POLYPUBLIE
Polytechnique Montréal

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL
UNIVERSITÉ D'INGÉNIERIE

Titre: Title:	Immobilisation orientée du facteur de croissance de l'épiderme à des fins d'application en ingénierie tissulaire
Auteur: Author:	Cyril Boucher
Date:	2010
Type:	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis
Référence: Citation:	Boucher, C. (2010). Immobilisation orientée du facteur de croissance de l'épiderme à des fins d'application en ingénierie tissulaire [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/259/

Document en libre accès dans PolyPublie
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: PolyPublie URL:	https://publications.polymtl.ca/259/
Directeurs de recherche: Advisors:	Gregory De Crescenzo, Mario Jolicoeur, & Yves Durocher
Programme: Program:	Génie chimique

Ce fichier a été téléchargé à partir de PolyPublie, le dépôt institutionnel de Polytechnique Montréal
This file has been downloaded from PolyPublie, the institutional repository of Polytechnique Montréal

https://publications.polymtl.ca

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

IMMOBILISATION ORIENTÉE DU FACTEUR DE CROISSANCE DE L'ÉPIDERME À DES FINS D'APPLICATION EN INGÉNIERIE TISSULAIRE

CYRIL BOUCHER

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D)

(GÉNIE CHIMIQUE)

AVRIL 2010

© Cyril Boucher, 2010.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse est intitulée :

IMMOBILISATION ORIENTÉE DU FACTEUR DE CROISSANCE DE L'ÉPIDERME À DES FINS D'APPLICATION EN INGÉNIERIE TISSULAIRE

présentée par : BOUCHER Cyril

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. HENRY Olivier, Ph. D., président

M. DE CRESCENZO Grégory, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. DUROCHER Yves, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

Mme HOEMANN Caroline, Ph.D., membre

Mme FAUCHEUX Nathalie, Doct., membre

DÉDICACE

« Tout ce que je sais, c'est que je ne sais rien...»

Socrate

À Joël,

À Annie, qui nous manque énormément…

À Enrica

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mon directeur de recherche, Grégory De Crescenzo, sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui, ses encouragements constants pendant la thèse comme à l'heure actuelle sont toujours d'un précieux réconfort. Sa supervision bienveillante, sa rigueur et son expertise m'ont permis de mener à bien ce projet d'envergure que représente un doctorat. Travailler avec lui fut un réel plaisir et j'ose espérer que, quoi qu'il advienne, que cela se reproduira dans l'avenir.

Je voudrais également remercier mes co-directeurs Yves Durocher et Mario Jolicoeur pour leur soutien, leur disponibilité, leur aide et la latitude qu'ils ont pu me laisser dans la réalisation de ce projet. Leur expertise sur la production de protéines et le métabolisme ont toujours donné lieu à des discussions passionnantes qui m'ont permises d'apprendre énormément.

Je tiens à remercier très chaleureusement les différentes personnes qui sont intervenues de près ou de loin dans le cadre de ce projet ainsi que les différents collaborateurs que j'ai pu avoir et plus particulièrement Gilles St-Laurent, Martin Loignon, Benoit Liberelle, Juan-Carlos Ruiz, Marc Thibault, les Profs. Michael D. Buschmann et Michael R. Wertheimer.

Merci aussi à tous les autres étudiants, techniciens et associés de recherche de mes deux laboratoires (Poly et IRB) pour la bonne ambiance dans laquelle j'ai pu travailler pendant ces quatre années et demie.

Le doctorat est également une aventure humaine qui m'a permis de rencontrer des personnes formidables avec qui de forts liens ont pu être tissés. Merci en particuliers à Aline,

Anne, Antoine, Éric, Gilles, Marisha, Martin, Massi, Natalie et Virginie pour m'avoir encouragé lorsque j'en avais besoin.

Pour terminer, je voudrais remercier les trois personnes les plus importantes à mes yeux sans qui rien de tout cela n'aurait été possible à savoir, mon père, Joël, pour sa présence et pour m'avoir appris à définir mes priorités et à relativiser quand cela est nécessaire, ma mère, Annie, qui depuis qu'elle nous a quittés a laissé un vide qui ne pourra être comblé… Merci à elle pour avoir toujours été là quand j'en avais besoin quel que soit le moment. Enfin, merci à Enrica pour ses encouragements, pour avoir été là dans les moments difficiles… et tout simplement, merci à elle pour son amour.

RÉSUMÉ

Les implants générés par bio-ingénierie offrent des perspectives prometteuses en médecine régénératrice grâce, entre autre, au développement de supports mieux adaptés à la promotion de la régénération tissulaire. Plusieurs groupes de recherche ont d'ailleurs développé des techniques permettant d'immobiliser de manière non-orientée des protéines afin de promouvoir l'adhésion et la croissance cellulaire. Bien que des réponses cellulaires aient pu être observées, ces stratégies de couplage ne sont pas optimales en raison de la création de surfaces hétérogènes et de l'altération, dans de nombreux cas, de l'activité biologique des protéines ainsi greffées. Ces méthodes de fixation ont donc rapidement été remplacées par des stratégies favorisant le greffage orienté de protéines. Pour ce faire, il est nécessaire de leur adjoindre une étiquette (Fc ou polyhistidine), puis de faire interagir ces chimères avec un support adéquatement traité (protéines A/G ou ions métalliques).

Récemment, une nouvelle approche basée sur l'interaction existant entre deux peptides, dénommés E coil et K coil, a été rapportée. Ces peptides synthétiques possèdent une forte affinité et une haute spécificité l'un pour l'autre et ont déjà été utilisés dans diverses applications en génie biomédical ou en biotechnologie (purification ou capture de protéines à la surface de biocapteurs). Ce système peptidique pourrait également être utilisé afin de permettre l'immobilisation orientée de protéines telles que des facteurs de croissance. Les protéines devront alors être étiquetées avec un peptide coil tandis que le support choisi devra présenter le peptide coil complémentaire préalablement greffé. Après une simple incubation, les protéines devraient

être capables de se fixer de manière orientée à la surface du matériau via l'interaction coiled-coil ayant lieu entre les deux peptides.

Dans le cadre de ce travail, nous avons sélectionné le facteur de croissance de l'épiderme (EGF) comme protéine d'intérêt, puisqu'il est connu pour avoir un rôle majeur dans la prolifération et la migration de nombreux types cellulaires (kératinocytes, cellules épithéliales…) durant le mécanisme de réparation des blessures. Ce facteur de croissance a tout d'abord été produit en tant que protéine de fusion à laquelle le coil E ou K a été adjoint en position N-terminale. A des fins de comparaison, d'autres protéines chimères ont été utilisées. Il a été choisi d'adjoindre la portion Fc de l'immunoglobuline G à EGF étant donné que l'immobilisation de EGF-Fc avait déjà été rapportée via son interaction avec la protéine G. Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de la nature et de la position des étiquettes sur l'activité biologique de EGF dans un travail qui a été publié en 2008 dans *Tissue Engineering part A*. Les différentes constructions codant pour EGF ont été exprimées transitoirement à partir de cellules humaines embryonnaires de rein (HEK 293) et purifiées par chromatographie d'affinité. La bioactivité de ces protéines a ensuite été évaluée et l'étude a permis de démontrer que la localisation de l'étiquette joue un rôle majeur sur la bioactivité des protéines: par exemple, EGF-Fc est actif alors que le Fc-EGF ne l'est pas. La nature de l'étiquette peut également avoir un impact sur la bioactivité: la protéine Ecoil-EGF est aussi active que EGF non étiqueté, et plus active que toutes les autres protéines produites (incluant le Kcoil-EGF). Par conséquent, seule l'étiquette E coil n'interfère pas avec l'activité biologique de EGF. Il a donc été choisi d'utiliser Ecoil-EGF lors des parties 2 et 3 de ce travail.

Dans un second manuscrit publié en 2009 dans *Bioconjugate Chemistry*, nous avons mis au point le protocole chimique permettant de fixer de manière orientée du Ecoil-EGF sur des

surfaces de verre aminé. La méthode élaborée, qui consiste à immobiliser notre protéine d'intérêt via l'interaction coiled-coil après avoir greffé de manière covalente le K coil en utilisant un bras espaceur hétérobifonctionnel comme point d'ancrage, a été validée à l'aide d'un biocapteur dont le principe de détection est basé sur la résonance plasmonique de surface (SPR). Chaque étape du greffage a ensuite été caractérisée par ellipsométrie et par mesures de l'angle de contact sur des surfaces de verre. Une augmentation de l'épaisseur de la surface et une modification de son degré d'hydrophobicité ont pu être observées après chaque étape de notre protocole, confirmant le greffage covalent du K coil puis la capture de Ecoil-EGF via l'interaction coiled-coil sur les surfaces de verre aminé (115 ± 8 pmol/cm^2). L'incubation de cellules épithéliales A-431 sur ces surfaces ainsi fonctionnalisées a permis d'obtenir une réponse cellulaire accrue (adhésion cellulaire ou activation du récepteur de EGF) par rapport à l'utilisation de EGF en solution ou de EGF immobilisé de manière aléatoire.

Dans la troisième partie de cette thèse, nous avons retranscrit le protocole élaboré précédemment, à savoir la fixation de K coil, sur du polyéthylène téréphthalate (PET) puis nous avons mené une étude approfondie quant à la réponse des cellules épithéliales de la cornée (HCE-2) ainsi stimulées. Étant donné que le PET ne présente pas d'amines primaires à sa surface, ces groupements ont été tout d'abord générés par un traitement au plasma en utilisant l'ammoniac comme gaz. Le processus de greffage du K coil a ensuite été caractérisé par des analyses de spectrométrie photoélectronique à rayons X (XPS). Avant d'incuber le Ecoil-EGF sur ce PET fonctionnalisé, un traitement préalable utilisant l'albumine sérique humaine (HSA) s'est avéré nécessaire afin d'éviter tous risques d'adsorption non spécifique. Bien que la quantité de Ecoil-EGF immobilisé (46,9 ± 9,5 pmol/cm^2) ait diminué d'un facteur 2,5 comparativement à

l'utilisation de surfaces de verre, des tests d'adhésion, de prolifération et de phosphorylation du récepteur de EGF, de Akt et Erk1/2 *in vitro* ont tous démontré l'intérêt de notre approche.

Les supports biocompatibles permettant de promouvoir et de maintenir la régénération tissulaire présentent un grand intérêt dans le domaine biomédical. Notre travail démontre que l'immobilisation de protéines adéquates peut améliorer le potentiel de ces supports en stimulant le recrutement, l'adhésion et la prolifération cellulaire. Nous avons développé une approche facile à mettre en œuvre, polyvalente et aisément contrôlable permettant d'immobiliser de manière orientée le facteur de croissance de l'épiderme EGF sur des (bio)matériaux aminés via l'interaction coiled-coil. Cette méthode présente l'avantage d'être facilement adaptable à tous biomatériaux aminés et utilisables avec toutes protéines étiquetées avec un peptide coil. Par conséquent, le système coiled-coil est un outil prometteur permettant le couplage orienté de protéines sur des supports biocompatibles pour des applications futures en ingénierie tissulaire et médecine régénératrice.

•

ABSTRACT

Bioengineered implants are becoming extremely promising with respect to the development of biocompatible scaffolds to promote and sustain tissue regeneration. Several research groups have developed methods for the non-oriented immobilization of growth factors (GF) with the ultimate goal of modulating cell growth and phenotype. Although unambiguous effects have been reported with randomly grafted ligands, these protocols suffer from several caveats such as the creation of heterogeneous surfaces on which protein bioactivity may be suboptimal. Consequently, new methods based on the interactions between affinity tags such as Fc or polyhistidine and solid supports, allowing for oriented protein immobilization are currently developed.

Recently, a heterodimeric coiled-coil system formed by two *de novo* designed peptides (the E and K coils) has been characterized and demonstrated to be a promising tool for various biotechnology and biomedical applications such as protein capture and delivery due to the high affinity and the strong specificity that these two peptides have for each others. In this work, we have decided to take advantage of this coiled-coil system to specifically capture a coil-tagged growth factor, EGF, in an oriented fashion through its interaction with a surface on which the coil partner will be covalently immobilized. We selected EGF since this growth factor is known to have a major impact on cellular proliferation during wound healing mechanisms, which make it an excellent candidate for tissue engineering applications.

