–OH formation on bioactivity of vacuum plasma sprayed titanium coating after chemical treatment. *Surface and Coatings Technology*. 2007;202(3):494-8.
32. Reimer L. *Scanning Electron Microscopy*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1998. 529 p.
33. Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*. 1986;56(9):930-3.
34. Haugstad G. Overview of AFM. *Atomic Force Microscopy*: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. p. 1-32.
35. S n chal A, Carrigan SD, Tabrizian M. Probing Surface Adhesion Forces of *Enterococcus faecalis* to Medical-Grade Polymers Using Atomic Force Microscopy. *Langmuir*. 2004;20(10):4172-7.
36. Sista S, Wen C, Hodgson PD, Pande G. Expression of cell adhesion and differentiation related genes in MC3T3 osteoblasts plated on titanium alloys: role of surface properties. *Materials Science and Engineering: C*. 2013;33(3):1573-82.
37. Yim EKF, Darling EM, Kulangara K, Guilak F, Leong KW. Nanotopography-induced changes in focal adhesions, cytoskeletal organization, and mechanical properties of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2010;31(6):1299-306.
38. Dalby MJ, Gadegaard N, Oreffo ROC. Harnessing nanotopography and integrin-matrix interactions to influence stem cell fate. *Nature Materials*. 2014;13(6):558-69.
39. Dalby MJ, Riehle MO, Sutherland DS, Agheli H, Curtis ASG. Use of nanotopography to study mechanotransduction in fibroblasts – methods and perspectives. *European Journal of Cell Biology*. 2004;83(4):159-69.
40. Hoffmann B, Schäfer C. Filopodial focal complexes direct adhesion and force generation towards filopodia outgrowth. *Cell Adhesion & Migration*. 2010;4(2):190-3.

41. DeMali KA, Wennerberg K, Burridge K. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*. 2003;15(5):572-82.
42. Gallagher JO, McGhee KF, Wilkinson CDW, Riehle MO. Interaction of animal cells with ordered nanotopography. *IEEE Transactions on NanoBioscience*. 2002;1(1):24-8.
43. Albuschies J, Vogel V. The role of filopodia in the recognition of nanotopographies. *Scientific Reports*. 2013;3:1658.
44. Sandmann R, Köster S. Topographic Cues Reveal Two Distinct Spreading Mechanisms in Blood Platelets. *Scientific Reports*. 2016;6:22357.
45. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(6):446-54.
46. S Lavenus MB, V Trichet, P Pilet, G Louarn, P Layrolle. Adhesion and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on titanium nanopores. *European Cell Materials*. 2011;22:84-96.
47. Sjöström T, Dalby MJ, Hart A, Tare R, Oreffo ROC, Su B. Fabrication of pillar-like titania nanostructures on titanium and their interactions with human skeletal stem cells. *Acta Biomaterialia*. 2009;5(5):1433-41.
48. Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2004;1692(2-3):103-19.
49. Stages in focal adhesion formation: MBInfo contributors; [Available from: <http://mbinfo.mbi.nus.edu.sg/figure/1384243256120/>]. (Accès le 21 Jan, 2017)
50. Focal Adhesion organization: MBInfo contributors; [Available from: <http://mbinfo.mbi.nus.edu.sg/figure/1384243372096/>]. (Accès le 21 Jan, 2017)
51. Tsimbouri P, Gadegaard N, Burgess K, White K, Reynolds P, Herzyk P, et al. Nanotopographical Effects on Mesenchymal Stem Cell Morphology and Phenotype. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2014;115(2):380-90.

52. Kim HS, Kim YJ, Jang JH, Park JW. Surface Engineering of Nanostructured Titanium Implants with Bioactive Ions. *Journal of Dental Research*. 2016;95(5):558-65.
53. Huang J, Gräter SV, Corbellini F, Rinck S, Bock E, Kemkemer R, et al. Impact of Order and Disorder in RGD Nanopatterns on Cell Adhesion. *Nano Letters*. 2009;9(3):1111-6.
54. Takebe J, Miyata K, Miura S, Ito S. Effects of the nanotopographic surface structure of commercially pure titanium following anodization–hydrothermal treatment on gene expression and adhesion in gingival epithelial cells. *Materials Science and Engineering: C*. 2014;42:273-9.
55. Beliveau A, Thomas G, Gong J, Wen Q, Jain A. Aligned Nanotopography Promotes a Migratory State in Glioblastoma Multiforme Tumor Cells. *Scientific Reports*. 2016;6:26143.
56. Zhang T, Chao Y, Shih K, Li X-Y, Fang HHP. Quantification of the lateral detachment force for bacterial cells using atomic force microscope and centrifugation. *Ultramicroscopy*. 2011;111(2):131-9.
57. Deupree SM, Schoenfish MH. Quantitative Method for Determining the Lateral Strength of Bacterial Adhesion and Application for Characterizing Adhesion Kinetics. *Langmuir*. 2008;24(9):4700-7.

Annexes

Annexe 1. Technique utilisée pour les mesures préliminaires de force d'adhésion.

Pour l'analyse de la force d'adhésion des filopodes sur la surface contrôlée et nanostructurée, les cellules cultivées pendant 24 h ont été fixées et imagées en mode contact avec une pointe DNP-S-A, ayant un cantilever de nitrure de silicium et une pointe pyramidale avec une constante de force de 0.35 N/m. Les filopodes ayant une longueur d'au moins 5 μm , une largeur de 300-600 nm et une hauteur d'au moins 50 nm sont identifiés. Les filopodes choisis ont été distancés d'autres structures (par exemple, d'autres filopodes ou corps cellulaire) d'un minimum de 5 μm pour éviter les perturbations pendant les mesures. La direction de balayage a été $\pm 90^\circ$ entre la position de la pointe et le filopode.

Pour les mesures de force, la pointe AFM a été balayée à travers le filopode en débutant par une déflexion de la pointe minimal (Figure 17A). Le filopode a été scanné plusieurs fois en augmentant la déflexion de la pointe pour en arriver à une force capable d'arracher le filopode (Figure 17B,C).

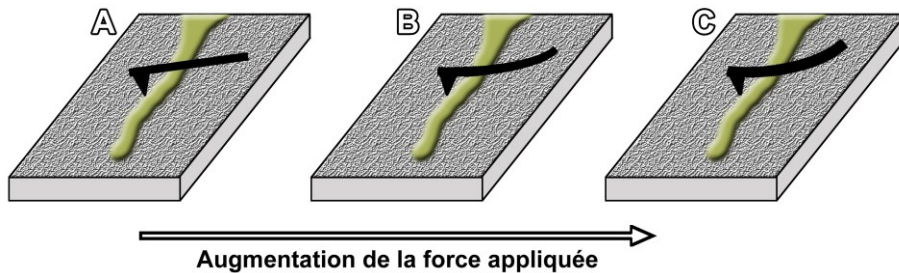


Figure 17. Représentation de la technique utilisée pour les mesures des forces. A, B et C représentent l'augmentation de la déflexion de la pointe AFM.