In our strategy, EGF was first expressed as a fusion protein comprising the E or the K coil at its N-terminus. Other EGF fusion proteins were also expressed for comparison. These included

EGF being tagged with the Fc portion of an Immunoglobulin G at its N- or C-terminus, as these constructs have been previously reported for the oriented immobilization of EGF via their interaction with protein G. In a first step, we have studied the impact of the nature and the localization of different tags on EGF bioactivity, which is the subject of a first manuscript that was published in 2008 in *Tissue Engineering part A*. The various EGF constructs were expressed by transiently transfecting human embryonic kidney (HEK 293) cells and they were purified by affinity chromatography. The bioactivity of these proteins was then evaluated. It was demonstrated that purified Fc-EGF was not able to promote EGFR phosphorylation whereas Ecoil-EGF was as active as untagged EGF and more active than the others proteins including EGF-Fc and Kcoil-EGF. These results demonstrated that, in our approach, the Ecoil peptide is the only tag that does not interfere with EGF bioactivity and that the nature and the localization of the tag have a strong influence on EGF chimera bioactivity. We have thus decided to use Ecoil-EGF in all subsequent work.

In a second paper published in 2009 in *Bioconjugate Chemistry*, we grafted Ecoil-EGF on aminated glass surfaces. The efficiency of our grafting procedure that was based on the covalent immobilization of K coil using a heterobifunctional linker, followed by Ecoil-EGF capture via coiled-coil interactions, was tested with a biosensor whose detection principle is based on surface plasmon resonance (SPR). This study confirmed the high specificity and stability of the coiled-coil interactions. Each grafting step was further evaluated by ellipsometric and contact angle measurements on glass surfaces. An increase of the thickness of the surface and a modification of its hydrophobicity were observed after each grafting step. These results confirmed the covalent grafting of K coil peptides and the oriented immobilization of Ecoil-EGF (115 ± 8 pmol/cm^2) on aminated glass surfaces. A-431 cells were finally incubated on native surfaces (in the presence or

absence of soluble EGF), on Kcoil-functionalized surfaces on which Ecoil-EGF was captured via coiled-coil interactions or on which EGF was covalently immobilized. A higher cellular response (cell adhesion and receptor phosphorylation) was observed for coiled-coil immobilized Ecoil-EGF when compared to the other approaches we have tested.

At last, we evaluated the impact of Ecoil-EGF tethering on polyethylene terephthalate (PET) via coiled-coil interactions upon human corneal epithelial cell culture (HCE-2). First, amine groups were created on PET surface by ammonia plasma treatment. K coil peptides were covalently immobilized using the same protocol as the one developed for aminated glass and the grafting process was characterized by X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) analyses. As expected, K coil peptides were covalently grafted, however, a surface treatment with human serum albumin (HSA) was required to avoid non-specific adsorption of EGF. The impact of oriented immobilized EGF (46.9 ± 9.5 pmol/cm^2) on HCE-2 behavior was then studied. First, an increase of HCE-2 adhesion was observed in the presence of Ecoil-EGF immobilized via coiled-coil interactions, in stark contrast with results obtained with PET (with or without soluble EGF supply in solution) or in the presence of PET on which EGF had been physically adsorbed. 24h after inoculation, cell spreading was also enhanced in the presence of immobilized Ecoil-EGF whereas cells remain spherical with other conditions. Moreover, proliferation assays demonstrated that immobilized Ecoil-EGF was the most efficient condition to promote cell growth, most likely due to the prolonged activation of their EGF-triggered signaling pathways.

In conclusion, the development of biocompatible scaffolds being able to promote and sustain tissue regeneration presents a great interest for various biomedical applications. Protein immobilization has the potential to enhance these scaffold properties by stimulating the recruitment of cells, their adhesion and proliferation. We have developed an easy, versatile and

controllable approach to graft bioactive EGF in an oriented fashion. This protocol can be easily adapted to any aminated (bio)materials and further applied to any coil-tagged proteins. We thus believe that our E/K coiled-coil capture strategy is of great interest for future applications in tissue engineering and regenerative medicine.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE III

REMERCIEMENTS IV

RÉSUMÉ VI

ABSTRACT X

TABLE DES MATIÈRES XIV

LISTE DES TABLEAUX XVIII

LISTE DES FIGURES XIX

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS XXI

LISTE DES ANNEXES XXVI

INTRODUCTION 1

CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE 5

1.1 Préambule 5

1.2 Macromolécules biologiques d'intérêt pour la fonctionalisation de biomatériaux 6

1.2.1 Mécanismes d'activation des récepteurs de la famille de EGF et voies de signalisation associées 8

1.2.2 Transduction des signaux par les récepteurs ErbB phosphorylés 16

1.2.3 Autres facteurs de croissance et peptides utilisés 25

1.3 Les biomatériaux 27

1.3.1 Les polymères d'origine naturelle 28

1.3.2 Les matrices acellulaires 34

1.3.3 Les polymères synthétiques utilisés dans les applications vasculaires 34

1.3.4 Les polymères synthétiques utilisés pour la génération de cornées artificielles 41

1.4 Stratégies et techniques utilisées pour l'immobilisation de protéines 45

1.4.1 L'adsorption de protéines 45

1.4.2 L'immobilisation non-orientée covalente des protéines 48

1.4.3 L'immobilisation orientée de protéines 50

CHAPITRE 2 OBJECTIFS ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT 59

CHAPITRE 3 LA BIOACTIVITÉ ET L'AFFINITÉ DU RÉCEPTEUR DU FACTEUR DE CROISSANCE DE L'ÉPIDERME ÉTIQUETÉ CONCU À DES FINS D'APPLICATION EN INGÉNIERIE TISSULAIRE SONT DÉFINIES PAR LA NATURE ET LA POSITION DES ÉTIQUETTES..... 62

3.1 Présentation de l'article 62

3.2 The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged-EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags 63

3.2.1 Abstract 64

3.2.2 Introduction 65

3.2.3 Materials and Methods 67

3.2.4 Results 76

3.2.5 Discussion 83

3.2.6 Acknowledgements 89

3.2.7 References 89

CHAPITRE 4 LE FACTEUR DE CROISSANCE DE L'ÉPIDERME IMMOBILISÉ PAR L'INTERMÉDIAIRE DE L'INTERACTION COILED-COIL INDUIT LA PHOSPHORYLATION DES RÉCEPTEURS PRÉSENTS À LA SURFACE DES CELLULES94

4.1 Présentation de l'article 94

4.2 Epidermal growth factor tethered through coiled-coil interactions induces cell surface receptor phosphorylation 95

4.2.1 Abstract 96

4.2.2 Keywords 96

4.2.3 Introduction 96

4.2.4 Materials and Methods 99

4.2.5 Results 109

4.2.6 Discussion 120

4.2.7 Conclusion 124

4.2.8 Acknowledgement 125

4.2.9 References 125

CHAPITRE 5 RÉPONSE DES CELLULES ÉPITHÉLIALES HUMAINES DE LA CORNÉE AU FACTEUR DE CROISSANCE DE L'ÉPIDERME IMMOBILISÉ VIA L'INTERACTION COILED-COIL 130

5.1 Présentation de l'article 130

5.2 Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor tethered via coiled-coil interactions 131

5.2.1 Abstract 132

5.2.2 Keywords 133

5.2.3 Introduction 133

5.2.4 Materials and Methods 136

5.2.5 Results 146

5.2.6 Discussion 162

5.2.7 Conclusion 167

5.2.8 Acknowledgements 167

5.2.9 References 168

CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE 175

CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS 182

BIBLIOGRAPHIE 186

ANNEXES 228

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Avantages, inconvénients et efficacité des différents types de PET et PTFE lorsqu'utilisés pour la fabrication d'implants vasculaires. 40

Table 3.1 : Kinetic and thermodynamic parameters corresponding to the interactions of EGFRED-Fc with captured Ecoil-EGF and Kcoil-EGF. 86

Table 5.1 : Elemental composition for: PET; PET aminated via plasma treatment; aminated PET that had been incubated for 2 h in PBS; aminated PET on which LC-SPDP had been grafted; and on which K coil had been grafted via LC-SPDP. $[NH_2]/[N]$ ratios (deduced from TFBA derivatization assays) are also listed (last column). 148

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : La famille de EGF. 10

Figure 1.2 : L'activation des récepteurs de la famille ErbB entraine la création de sites de fixation pour de nombreux effecteurs. 13

Figure 1.3 : Transduction des signaux initiée par EGFR. 18

Figure 1.4 : Représentation des unités répétées de divers polymères polysaccharidiques. 32

Figure 1.5 : Représentation des unités répétitives du PET et du PTFE. 39

Figure 1.6 : Schématisation et comparaison des différentes stratégies permettant le greffage de protéines. 47

Figure 1.7 : Représentation schématique de l'immobilisation orientée de EGF-His sur un support majoritairement constitué d'une matrice Ni-NTA. 54

Figure 1.8 : Représentation d'Edmundson (*Helical Wheel*) d'un hétérodimère E/K dans un heptade par hélice est représenté en coupe. 57

Figure 3.1 : Expression plasmids for the production of the various tagged EGFs. 70

Figure 3.2 : Small-scale expression of tagged EGF in 293-6E cells. 77

Figure 3.3 : Production and purification of tagged EGFs. 80

Figure 3.4 : *In vitro* cell assays. 81

Figure 3.5 : Control-corrected sensorgrams corresponding to Fc-tagged EGF interactions with EGFRED-Fc. 84

Figure 3.6 : Control-corrected sensorgrams corresponding to EGFRED-Fc interactions with captured E or Kcoil-EGF. 85

Figure 4.1 : Schematic illustration of the chemical grafting procedure. 102

Figure 4.2 : Characterization of the (a) APTES, (b) LC-SPDP, and Cysteine-tagged Kcoil layers grafted on silicon surfaces. 110

Figure 4.3 : Sequential grafting of Ecoil-EGF via coiled-coil interactions. 112

Figure 4.4 : Control-corrected sensograms corresponding to Ecoil-EGF capture via E/K coiled-coil interactions by SPR. 113

Figure 4.5 : Variation of captured Ecoil-EGF density with Ecoil-EGF concentration during incubation. 116

Figure 4.6 : Phosphorylation of A-431 cell surface EGF receptors. 117

Figure 4.7 : Images of attached cells after 5 hours of incubation for adhesion assays. 119

Figure 5.1 : Schematic diagram of the chemical grafting procedure used for coiled-coil mediated EGF tethering. 141

Figure 5.2 : C1s (a), O1s (b) and N1s (c) spectral analyses of native PET (1), PET following plasma treatment (2), LC-SPDP covalent grafting (3), and final K coil covalent grafting (4). Assignments of possible chemical bonds and relative compositions in atomic percentages are indicated in each panel. 150

Figure 5.3 : HSA pre-treatment on K coil-functionalized PET surfaces prevents non-specific adsorption of EGF. 151

Figure 5.4 : Dose-response curve of HCE-2 cell EGF receptor phosphorylation by EGF. 154

Figure 5.5 : Adhesion assays. 155

Figure 5.6 : Morphological study of adhered HCE-2 cells. 158

Figure 5.7 : Time course of EGF receptor, Erk1/2 and Akt phosphorylation. 160

Figure 5.8 : Proliferation assays. 161

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ATP	Adénosine triphosphate
AFM	Microscopie par force atomique
APTES	3-aminopropyltriethoxysilane
AE	Amphiregulin
BTC	Betacellulin
BSA	Bovine Serum Albumin
CHO	Chinese Hamster Ovary
CVs	Column Volumes
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSG	Disuccinimide glutarate
DMSO	Dimethylsulfoxide
DTT	Dithiothreitol
Ecoil-EGF	EGF étiqueté en position N-terminale par le E coil
EC_{50}	Median effective concentration
EDC	Ethyl-N′-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide hydrochloride
EDTA	Ethylene Diamine TetraAcetic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGF-Fc	EGF étiqueté en position C-terminale par le fragment Fc de l’immunoglobuline G
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor

EGFRED-Fc	Extracellular Domain of EGFR being artificially dimerized through the Fc portion of an IgG
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPG	Epigen
EPR	Epiregulin
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
F68	Pluronic acid F-68
FBS	Foetal Bovine Serum
FBD	Domaine de liaison à la fibrine
Fc	Fragment constant de l'immunoglobuline G
Fc-EGF	EGF étiqueté en position N-terminale par le fragment Fc de l'immunoglobuline G
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
GF	Growth Factor
GPCR	G Protein-Coupled Receptors
Grb2	Growth-factor-receptor-bound-2
HB-EGF	Heparin Binding EGF-like Growth Gactor
HCE-2	Human Corneal Epithelial cells
HEK293	Human Embryonic Kidney cells 293
HSA	Human Serum Albumin
hpt	Hours Post-Transfection
HRP	Horse Radish Peroxidase
HUVEC	Human Umbilical Vascular Endothelial Cells
IgG	Immunoglobuline G
IgGSP	Human Immunoglobulin G Signal Peptide

IL2	Interleukin 2
IL2SP	Interleukin 2 Signal Peptide
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
IP_3	Inositol 1,4,5-triphosphate
Kcoil-EGF	EGF étiqueté en position N-terminale par le coil K
kDa	kilo-Dalton
KSFM	Keratinocyte Serum-Free Medium
LC-SPDP	Succinimidyl 6-[30-(2-pyridyldithio)-propionamido]hexanoate
M	Molaire (mol/L)
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MES	Acide 2-[N-morpholino]ethanesulfonique
MW	Molecular Weight
NGF	Nerve Growth Factor
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NRG	Neuregulins
NTA	Acide Nitriloacétique
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDEA	2-(2-pyridyldithio) ethaneamine
PDMS	Polydimethylsiloxane
PEI	Polyéthylènimine
PEG	Polyéthylène Glycol
PET	Polyethylene Terephthalate
pHEMA	Poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate)

pI	Point Isoélectrique
PI3K	Phosphoinositidine 3-Kinase
PIP_2	Phosphatidylinositol-3,4-diphosphate
PIP_3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PKC	Protein Kinase C
PLA	Polylactic Acid
PLCγ	Phospholipase Cγ
PPE : N	Polymère plasma riche en azote déposé à pression atmosphérique à partir d'éthylène
PMMA	Poly(méthyl méthacrylate)
PTB	Phosphotyrosine binding domain
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PVP	Poly Vinyl Pyrrolidone
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
rpm	rotation par minutes
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
RUs	Resonance Units
sccm	Standard cm^3/min
SD	Standard Deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SeAP	Secreted Alkaline Phosphatase
SH2	Src-homology 2 domain
Shc	Src-homology-2-containing
SOS	Son-of-the-sevenless
SP	Signal Peptide

SPR	Surface Plasmon Resonance
stDNA	Salmon Testes DNA
TGF-α	Transforming Growth Factor-α
TFBA	4-(trifluoromethyl) benzaldehyde
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 – Article : Détection de protéines par western blot via l'interaction coiled-coil (Titre de l'article tel que soumis : « **Protein détection by western blot via coiled-coil interactions** »).....228

INTRODUCTION

En 2008, 27% des personnes en attente d'une greffe au Québec ont pu être traitées adéquatement (selon Québec-transplant). Ces faibles chiffres sont préoccupants, car malgré l'augmentation du nombre de donneurs et d'organes disponibles, la demande croît à un rythme nettement plus élevé. De nombreux efforts sont effectués afin de palier ce problème. Outre les campagnes de sensibilisation visant à informer la population sur l'espoir que représente le don d'organes, les procédures de prise en charge des donneurs et des receveurs sont désormais plus efficaces et les différents intervenants collaborent plus facilement. De nombreux efforts dans le domaine de la recherche sont également mis en place où des alternatives sont actuellement à l'étude pour remédier à ces problèmes de disponibilité. L'une d'entre elles fait appel à l'ingénierie tissulaire et est basée sur la génération *in vitro* de tissus ou organes à partir de cellules souches ou différenciées prélevées chez le patient. Ces organes pourraient alors être réimplantés et permettraient de s'affranchir du risque majeur rencontré lors des transplantations, à savoir l'incompatibilité entre donneur et receveur.

L'ingénierie tissulaire est un domaine interdisciplinaire qui se base sur les principes d'ingénierie et de sciences de la vie pour développer des substituts biologiques afin de restaurer, de maintenir ou d'améliorer les fonctions d'un tissu ou d'un organe (Langer and Vacanti 1993). Ce secteur est actuellement en plein essor. En 2008, d'après le rapport *Worldwide Markets and Emerging Technologies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine* émis en 2009 par *Life Science Intelligence*, le marché regroupant les produits destinés à l'ingénierie tissulaire et à la médecine régénératrice se chiffrait à 1,8 milliards de dollars alors qu'en 2013, il est prévu qu'il

atteigne 118 milliards de dollars. Le décalage qui existe entre le marché actuel et les prévisions s'explique en partie par la qualité médiocre des produits issus de l'ingénierie tissulaire qui ne satisfont pas encore les chirurgiens. Une accélération de la mise sur le marché de nouveaux produits et la preuve d'un meilleur traitement des patients grâce à ces nouveaux outils thérapeutiques sont sans nul doute la meilleure publicité qui permettra l'essor de ce secteur très prometteur. Certains produits sont toutefois déjà commercialisés, c'est le cas de Dermagraft®, un substitut de derme humain composé de fibroblastes, de matrice extracellulaire et d'un support bioabsorbable. Apligraf® et INTEGRA® *Dermal Regeneration Template* sont d'autres exemples de supports permettant la réparation de l'épiderme. L'élaboration de produits plus complexes visant à remplacer ou guérir des tissus ou organes endommagés est toujours d'actualité, car de nombreux challenges doivent encore être relevés. En effet, un des défis majeurs est de maintenir l'architecture de ces organes/tissus tout en conservant leur fonctionnalité et les processus métaboliques s'y déroulant. De nombreuses études s'intéressant notamment au rein, au foie, aux os, au cartilage, aux muscles ou au système nerveux sont actuellement en cours (Palsson et al. 2003). En plus de l'architecture ou de leur fonctionnalité, d'autres paramètres tels que le microenvironnement, les contraintes mécaniques exercées par l'environnement sur les cellules ou le mode d'interaction entre la cellule et son support ou entre les cellules pour certains tissus (os, peau) doivent être considérés dans leur mise au point.

Le microenvironnement présent autour des tissus comprend notamment des facteurs de croissance et des macromolécules de la matrice extracellulaire (Long 1992; Palsson et al. 2003). La compréhension de leurs interactions avec les cellules est primordiale, car ils influencent le recrutement, l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire par des processus dynamiques. Les contraintes mécaniques exercées par l'environnement sur les cellules sont également à

considérer car en fonction de leur localisation, les cellules seront soumises à différents stimuli tels que la pression, les contraintes de cisaillement et de compression qui joueront un rôle significatif sur l'architecture des tissus. Leur étude s'avère donc primordiale. Par exemple, il est possible de citer les cellules endothéliales présentes dans la lumière des vaisseaux sanguins qui sont constamment sujettes à des forces hémodynamiques incluant des contraintes de cisaillement relatives au flux sanguin sur les parois (Palsson et al. 2003).

Finalement, les interactions entre les cellules et les supports jouent un rôle primordial lors de l'élaboration de nouvelles stratégies en ingénierie tissulaire. Elles peuvent influencer le comportement cellulaire et modifier l'adhésion, le recrutement, la migration, la prolifération ou la différenciation des cellules en fonction des propriétés des biomatériaux. Selon l'application envisagée, il sera donc nécessaire d'adapter les propriétés de surface du matériau afin de promouvoir, ou mieux, de contrôler la réponse cellulaire. La fixation de macromolécules biologiquement actives telles que des protéines pourra être une des alternatives envisagées. Dans ce cas, différentes méthodes se basant sur l'adsorption de protéines, le greffage non-orienté ou l'immobilisation orientée ont été proposées. L'immobilisation orientée de protéines permet d'obtenir de façon reproductible des surfaces homogènes, contrairement aux deux premières approches citées et est donc privilégiée. Cependant, aucune des stratégies actuellement utilisées n'est optimale en raison de l'utilisation d'étiquettes altérant l'activité biologique de la protéine ou de matrices possiblement toxiques (ions métalliques). La conception de stratégies optimales permettant l'immobilisation orientée de protéines est donc nécessaire.

La problématique abordée dans cette thèse est donc celle de l'immobilisation de protéines et plus particulièrement de la mise au point d'une méthode expérimentale permettant l'obtention

de surfaces homogènes caractérisées par de hautes densités protéiques, sans toutefois altérer l'activité biologique des protéines fixées de futures applications *in vivo*.

Cette thèse est organisée en sept chapitres. Une revue de littérature détaillée sur le sujet décrivant notamment une famille de protéines particulière, celle du facteur de croissance de l'épiderme (EGF) utilisé pour la fonctionnalisation de biomatériaux, les matériaux les plus communs pour les implants cornéen et vasculaire ainsi que les techniques et stratégies utilisées pour l'immobilisation orientée de protéines suivra l'introduction et constituera le chapitre 1. Le chapitre 2 décrit les objectifs et l'organisation générale du document. Ce dernier sera suivi des chapitres 3 et 4 qui présentent les articles scientifiques déjà publiés dans le cadre de cette thèse. Le premier article rapporte la production, la purification de différentes chimères correspondant au facteur de croissance de l'épiderme (EGF) fusionné à différentes étiquettes et les tests visant à quantifier leur activité biologique. Le second article décrit la méthode utilisée pour immobiliser EGF étiqueté par le E coil sur des surfaces de verre sur lesquelles le coil complémentaire (K coil) aura préalablement été greffé de manière covalente. Il démontre les bénéfices de l'immobilisation orientée de EGF sur une lignée cellulaire modèle. Le chapitre 5, qui correspond à un article scientifique récemment soumis à la revue *Biomaterials*, démontre que la méthode de greffage rapportée dans le chapitre 4 est transposable à un biomatériau, le polyéthylène téréphtalate (PET) et approfondit l'impact de ce type de matériau fonctionnalisé sur le comportement des cellules épithéliales de la cornée cultivées *in vitro*. Finalement, les chapitres 6 et 7 présentent une discussion, la conclusion et les recommandations reliées à ce travail.

CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Préambule

Comme souligné dans la partie INTRODUCTION de cette thèse de doctorat, les domaines de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénératrice sont hautement pluridisciplinaires et actuellement en plein essor. En effet, lors des deux dernières décennies, le développement de nouveaux types de biomatériaux ayant le potentiel d'être utilisés comme échafaudages bi- ou tridimensionnels à des fins d'ingénierie tissulaire ou de médecine régénératrice s'est accéléré de façon exponentielle.

En parallèle, la compréhension des processus biochimiques et cellulaires ne cesse de croître grâce au développement et à la vulgarisation de nouvelles plateformes technologiques ayant permis *i)* le séquençage du génome de plusieurs espèces et la déduction des protéines encodées par ces génomes, *ii)* l'expression rapide de ces protéines sous forme bioactive, *iii)* la collecte de données structurales, thermodynamiques et cinétiques s'y rapportant ainsi que *iv)* l'intégration de ces connaissances grâce à la naissance d'un nouveau champ disciplinaire : la biologie des systèmes.

Ces nouveaux savoirs et savoir-faire relatifs aux sciences de la vie 'traditionnelles' (biochimie, biologie cellulaire) et à l'ingénierie des matériaux sont dorénavant utilisés en synergie afin de donner naissance à de nouveaux biomatériaux combinant les propriétés

mécaniques et physico-chimiques des polymères traditionnels au potentiel des macromolécules biologiques capables d'influencer le comportement cellulaire.

La grande diversité des matériaux utilisés et des macromolécules biologiques d'intérêt dans les domaines de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénératrice ne peut être abordée de façon exhaustive ; cette revue de littérature se concentrera sur une famille de protéines particulière, celle du facteur de croissance de l'épiderme (EGF) utilisé dans le cadre de cette thèse de doctorat ainsi que sur les matériaux les plus communs pour les implants cornéen et vasculaire.

1.2 Macromolécules biologiques d'intérêt pour la fonctionalisation de biomatériaux

Le développement normal d'un tissu, ou sa guérison suite à une lésion, sont deux processus régulés par des cascades complexes d'événements lors desquelles les cellules qui composent le tissu doivent répondre de façon adéquate et concertée (prolifération, différenciation, migration ou même apoptose) aux divers changements de leur microenvironnement. Dans cette perspective, un flux continu et dynamique d'informations doit s'établir entre les diverses cellules afin de coordonner leur réponse individuelle. Pour ce faire, les cellules d'un tissu sont en contact permanent avec la matrice extracellulaire, un environnement complexe, composée majoritairement de protéines (plus d'une centaine dont le collagène et la fibronectine) et de chaînes polysaccharidiques (par exemple l'héparine et l'héparane-sulfate). La matrice extracellulaire joue d'abord un rôle structural, fournissant aux cellules un échafaudage stable, mais toutefois modelable par action enzymatique. Elle module l'adhésion cellulaire grâce à des mécanismes impliquant l'interaction directe de plusieurs de ses protéines avec les récepteurs

d'adhésion cellulaires appartenant notamment à la famille des intégrines (Hynes 2002). De plus, la matrice extracellulaire agit comme un véritable réservoir de facteurs de croissance et contrôle leur disponibilité sous une forme bioactive (Hynes 2009). Ces facteurs de croissance sont utilisés, dans la plupart des cas, par les cellules comme véhicules privilégiés de l'information. Ils sont reconnus pour exercer leur rôle en interagissant avec des récepteurs spécifiques présents dans la membrane plasmique à la surface cellulaire.

Parmi ceux-ci, les récepteurs de la famille des kinases spécifiques aux tyrosines (*receptor tyrosine kinase*, RTK) ont été les premiers identifiés et sont les médiateurs de choix pour la propagation des signaux entre les cellules. Leur mode de fonctionnement suit le même schéma général : l'interaction d'un ligand avec le domaine extracellulaire des récepteurs membranaires induit l'assemblage d'un complexe ligand/récepteur actif. A l'intérieur de ce complexe, les kinases des récepteurs phosphorylent les chaînes latérales de plusieurs tyrosines spécifiques localisées dans chacun des domaines cytoplasmiques des récepteurs. Cette phosphorylation permet alors de recruter plusieurs protéines intracellulaires et ainsi d'initier les voies de signalisation permettant à l'information d'être véhiculée de la surface vers le noyau cellulaire où le niveau d'expression génique est modulé.

Jusqu'à présent, vingt familles distinctes de RTKs, toutes encodées par 59 gènes ont été identifiées (Manning and Cantley 2002) et la famille du facteur de croissance de l'épiderme (*epidermal growth factor*, EGF) est celle qui, de loin, a été la plus étudiée. Un tel intérêt de la part de la communauté scientifique peut s'expliquer par l'implication directe de ce facteur de croissance dans la plupart des processus cellulaires normaux, incluant la survie, la prolifération, la migration, la différenciation cellulaires (kératinocytes, cellules épithéliales, cellules souches neurales ou mésenchymateuses…) ainsi que la régulation de l'activité métabolique. De plus,

durant les trente dernières années, plusieurs dérégulations des voies de signalisation initiées par EGF suite à la surexpression de ses récepteurs (Arteaga 2002), à des mutations ponctuelles de ces derniers (Arteaga 2006; Humphrey et al. 1990; Jungbluth et al. 2003) ou à leur activation aberrante par des mécanismes autocrines (Sizeland and Burgess 1992), ont été directement reliées à plusieurs pathologies sévères incluant plusieurs types de cancers (cancer du sein, des poumons et colorectal) (Wilson et al. 2009).

1.2.1 Mécanismes d'activation des récepteurs de la famille de EGF et voies de signalisation associées

1.2.1.1 La famille de EGF

La famille de EGF comprend au moins 13 ligands distincts, à savoir, EGF, le facteur de croissance transformant α (*transforming growth factor-α*, TGF-α), le facteur de croissance de la famille de EGF se liant à l'héparine (*heparin binding EGF-like growth factor*, HB-EGF) (Higashiyama et al. 1991; Higashiyama et al. 1992), la bétacelluline (BTC) (Sasada et al. 1993; Seno et al. 1996; Watanabe et al. 1994), l'amphiréguline (AR) (Plowman et al. 1990a; Plowman et al. 1990b; Shoyab et al. 1989), les neurégulines (NRGs), l'épiréguline (EPR) (Toyoda et al. 1995a; Toyoda et al. 1995b) et l'epigène (*epigen*, EPG) (Strachan et al. 2001). Bien que l'homologie de séquence de ces ligands soit faible, tous possèdent un motif conservé comprenant trois cystines (trois ponts disulfures) ainsi que plusieurs résidus assurant une haute spécificité lors de la reconnaissance de leurs récepteurs (Figure 1.1A et 1.1B). Il est aussi probable que tous

adoptent une structure tertiaire très similaire. Cette hypothèse a été partiellement vérifiée puisque EGF (Ogiso et al. 2002), TGF-α (Garrett et al. 2002; McInnes et al. 1998) et BTC (Miura et al. 2002) possèdent tous trois une structure tertiaire caractérisée par la présence de trois boucles induites par la formation de trois ponts disulfures, tel que mis en évidence par les données expérimentales collectées par résonance magnétique nucléaire (RMN) et par cristallographie au rayon X (Figure 1.1B) (Wilson et al. 2009).

Chez les mammifères, tous les ligands de la famille de EGF sont synthétisés sous forme de précurseurs transmembranaires qui doivent être clivés de façon protéolytique afin de libérer les facteurs de croissance bioactifs correspondants. Sous forme soluble, ces derniers interagissent directement, avec une plus ou moins grande affinité, avec trois récepteurs transmembranaires distincts : le récepteur EGF (EGFR, aussi nommé ErbB1 ou HER1), ErbB3 (ou HER3) et ErbB4 (ou HER4) (Yarden and Sliwkowski 2001). Un quatrième récepteur, ErbB2 (ou HER2), n'interagit directement avec aucun ligand connu mais participe de manière active avec les autres récepteurs à l'activation des différentes voies de signalisation par les ligands de la famille de EGF (Klapper et al. 1999).

Les quatre récepteurs ErbB possèdent eux aussi une architecture semblable. Ce sont tous des enzymes allostériques dont la structure tertiaire se compose d'un domaine extracellulaire relativement grand (plus de 600 résidus) relié par un domaine transmembranaire à un domaine cytoplasmique de plus de 500 résidus. Ce dernier se compose d'une région proche de la membrane, d'un domaine possédant l'activité enzymatique (plus précisément une kinase spécifique aux tyrosines) (Hubbard and Miller 2007) et une région C-terminale régulatrice (Ullrich et al. 1984; Warren and Landgraf 2006).

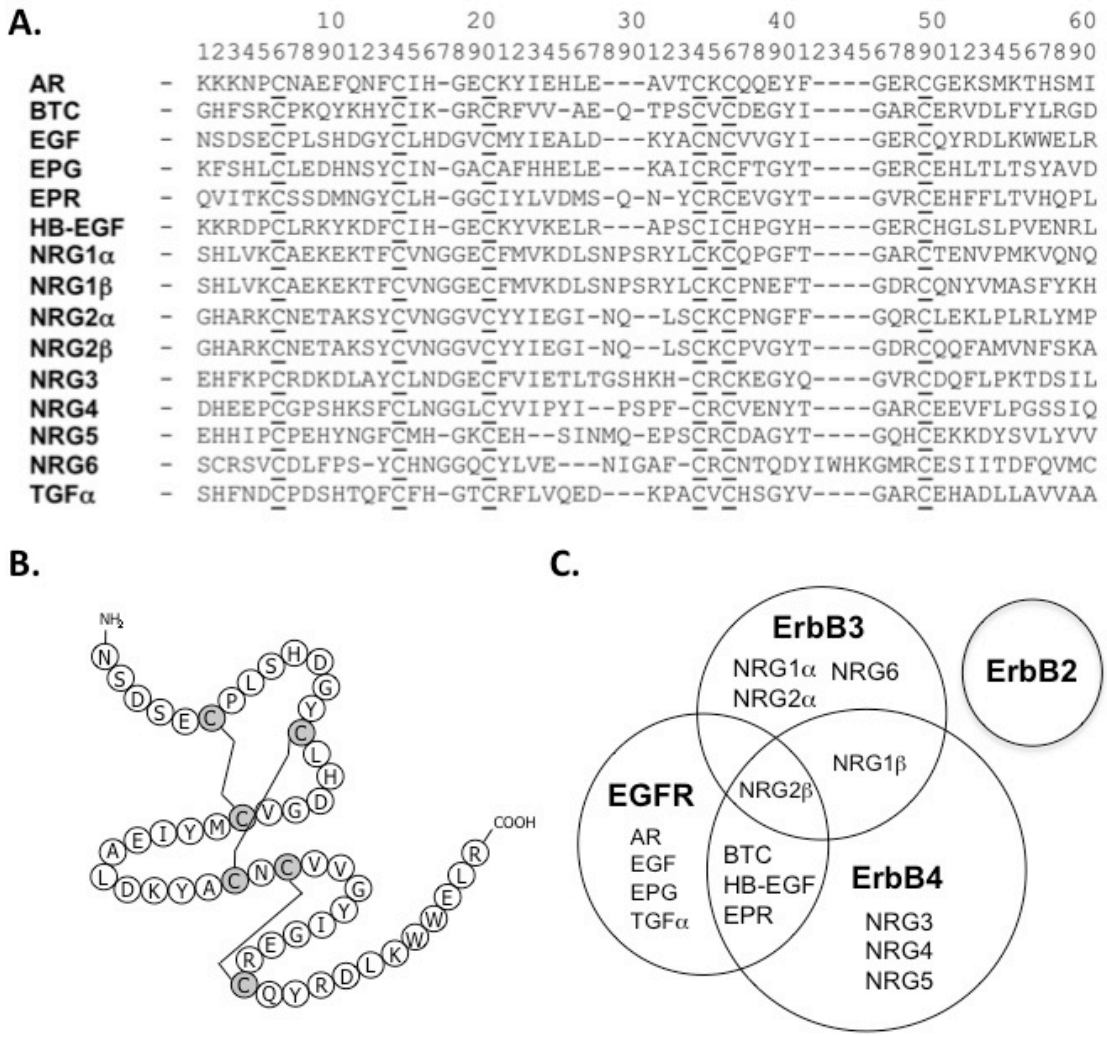

Figure 1.1 : La famille de EGF.

A. Alignement des séquences d'acides aminés des différents membres de la famille de EGF. Les 6 résidus cystéines conservés qui forment les 3 ponts disulfures présents au sein des ligands matures sont soulignés. B. Structure primaire de EGF. Les ponts disulfures sont représentés par des traits. C. Les ligands de la famille de EGF activent les récepteurs de la famille ErbB. Un diagramme de Venn illustre les interactions des récepteurs ErbBs avec les membres de la famille de EGF (d'après (Wilson et al. 2009)).

1.2.1.2 Mécanisme d'activation des récepteurs de la famille de EGF

Les études cristallographiques des structures quaternaires correspondant à EGF (Ogiso et al. 2002) ou TGF-α (Garrett et al. 2002) liés au domaine extracellulaire de ErbB1, ainsi que les structures des domaines extracellulaires de ErbB1, 2 et 3 en absence de ligand (Cho and Leahy 2002; Cho et al. 2003; Ferguson et al. 2003; Garrett et al. 2003) ont permis de proposer un modèle structural général décrivant comment les récepteurs ErbB sont activés par les ligands de la famille de EGF (Burgess et al. 2003). Plus spécifiquement, ces études cristallographiques ont révélé que, tout comme les ligands, les domaines extracellulaires des récepteurs ErbB1, 3 et 4 présentent des structures tertiaires très similaires. Ils sont formés de quatre domaines distincts (numérotés de I à IV) qui s'organisent pour adopter une conformation dite 'liée', stabilisée par de multiples interactions intra-caténaires entre les domaines II et IV (Figure 1.2A). Cette conformation 'liée' maintient les récepteurs dans un état inactif car elle inhibe de façon stérique les kinases de leur domaine cytoplasmique. Tel que mis en évidence pour les complexes EGF/ErbB1 et TGF-α/ErbB1, il a été proposé que les divers ligands de la famille de EGF interagissent avec les domaines extracellulaires de ErbB1, 3 et 4 selon une stœchiométrie de 1:1. L'interaction ligand/récepteur implique majoritairement les domaines I et III du récepteur et se traduit par un réarrangement conformationnel majeur du complexe (Figure 1.2A). Au sein de la structure quaternaire, le domaine extracellulaire du récepteur adopte alors une conformation beaucoup plus 'étirée', exposant ainsi un site de son domaine II. Ce site, baptisé le 'bras de dimérisation', promeut alors l'assemblage de deux récepteurs. La stœchiométrie du complexe actif qui en résulte est donc de deux récepteurs pour deux ligands et, dans ce complexe, les ligands ne participent pas par contact direct au processus de dimérisation.

D'un point de vue structural, ErbB2 (le récepteur orphelin) se démarque des autres récepteurs ErbB car sa conformation ressemble déjà à la structure 'étirée' du récepteur ErbB1 (lorsque lié à EGF). Il a donc été proposé, et largement accepté par la communauté scientifique, que ErbB2 interagit directement (c'est-à-dire sans l'aide d'aucun ligand) avec un autre récepteur ErbB déjà lié à son ligand, afin de donner un complexe actif, composé d'un ligand et de deux récepteurs. Bien que très attrayant, ce modèle doit cependant être corrigé pour prendre en compte les dernières informations structurales relatives à dEGFR (le seul récepteur de la famille de EGF chez *Drosophila melanogaster*): le domaine extracellulaire de ce dernier adopte lui aussi une conformation 'étirée' en absence de ligand (Alvarado et al. 2009) remettant ainsi en cause de façon implicite le caractère orphelin de ErbB2.

Comme souligné récemment par Lemmon (Lemmon 2009), notre compréhension du mécanisme de formation des complexes ligand/récepteur de la famille de EGF n'est encore que superficielle ; le modèle présenté plus haut n'explique en rien le fait que deux populations distinctes d'ErbB1, caractérisées par des affinités distinctes pour EGF (K_D de 0,1 et de 10 nM) existent à la surface cellulaire (Ullrich and Schlessinger 1990), ou encore que l'interaction de EGF avec son récepteur ne puisse être représentée que par un modèle de coopération négative. De plus, le modèle proposé n'identifie nullement quels déterminants structuraux favorisent la dimérisation homo- ou hétérotypique des différents récepteurs, bien que de plus en plus d'études soulignent un rôle potentiel des domaines transmembranaire et cytoplasmique dans ce phénomène.

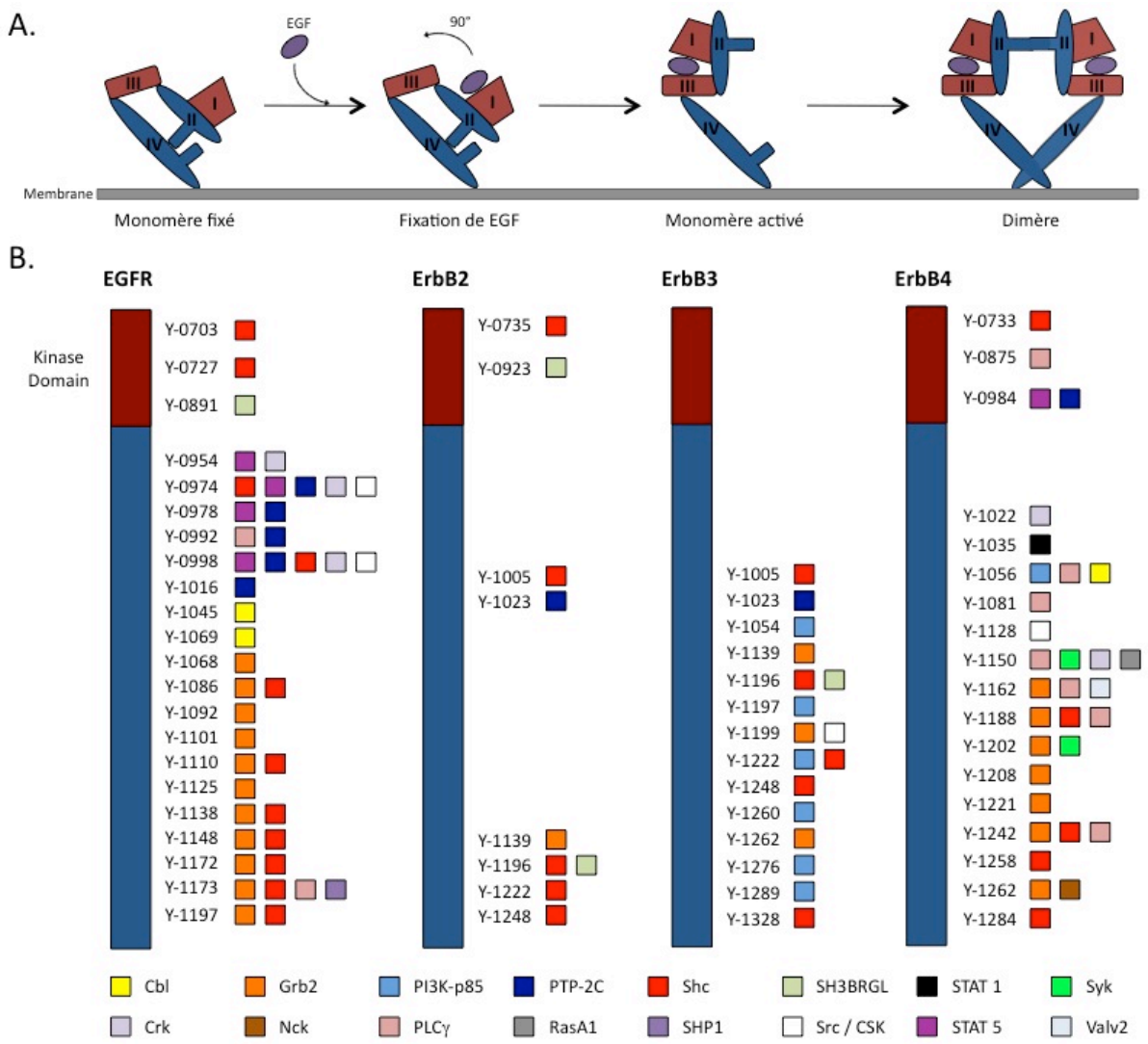

Figure 1.2 : L'activation des récepteurs de la famille ErbB entraine la création de sites de fixation pour de nombreux effecteurs.

A. Un réarrangement conformationnel majeur du récepteur de EGF est observé après l'interaction initiale entre EGFR et son ligand, aboutissant à la dimérisation du récepteur (stœchiométrie finale de 2 :2). B. La phosphorylation de certains résidus (dénotés Y-#) présents sur les récepteurs conduit au recrutement subséquent de nombreux partenaires. Ces partenaires sont schématisés par des carrés de différentes couleurs. La plupart de ceux-ci se retrouvent en position C-terminale du récepteur à l'extérieur du domaine à activité kinase (d'après Schulze et Wilson (Schulze et al. 2005; Wilson et al. 2009)).

1.2.1.3 Dimérisation homo- et hétérotypique des différents ErbB et phosphorylation des domaines cytoplasmiques.

Deux traits caractéristiques ressortent lorsque les étapes initiales de signalisation des récepteurs ErbB sont examinées; ils expliquent en partie le vaste répertoire des réponses cellulaires associées à cette famille de récepteurs. Premièrement, ce système présente beaucoup de redondance: plusieurs ligands peuvent se lier au même récepteur et plusieurs récepteurs peuvent interagir avec le même ligand. Tel qu'illustré à la Figure 1.1C, EGF, TGF-α, BTC, HB-EGF, AR, EPR, NRG2β et EPG ont tous la capacité d'interagir avec ErbB1 alors que NRGβ peut se lier à ErbB1, 3 et 4. Deuxièmement, en présence des ligands adéquats, les différents récepteurs peuvent former pas moins de huit dimères homo- (ErbB1 et 4) ou hétérotypiques.

Au sein de ces dimères activés, le domaine kinase de chacun des récepteurs catalyse alors le transfert du groupement phosphate γ d'une molécule d'ATP sur la fonction hydroxyle des tyrosines du domaine cytoplasmique de l'autre récepteur (Ushiro and Cohen 1980), selon un mécanisme appelé trans-auto-phosphorylation (Hubbard and Miller 2007; Schlessinger 2000; Zhang et al. 2006). Une exception existe cependant puisque ErbB3 ne possède aucune activité kinase (Guy et al. 1994); son domaine cytoplasmique peut toutefois être phosphorylé par un autre ErbB engagé dans une interaction avec son ligand, ou même par ErbB2. Il est à noter que les complexes ErbB2/ErbB3 composés à la fois d'un récepteur orphelin et d'un récepteur n'ayant aucune activité kinase donnent les plus fortes réponses cellulaires (Klapper et al. 2000).

Notre description des mécanismes d'activation des divers ErbB peut de façon implicite conduire le lecteur à conclure que la spécificité des différents ligands pour les domaines extracellulaires des récepteurs contrôle entièrement l'assemblage des différents complexes, et

donc l'activation de voies de signalisation en réponse à ces stimuli. Cette conclusion est cependant partiellement fausse (si ce n'est entièrement) puisque plusieurs études ont révélé que les différents récepteurs ErbB existent dans un état prédimérisé, quoique inactif en absence de ligand. C'est en effet le cas pour les dimères ErbB1/ErbB1 (Martin-Fernandez et al. 2002; Moriki et al. 2001) et ErbB1/ErbB2 (Liu et al. 2007). Les conclusions de Tao et collègues sont encore plus drastiques puisque les travaux récents de ce groupe de recherche suggèrent que tous les récepteurs ErbB sont déjà prédimérisés avant leur activation par leurs ligands respectifs (Tao and Maruyama 2008). Ces travaux ont même permis l'identification par les auteurs de deux dimères (ErbB3/ErbB3 et ErbB3/ErbB4) dans le noyau de la cellule. Dans le même esprit, une étude de Clayton *et al.* suggère que les récepteurs ErbB s'assemblent pour former non pas des dimères mais des structures plus complexes (possiblement des tétramères) (Clayton et al. 2005). Ainsi, l'état d'oligomérisation des récepteurs ErbB, avant leur activation par les ligands, pourrait contribuer de façon significative à la formation de complexes actifs spécifiques, et donc au contrôle de la signalisation.

La grande diversité des complexes ligand/récepteur au sein de la famille d'EGF d'une part, ainsi que, le vaste répertoire d'effets biologiques qui leur sont attribués prête à croire, naïvement qu'entre les deux, un réseau complexe et spécifique soit initié par le phénomène de trans-auto-phosphorylation. Tel est le cas, comme l'ont révélé un grand nombre d'études s'échelonnant sur les trente dernières années. A l'intérieur de la cellule, cette diversité se traduit en premier lieu par le nombre important de sites de phosphorylation présents sur chaque domaine cytoplasmique des récepteurs ErbB. Chacun d'entre eux possède en effet entre 19 et 27 résidus tyrosine (pour un total de 89) (Schulze et al. 2005) parmi lesquelles 9 à 19 ont été identifiés comme site de phosphorylation (Kaushansky et al. 2008; Schulze et al. 2005) (Figure 1.2B). Cependant, jusqu'à

présent, le mécanisme par lequel la liaison d'un ligand (à l'extérieur de la cellule) engendre la phosphorylation spécifique d'un groupe de tyrosines (de l'autre coté de la membrane) n'est qu'hypothétique. En se basant sur l'étude cristallographique de Zhang et collègues (Zhang et al. 2006), Wilson a proposé récemment que la structure quaternaire formée lors du recrutement des ligands par les domaines extracellulaires des récepteurs contrôle l'orientation relative de leurs domaines cytoplasmiques et donc influence quels résidus sont les plus susceptibles d'être phosphorylés (Wilson et al. 2009).

1.2.2 Transduction des signaux par les récepteurs ErbB phosphorylés

Tel que mentionné précédemment, le patron de phosphorylation des domaines cytoplasmiques des récepteurs ErbB est complexe. Cette complexité trouve aussi écho dans le grand nombre de protéines intracellulaires capables d'interagir directement ou indirectement avec chaque récepteur ErbB. A cet égard, la phosphorylation des résidus tyrosines au sein des domaines cytoplasmiques des différents ErbB engendre de nouveaux sites de liaison reconnus par les diverses protéines du cytosol qui contiennent des domaines SH2 (*Src-homology 2 domain*) ou PTB (*phosphotyrosine binding domain*) (Hunter 2000); la spécificité de ces interactions étant dictée par les résidus entourant les tyrosines phosphorylées. Dans ce contexte, Jones et collègues ont récemment déterminé les affinités de 106 domaines SH2 et 41 domaines PTB (parmi les 109 et 44 domaines SH2 et PTB identifiés dans les banques de données du génome humain) pour 33 peptides correspondant à des sites de phosphorylation connus ou putatifs des quatre récepteurs ErbB (Jones et al. 2006). Ce travail colossal (plus de 77500 interactions étudiées) a permis aux auteurs d'identifier plus de 100 nouvelles interactions fortes (c'est-à-dire caractérisées par des K_D

allant du nM au μM et donc ayant de grande chance d'avoir lieu *in vivo*), en plus de confirmer les interactions déjà identifiées par plusieurs équipes scientifiques. Ces résultats suggèrent que la signalisation initiée par les récepteurs s'appuie sur un réseau complexe d'interactions qui dépendent de la disponibilité des différents partenaires (et plus particulièrement de leur concentration locale), de leur affinité relative pour les différents sites de liaison des récepteurs, de leurs cinétiques d'interaction ainsi que de leur capacité d'entrer en compétition les uns avec les autres lorsqu'ils interagissent avec un site phosphorylé donné.

Parmi les différentes protéines directement recrutées par les récepteurs ErbB, plusieurs enzymes (par exemple Src et PLCγ), facteurs de transcription (par exemple STAT1 et STAT5) ou protéines jouant le rôle d'adaptateur (*adaptor*, par exemple Shc et Grb2) ont été identifiées (Figure 1.2B). Dans ce dernier cas, notons que les deux protéines Grb2 et Shc (*growth-factor-receptor-bound-2* et *Src-homology-2-containing*) interagissent directement avec les récepteurs ErbB et sont à leur tour phosphorylées par ces derniers, créant ainsi de nouveaux sites pour le recrutement d'autres protéines et donc multipliant les possibilités du réseau de signalisation.

Dans ce contexte, le cas de la protéine SOS (*son-of-the-sevenless*) est intéressant, puisqu'il révèle que la redondance observée à l'extérieur de la cellule pour des interactions ligand/récepteur (voir section précédente) est aussi présente dans le cytosol. En effet, le recrutement de SOS par les domaines cytoplasmiques des ErbB peut s'effectuer de plusieurs manières: soit par le complexe ErbB/Grb2, soit par le complexe ErbB/Shc/Grb2 (dans les deux cas, SOS interagit directement avec Grb2).

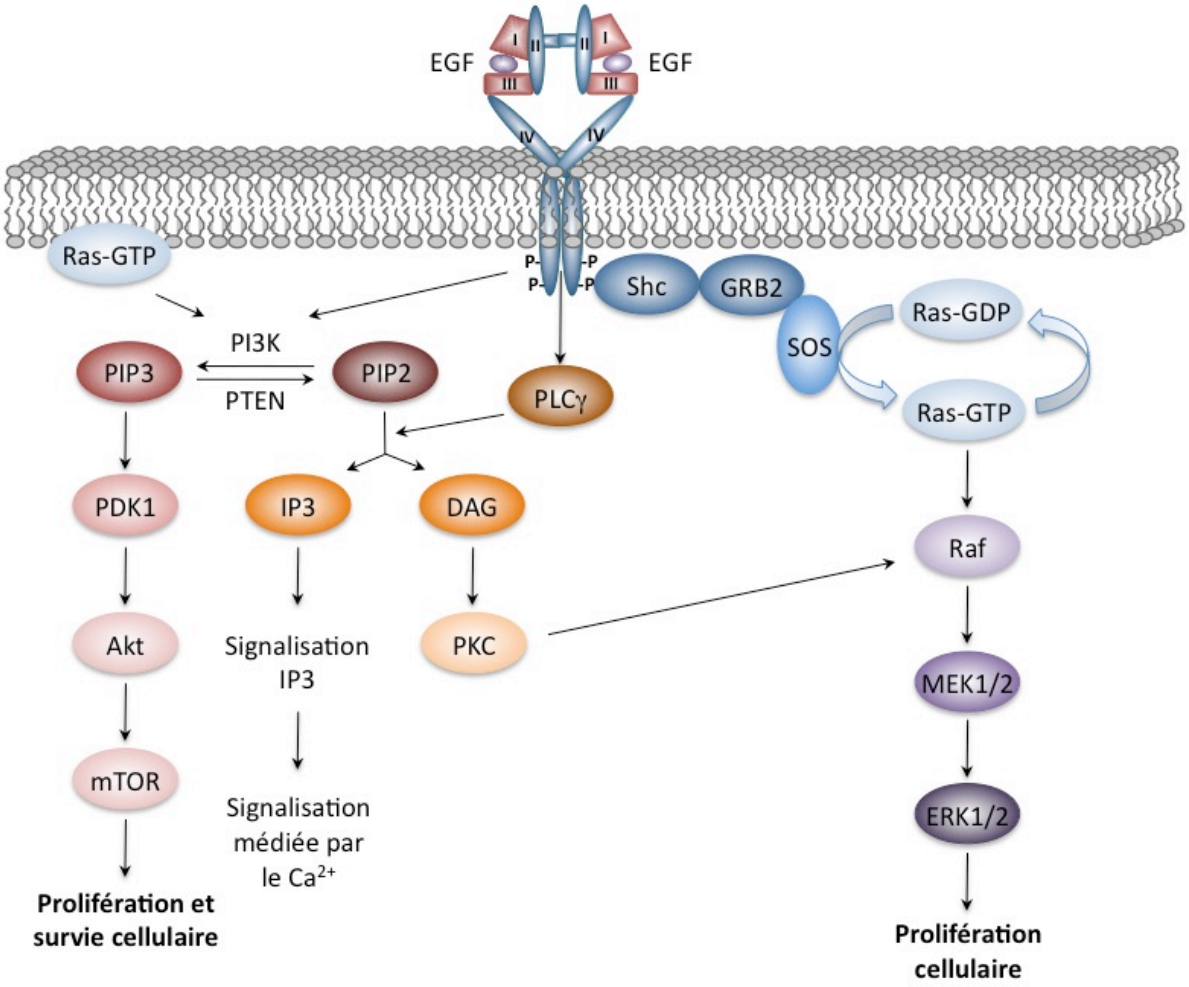

Figure 1.3 : Transduction des signaux initiée par le récepteur de EGF (EGFR).

L'interaction de EGFR avec ses ligands entraine l'activation de nombreuses voies de signalisation cellulaire dont celles des MAPK, de la PI3K et de la PLCγ.

Le recrutement de SOS constitue une des étapes clefs d'une des voies de signalisation fondamentales initiée par les récepteurs ErbB ainsi qu'un grand nombre de RTK, à savoir la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Cette voie de signalisation se base sur l'activation d'une cascade de phosphorylation impliquant plusieurs kinases et qui culmine par la phosphorylation de Erk1 et 2 (*extracellular signal-regulated kinase*, Figure 1.3). Dans leur état phosphorylé, Erk1 et 2 peuvent migrer dans le noyau de la cellule où elles catalysent alors la phosphorylation de facteurs de transcription, régulant ainsi l'expression génique. L'activation de la voie des MAPK par EGF a été reliée à une augmentation de la prolifération pour les cellules PC12 de rat provenant de glandes surrénales, alors que son activation plus soutenue via NGF (*nerve growth factor*) promeut la différenciation cellulaire de ces mêmes cellules (Marshall 1995; Traverse et al. 1994).

Deux autres voies de signalisation majeures sont aussi activées par les différents ErbB. La voie de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K, Figure 1.3), reconnue pour favoriser la prolifération et la survie cellulaires (via l'inhibition des caspases responsables de l'apoptose), est l'une d'entre elles. L'enzyme PI3K de classe Ia catalyse la phosphorylation du phosphatidylinositol-3,4-diphosphate (PIP_2) pour produire du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP_3), un messager secondaire qui promeut la localisation de l'enzyme Akt (une kinase spécifique pour les thréonines et tyrosines) à la membrane cellulaire où cette dernière est phosphorylée (Figure 1.3). L'activation de PI3K peut avoir lieu de diverses façons : soit par une interaction directe entre la région cytoplasmique de ErbB3 et la sous-unité p85 de PI3K ou, de façon indirecte, par un complexe protéique comprenant ErbB1, Grb2 et Gab1 (Schlessinger 2004), illustrant une fois de plus la redondance omniprésente dans le mécanisme de transmission de l'information par la famille des ErbB.

Enfin, la voie de signalisation de la phospholipase C-γ (PLCγ) peut aussi être activée par recrutement direct de cette enzyme par ErbB1. Une fois activée par phosphorylation, PLCγ catalyse l'hydrolyse de PIP_2 pour donner deux types de messagers secondaires : l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) et le diacylglycérol (DAG). Le premier contrôle le relargage d'ions Ca^{2+} et donc l'activité des enzymes calcium-dépendantes. Le deuxième est un cofacteur qui favorise le recrutement de PKC (*protein kinase C*), une kinase spécifique aux sérines et thréonines, présente à la membrane cytoplasmique (Figure 1.3).

1.2.2.1 Atténuation des voies de signalisation des ErbB

Toutes les protéines recrutées par les différents ErbB n'ont pas un rôle positif lors de la propagation des signaux. En fait, plusieurs phosphatases (enzymes catalysant la déphosphorylation des protéines) contiennent aussi des domaines SH2 et sont activées lorsque recrutées par les récepteurs, modulant ainsi le niveau de phosphorylation de ces derniers ainsi que celui de leurs effecteurs principaux (den Hertog et al. 2008; Ostman and Bohmer 2001). Ce mécanisme de contrôle est commun à la plupart des RTK et est crucial pour le contrôle des processus de migration et d'adhésion cellulaire, notamment au niveau vasculaire (Kappert et al. 2005). Cependant, dans le cas de ErbB1, mais, de façon intéressante pas pour les autres récepteurs de la famille des ErbB, le mécanisme principal d'atténuation des signaux se base sur l'internalisation et la redirection des complexes ligand/récepteur vers les compartiments endosomaux (Baulida et al. 1996).

Ainsi, une activation forte des voies de signalisation de ErbB1 par un apport constant de EGF est atténuée dans l'espace de quelques heures via l'internalisation des récepteurs. Ce mécanisme requiert la formation de complexes spécifiques et riches en clathrine à la surface cellulaire, le recrutement de plusieurs protéines (dont Eps15) permettant l'invagination de la membrane et la formation de vésicules qui rejoignent les endosomes précoces. L'environnement acide de ces vésicules altère l'interaction entre récepteurs et ligands, permettant ainsi leur triage soit vers les lysosomes (voie de dégradation) soit vers la surface cellulaire (voie de recyclage). Dans ce contexte, il apparait que l'association entre ligands et récepteurs est le principal facteur gouvernant le triage : EGF reste lié à ErbB1 en milieu acide, ce qui favorise la dégradation alors qu'une interaction plus faible entre TGF-α et ErbB1 (à pH acide) favorise la dissociation du complexe et le recyclage des récepteurs (French and Lauffenburger 1996; French and Lauffenburger 1997; French et al. 1994; French et al. 1995).

1.2.2.2 Intégration des voies de signalisation

Considérant la grande variété des réponses cellulaires émanant de l'activation des ErbB, il peut sembler surprenant, *a priori*, que les différents complexes ligand/récepteur formés à la surface cellulaire convergent principalement vers l'activation des trois voies de signalisation majeures que nous venons de décrire. Cette constatation est en effet difficile à concilier avec les résultats de multiples études *in vitro* et *in vivo* qui indiquent que les différents ligands et récepteurs ont des rôles bien distincts au sein de l'organisme (Yarden and Sliwkowski 2001). Ce serait oublier l'incroyable diversité des boucles de rétrocontrôles positifs et négatifs qui régulent la phosphorylation des différents effecteurs de ces voies (leur description exhaustive

outrepasserait le cadre de cette revue de littérature), l'influence du compartimentage cellulaire (voir section précédente), les interconnexions étroites qui existent entre les différents ErbB ainsi que les échanges croisés (*crosstalk*) avec d'autres systèmes de ligand/récepteurs.

Un des meilleurs exemples d'intégration des voies de signalisation activées par différents ErbB nous a été fourni récemment par Li et collègues (Li et al. 2009). En effet, ces derniers ont montré que PLCγ1 se lie directement à Rac1 (une GTPase de la famille de Rho) pour activer cette première. Alors que l'importance de l'activation simultanée des voies de signalisation de PLCγ et de la famille des Rho GTPases était connue dans les processus de remodelage du cytosquelette et de la migration cellulaires, Li *et al*. ont ainsi démontré que ces processus nécessitent une interaction directe entre les effecteurs de deux voies de signalisation distinctes, toutes deux activées par les récepteurs ErbB.

En ce qui a trait aux 'échanges croisés', le meilleur exemple réside dans les phénomènes de transactivation engendrés par différentes classes de récepteurs couplés aux protéines G (*G protein-coupled receptors* ; GPCR). Les exemples les plus documentés sont les cas où les GPCR sont capables d'utiliser les récepteurs EGF comme partenaires en aval afin de générer des signaux mitogéniques (Fischer et al. 2003). Ce mécanisme de transactivation peut se résumer ainsi : suite à leur activation, les GPCR modulent la production et l'activité de metalloprotéases responsables du clivage de la forme transmembranaire de EGF et donc la libération de sa forme bioactive. EGF ainsi relargué peut activer de façon locale les voies de signalisation qui lui sont propres (MAPK et PI3K) via l'activation de ses récepteurs. Une action synergique entre les voies propres aux GPCR et aux récepteurs ErbB est ainsi possible.

Le cas de c-Src, une kinase spécifique pour les tyrosines, reconnue pour augmenter la transformation et la prolifération des fibroblastes et cellules épithéliales en réponse à EGF est

plus ambigu. En effet, son rôle en aval de l'activation du récepteur EGF, ou alternativement, en parallèle de l'activation de ce dernier est moins clair. L'association directe de c-Src avec ce récepteur ErbB a été documentée pour les cellules épithéliales A-431 ; c-Src phosphoryle le domaine cytoplasmique du récepteur EGF sur au moins quatre tyrosines distinctes. Alors que la phosphorylation de la tyrosine Y^{891} crée un site de liaison favorisant le recrutement de c-Src elle-même, il a été suggéré que la phosphorylation de la tyrosine Y^{845} augmentait l'activité kinase du récepteur EGF et indirectement son potentiel mitogénique. Cependant c-Src catalyse aussi la phosphorylation de Y^{920}, créant ainsi un site de liaison pour p85, une sous-unité de PI3K, multipliant ainsi les interconnexions entre différentes voies de signalisation.

La prise de conscience de toutes les interconnexions entre les voies de signalisation propres aux ErbB ainsi que les différents mécanismes de contrôle de ces voies ont incité l'implémentation de nouvelles approches théoriques provenant du domaine de la biologie des systèmes (*system biology*) afin de mieux comprendre, et possiblement prédire, les résultats de l'activation des récepteurs ErbB dans un contexte cellulaire défini. Comme souligné par Citri et Yarden (Citri and Yarden 2006), une telle approche est justifiée puisque les différentes espèces impliquées dans ces voies de signalisation constituent un réseau dit 'en nœud de cravate' ou en forme de 'sablier' dont l'architecture ressemble fortement à celles des systèmes biologiques les plus robustes. Dans cette optique, la grande redondance observée à chaque niveau de la signalisation ainsi que la nature modulaire de l'organisation du réseau lui confèrent une grande robustesse (Citri et al. 2006). Cette approche a été adoptée par quelques laboratoires et a mené au développement de plusieurs modèles *in silico*, plus ou moins complexes (Aldridge et al. 2009; Lazzara and Lauffenburger 2009; Saez-Rodriguez et al. 2009; Samaga et al. 2009) (ne prenant en

compte que les voies de signalisation activées par ErbB1 (Schoeberl et al. 2002), par les quatre récepteurs ErbB (Chen et al. 2009) ou encore les échanges croisés existants avec d'autres systèmes récepteur/ligand (Aldridge et al. 2009)).

Les travaux de Schoeberl et collègues qui se basent sur *i)* l'utilisation d'un modèle dynamique *in silico* dans lequel les différentes voies de signalisation activées par ErbB1 sont décrites par un système de 94 équations différentielles ordinaires (Schoeberl et al. 2002), ainsi que *ii)* sur la mesure expérimentale des niveaux protéiques cellulaires (technologie des micropuces à protéines) (Nielsen et al. 2003), suggèrent fortement que la grande diversité des réponses cellulaires observées d'un type cellulaire à un autre, ne sont pas dues à une différence de la topologie du réseau mais plutôt à une différence de niveau d'expression de ces composants (Schoeberl et al. 2006).

1.2.2.3 Considérations temporelles et spatiales de la signalisation par les ErbB

Les données expérimentales recueillies sur l'activation des différentes voies de signalisation cellulaire par l'addition ponctuelle d'EGF soluble indiquent que les processus impliqués sont très rapides et transitoires. Ces observations sont en accord non seulement avec les constantes cinétiques déterminées pour les différentes interactions macromoléculaires impliquées dans les voies de signalisation décrites précédemment mais aussi avec les différentes prédictions établies grâce aux modèles dynamiques *in silico* récemment proposés (Schoeberl et al. 2002). A titre d'exemple, il a été prédit (Schoeberl et al. 2002) et vérifié expérimentalement (Saso et al. 1997) que la phosphorylation de tous les récepteurs ErbB1 présents à la surface cellulaire était atteinte en 15 s pour une concentration de EGF soluble ajoutée de 10 nM. La

phosphorylation de Erk1 et 2 de la voie des MAPKs atteint son maximum 20 min après addition de EGF (100 ng/mL) et n'est plus détectable après 2 h (pour les cellules PC12). Des profils très similaires quant à la phosphorylation de Erk 1 et 2 ont aussi été rapportés pour des cellules épithéliales de cornée après ajout de 4 nM d'EGF (Wang et al. 2009; Xu et al. 2002), ou encore pour des fibroblastes d'une lignée immortalisée 3T3 (Zhang et al. 2002). Dans cette même lignée, la phosphorylation de Akt (effecteur de la voie des PI3K) est aussi transitoire (durée de moins de 30 min) (Zhang et al. 2002). D'un point de vue spatial, l'internalisation des complexes ligand/récepteur ne marque pas la fin de leur capacité à activer la signalisation. En effet, plusieurs études ont démontré que les récepteurs ErbB1 étaient toujours phosphorylés dans l'endosome (Kay et al. 1986; Lai et al. 1989a; Lai et al. 1989b; Wada et al. 1992). Ces récepteurs, ayant accès aux diverses protéines cytosoliques impliquées dans les voies de signalisation, notamment la voie des MAPK, pourraient prolonger l'activation de ces voies une fois les complexes ligand/récepteur internalisés (Di Guglielmo et al. 1994).

1.2.3 Autres facteurs de croissance et peptides utilisés

De part les différentes applications envisagées en ingénierie tissulaire (réendothélisation du lumen et réépithélialisation de la partie abluminale des prothèses vasculaires, développement de substitut de cornée …), divers facteurs de croissance autres que ceux de la famille de EGF mais dont les récepteurs appartiennent cependant à la famille des RTK, ont déjà été immobilisés dans le but d'induire la régénération de tissus ou d'organes spécifiques. Citons notamment les ligands des familles de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et FGF (*fibroblast growth factor*).

Les facteurs de croissance de la famille de VEGF sont des protéines homodimériques de taille variant entre 34 et 42 kDa. Cinq isoformes composent la famille : $VEGF_{121}$, $VEGF_{145}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{189}$ and $VEGF_{206}$; tous peuvent se lier à deux récepteurs distincts, VEGFR1 et VEGFR2 (Ferrara and Henzel 1989; Matsumoto and Claesson-Welsh 2001) essentiellement présents à la surface des cellules endothéliales (Leung et al. 1989; Ribatti 2004). Ce facteur de croissance joue un rôle prépondérant durant l'angiogénèse (Nissen et al. 1998; Ribatti 2004). Son immobilisation, le plus souvent de manière non orientée sur différents types de supports biocompatibles tel que le polytétrafluoroéthylène (PTFE), a maintenu sa capacité à promouvoir l'adhésion, la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Backer et al. 2006; Crombez et al. 2005; Ito et al. 2005; Sharon and Puleo 2008; Shen et al. 2008; Steffens et al. 2004).

FGF, quant à lui, appartient à une famille de facteurs de croissance composée de 23 membres ayant des poids moléculaire compris entre 17 et 34 kDa. Ces derniers interagissent avec différentes affinités avec quatre récepteurs transmembranaires distincts (FGFR1-4) (Baird et al. 1986; Gospodarowicz et al. 1987; Gospodarowicz et al. 1986; Lobb et al. 1986; Maciag et al. 1984; Shing et al. 1984; Squires et al. 1988). Ce facteur de croissance est lui aussi reconnu pour jouer un rôle majeur dans l'angiogénèse (Browning et al. 2008; Zittermann and Issekutz 2006) ou dans les mécanismes de réparation suite à une blessure (Virag et al. 2007; Zakrzewska et al. 2008). FGF-2 est l'isoforme qui a essentiellement été utilisé dans des stratégies d'immobilisation. Son greffage sur des hydrogels à base de gélatine ne semble pas altérer son activité biologique et permet de promouvoir la formation de vaisseaux sanguins (Layman et al. 2008).

Le tripeptide Arginine-Glycine-Acide aspartique (RGD) correspond à une séquence d'acides aminés présente dans la fibronectine, un autre composant de la matrice extracellulaire. Ce petit motif est le plus efficace et le plus fréquemment utilisé afin de favoriser l'adhésion des

cellules en raison de son rôle de domaine de liaison aux récepteurs cellulaires surfaciques (intégrines) (Jung et al. 2008; Pierschbacher and Ruoslahti 1984). Il a d'ailleurs été mainte fois utilisé avec succès afin de promouvoir l'adhésion de cellules sur des biomatériaux. Par exemple, RGD greffé sur du polyéthylène téréphthalate (PET) ou de l'acide polylactique (PLA) promeut l'adhésion d'ostéoblastes (Chollet et al. 2007; Ho et al. 2005). Dans la même optique, le peptide RGD immobilisé sur du dextrane carboxy-méthylé favorise l'adhésion de cellules endothéliales, et RGD lié à des hydrogels à base de polyéthylène glycol (PEG) augmente la migration des fibroblastes (DeLong et al. 2005).

1.3 Les biomatériaux

Les biomatériaux sont utilisés en médecine depuis plusieurs dizaines d'année. Afin de tenir compte de l'essor et de la diversification accrue des domaines de l'ingénierie tissulaire, des nanotechnologies et de la médecine régénératrice, la définition d'un biomatériau donnée en 1999 par Williams, c'est-à-dire 'un matériau placé à l'interface d'un système biologique afin d'évaluer, de traiter, d'augmenter ou de remplacer des tissus, des organes ou des fonctions de l'organisme' (Cannon et al. 2004) a du être modifiée en 2009. Cette dernière considère qu'un biomatériau est une substance conçue pour prendre une forme qui, seule ou dans le cadre d'un système complexe, est utilisée pour diriger, par le contrôle des interactions avec des composants de systèmes vivants, le déroulement de tout processus thérapeutique ou procédure diagnostique chez l'homme ou en médecine vétérinaire (Williams 2009). Les biomatériaux se doivent d'être non toxiques et biocompatibles; c'est-à-dire capables de remplir une fonction désirée dans le cadre d'une thérapie

sans provoquer d'effets indésirables locaux ou systémiques pour le patient. Les biomatériaux doivent ainsi aider à supporter des thérapies en engendrant une réponse cellulaire ou tissulaire spécifique et désirée (voire optimale) afin d'améliorer l'issu de ce processus (Williams 2008). En fonction de leurs caractéristiques (structure, propriétés chimiques), les biomatériaux ont des applications distinctes. Certains d'entre eux ont d'ailleurs déjà été approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour utilisation dans un contexte spécifique. Citons notamment le polyéthylène téréphtalate (PET) composant du Dacron®, le polymère de polylactide-co-glycolide (composant du Dermagraft) ou des matériaux d'origine naturelle comme le collagène (composant de l'Apligraf™). Dans les sections suivantes, les différentes familles de biomatériaux seront présentées succinctement ; nous nous intéresserons plus particulièrement aux différentes familles de polymères employés dans le cadre de stratégies basées sur l'immobilisation de macromolécules biologiques. Il est toutefois important de souligner que cette revue des différents biomatériaux n'est pas exhaustive ; les métaux ou les céramiques n'y seront pas abordés.

1.3.1 Les polymères d'origine naturelle

La plupart des polymères d'origine naturelle utilisés comme biomatériaux sont des composants de la matrice extracellulaire (Seeherman and Wozney 2005) et sont *de facto* biocompatibles. Ils peuvent être regroupés en deux catégories : les polymères d'origines protéique et polysaccharidique (Malafaya et al. 2007).

1.3.1.1 Les polymères d'origine protéique

Le collagène, qui est le composant majeur de la matrice extracellulaire, joue un rôle structural de prime importance dans les tissus des mammifères (Lee et al. 2001; Malafaya et al. 2007; Yoon and Fisher 2006). Il en existe plus de 20 types connus ; le collagène de type I étant le plus abondant et le plus utilisé pour des applications en génie biomédical (Malafaya et al. 2007). Le collagène est composé de trois chaines polypeptidiques comprenant chacune un motif répété 'glycine-A-B' (où A et B désignent des acides aminés correspondant le plus souvent à des prolines ou hydroxyprolines). Ces chaînes s'entrelacent pour former une hélice. Ce polymère participe à la régulation de l'adhésion cellulaire, à la migration, à la prolifération et à la différenciation de tissus conjonctifs comme la peau, les tendons et les os (Lee and Mooney 2001; Malafaya et al. 2007). Le collagène a souvent été utilisé en ingénierie tissulaire en raison de ses propriétés attrayantes (biodégradabilité, biocompatibilité et faible antigénicité) et parce qu'il est aisément modifiable par voie chimique (Lee and Mooney 2001). Du collagène couplé à de l'hydroxyapatite a, par exemple, déjà été proposé comme substitut osseux (Chajra et al. 2008). Afin d'aider la prolifération de certains types cellulaires à sa surface, des facteurs de croissance ont déjà été fixés sur ce biomatériau. Par exemple, l'immobilisation du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) sur du collagène favorise la prolifération de cellules endothéliales humaines de tissus ombilical (Markowicz et al. 2005). Il a également été utilisé sous différentes formes (gels, billes) en tant que revêtement biocompatible ou comme substitut de tissus mous qui peut protéger et jouer un rôle d'échafaudage pour les tissus endommagés (Lee and Mooney 2001; Malafaya et al. 2007).

La gélatine, quant à elle, est un polymère naturel dérivé du collagène. Elle correspond à un polymère protéique obtenu par traitements acide et basique du collagène. Par conséquent, ses propriétés sont similaires à celles de ce dernier (biocompatibilité, biodégradabilité). Le collagène a toutefois un plus fort degré antigénique comparé à la gélatine en raison de l'altération de sa conformation tridimensionnelle par des traitements chimiques. La gélatine est plus communément utilisée pour des applications pharmaceutiques et biomédicales (Malafaya et al. 2007). En ingénierie tissulaire, la gélatine est habituellement employée sous forme de microsphères intégrées dans des hydrogels pour permettre ainsi le relargage de facteurs de croissance tels que le facteur de croissance transformant β (TGFβ) ou des fibroblastes (FGF) (Holland et al. 2003; Holland et al. 2005; Holland et al. 2004). La gélatine peut également être directement utilisée sous forme d'hydrogel et la fixation de protéines d'adhésion telles que la fibronectine à sa surface favorise le recrutement et la prolifération cellulaire (Ito et al. 2003).

La fibrine est produite à partir du fibrinogène et est connue pour améliorer les interactions cellulaires. Elle est utilisée en tant que transporteur pour la livraison de molécules biologiquement actives aux cellules et a été utilisée sous forme de gels après immobilisation de facteurs de croissance (FGF-2, VEGF, NGF (*nerve growth factor* : facteur de croissance des cellules nerveuses)) pour la réparation des os ou de la peau (Malafaya et al. 2007). La fibrine est également utilisée dans des stratégies d'encapsulation. En effet, il a été rapporté que des cellules encapsulées dans des gels de fibrine produisent d'avantage de collagène (Grassi et al. 2002; Neidert et al. 2002) et d'élastine (Long and Tranquillo 2003) que des cellules encapsulées dans des gels de collagène.

1.3.1.2 Les polymères polysaccharidiques

Parmi ceux-ci, le chitosane, un copolymère linéaire composé de D-glucosamines liés en β (1–4) et de N-acétyl-glucosamines (Figure 1.4) obtenu après N-désacétylation (>50%) de chitine naturelle (Huang et al. 2005), est de plus en plus étudié depuis les dix dernières années. Le chitosane est caractérisé par son degré de désacétylation (DD) et sa masse moléculaire. Généralement, le DD du chitosane commercial est compris entre 70 et 95% et sa masse moléculaire comprise entre 10 et 10000 kDa (George and Abraham 2006). Ses propriétés (biodégradabilité, effets biologiques) sont très dépendantes du rapport N-acétyl-glucosamine / D-glucosamine (Liu et al. 2002). Ce polymère est biocompatible, possède un faible degré d'antigénicité et favorise l'adhésion et la croissance cellulaire (Muzzarelli 1993; Prasitsilp et al. 2000; Risbud et al. 2001). L'effet du pH sur sa solubilité explique en grande partie l'engouement pour ce polymère : le chitosane est soluble à des pH plus bas ou avoisinant 6,5 alors qu'il forme un gel hydraté à de plus hauts pH, notamment à pH physiologique (Chenite et al. 2001). Il faut également noter que le DD agira sur la solubilité du polymère, puisque plus le chitosane sera désacétylé, moins il sera soluble (Filion et al. 2007; Varum et al. 1994). Le chitosane est utilisé en médecine régénératrice pour des applications variées telles que la réparation du cartilage (Hoemann et al. 2005), la livraison de protéines (Wu et al. 2009) ou d'acides nucléiques (ADN et ARN) (Lai and Lin 2009). Toutes ses propriétés favorisent son utilisation en ingénierie tissulaire, entre autres pour le relargage de facteurs de croissance préalablement immobilisés tels que EGF (Demolliens et al. 2008; Wu et al. 2009).

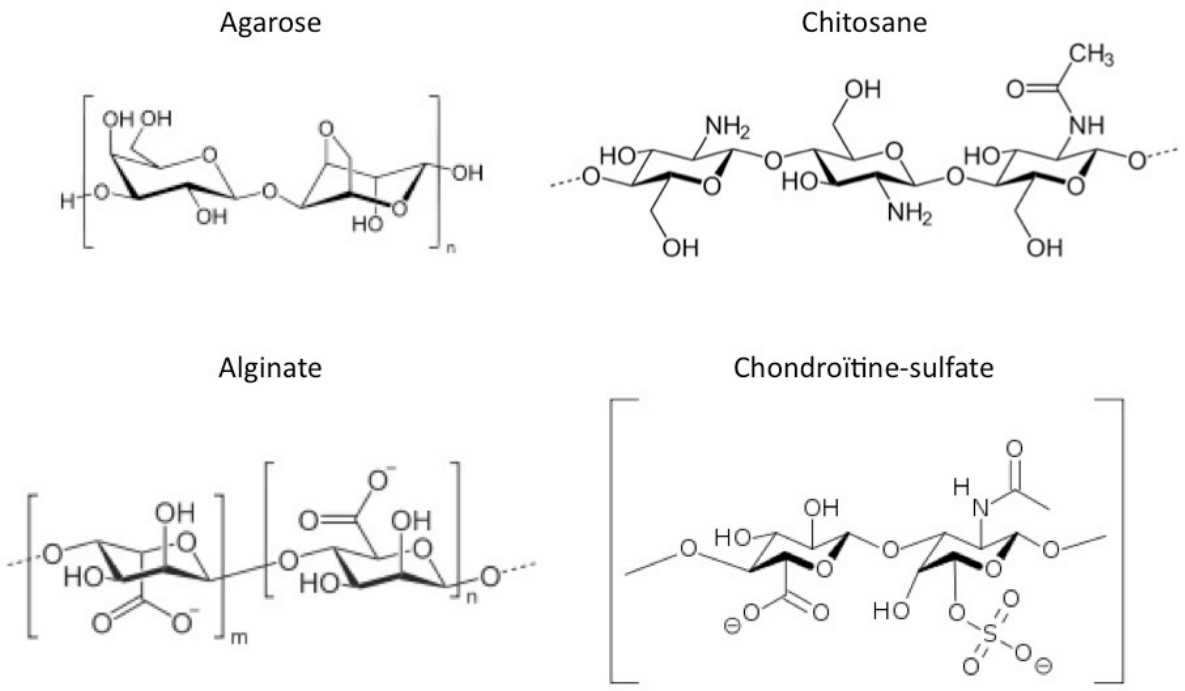

Figure 1.4 : Représentation des unités répétées de divers polymères polysaccharidiques.

L'agarose est un polysaccharide isolé extrait d'algues rouges. Ce polymère est composé de 3,6 anhydro-α-L-galactose et de β-D-galactose (Figure 1.4) (Lee and Mooney 2001; Yoon and Fisher 2006). L'agarose est couramment utilisé sous forme d'hydrogel pour cultiver plusieurs types cellulaires *in vitro* (Vinall et al. 2002) ainsi que dans le cadre de la réparation du cartilage en raison de ses effets bénéfiques sur les chondrocytes (expression de collagène de type II et de protéoglycanes) (Hung et al. 2003; Rahfoth et al. 1998; Vinall et al. 2002). L'agarose a également été utilisé en tant matrice pour la régénération nerveuse (Dillon et al. 1998; Yoon and Fisher 2006). L'alginate est également extrait d'algues brunes. Ce polymère est un polyanion composé d'unités monomériques répétées de β-D-mannuronate et d'α-L-guluronate (Figure 1.4). La proportion respective de ces unités influence ses propriétés chimiques et physiques. Tout comme le chitosane, la solubilité de l'alginate varie en fonction du pH et ce polymère est souvent utilisé sous forme d'hydrogels pour le relargage de molécules actives. Son utilisation dans un contexte de réparation du cartilage (Jenniskens et al. 2006; Masuda et al. 2006) ou de la promotion de l'angiogénèse (Gaissmaier et al. 2005; Malafaya et al. 2007; Tilakaratne et al. 2007) a été rapportée.

La chondroïtine-sulfate est un polymère de la matrice extracellulaire qui se compose d'unités disaccharidiques répétées d'acide D-glucuronique et de N-acétyl-galactosamine sulfaté en position 4 ou 6 (Figure 1.4). Ce polymère appartient à la famille des glycosaminoglycanes (GAG) que l'on retrouve dans le cartilage, le liquide synovial, les os ou les valves aortiques (Malafaya et al. 2007). La chondroïtine-sulfate est donc non-immunogène et promeut la prolifération, la différenciation et la migration de nombreux types cellulaires (chondrocytes, cellules endothéliales vasculaires, myoblastes…) (Lippiello 2003; Malafaya et al. 2007). La

chondroïtine-sulfate a notamment été utilisée afin de promouvoir la réparation du cartilage après l'immobilisation de TGFβ1 (Chou et al. 2006) ainsi qu'en tant que revêtement bioactif améliorant l'adhésion et la prolifération cellulaires.

1.3.2 Les matrices acellulaires

Les matrices acellulaires utilisées dans un contexte d'ingénierie tissulaire sont d'origines diverses, le plus souvent porcine ou humaine (Pariente et al. 2005). Avant utilisation, les résidus cellulaires sont tout d'abord éliminés après des traitements chimiques et physiques afin d'enlever tout composant antigénique et donc d'empêcher tout risque de réaction inflammatoire. Ces matrices sont généralement bien acceptées par le corps humain (Adams and Steinmann 2007) et ont d'ailleurs déjà été utilisées pour la réparation de tissus urogénitaux, des os ou de la peau (Chai et al. 2007; Chen et al. 1999; El-Sabban et al. 2007). Leur utilisation pour promouvoir la néovascularisation (après immobilisation de facteurs de croissance tels que VEGF) a déjà été testée (Cartwright et al. 2006).

1.3.3 Les polymères synthétiques utilisés dans les applications vasculaires

Les polymères synthétiques représentent une bonne alternative aux polymères naturels car leur production à grande échelle est aisée et le contrôle de leurs propriétés mécaniques et physico-chimiques, ainsi que leur fonctionnalisation de surface, est possible (Yoon and Fisher 2006). Cependant, leur dégradation potentielle peut mener à des réactions indésirables

(Gunatillake and Adhikari 2003; Thomson et al. 1995). Les polymères synthétiques les plus communs dans les domaines de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénératrice sont les polyesters mais l'utilisation de polyanhydrides (Brem et al. 1995), polyphosphazènes (Gunatillake and Adhikari 2003; Laurencin et al. 1996) ou polyuréthanes (Zdrahala and Zdrahala 1999) est également rapportée.

1.3.3.1 Les polyesters

Les polyesters tels que le polyéthylène téréphtalate (PET) (Figure 1.5) sont fréquemment utilisés dans les applications biomédicales en raison de leurs propriétés physico-chimiques (Gunatillake and Adhikari 2003; Puskas and Chen 2004). Le PET est un polymère thermoplastique créé à partir de la condensation d'éthylène glycol avec de l'acide téréphtalique ou du diméthyl-téréphtalate (Puskas and Chen 2004). Les propriétés physiques du PET (Puskas and Chen 2004) sont déterminées par son degré de cristallinité. Il s'agit d'un matériau solide ayant une résistance à la traction de 170-180 MPa et un module d'élasticité d'environ 14 GPa (Harper 2000).

Le PET a été tout d'abord commercialisé par Dupont en 1930 en tant que Dacron®. Le Dacron® a notamment été utilisé pour la réalisation de greffons vasculaires afin de permettre la reconstruction de vaisseaux sanguins (Puskas and Chen 2004). Il possède de très bonnes propriétés mécaniques mais ne peut être considéré comme un élastomère (Puskas and Chen 2004). Il est généralement utilisé sous forme tissée ou tricotée afin d'améliorer sa résistance à la torsion et d'obtenir ainsi de meilleurs rendements au niveau de la flexibilité. La durée de vie approximative de ces greffons vasculaires n'est cependant que de deux ans, leur utilisation

nécessite le plus souvent une chirurgie additionnelle afin de les remplacer (Bakker et al. 1990; Tomizawa 1995). Dans le cadre des implants vasculaires (Tableau 1.1), le PET permet notamment une bonne rétention de cellules endothéliales lorsque ces dernières sont soumises à des forces de cisaillement (Wong et al. 2006). Cependant, l'utilisation de ce matériau en tant que prothèse artérielle a souvent été directement associée à des échecs précoces et tardifs des greffes en raison de complications telles que des hémorragies, des anévrismes et surtout de la dilatation des greffons qui affectent la conformité (*compliance*) du biomatériau (Bakker et al. 1990; Puskas and Chen 2004). L'allongement et la dégradation de ce polymère peuvent également provoquer une déformation permanente de celui-ci entraînant donc sa dilatation (Puskas and Chen 2004). Ces facteurs ne sont que quelques-uns des mécanismes physiques et chimiques impliqués dans les processus de dégradation liés aux greffes en polyester. La modification de leur structure chimique pourrait améliorer leurs futures utilisations dans le domaine biomédical (Bakker et al. 1990) car leurs surfaces sont généralement hydrophobes et ne favorisent pas la fixation des cellules (Jiao and Cui 2007). Il a été souvent proposé de modifier la surface de ces polymères pour permettre l'introduction de groupements fonctionnels tels que des amines primaires. L'immobilisation de composés bioactifs grâce à ces fonctions permettrait d'augmenter la réponse cellulaire (Jaumotte-Thelen et al. 1996; Lee et al. 2003; Zhu et al. 2008). Certaines molécules telles que le collagène ont d'ailleurs déjà été fixées sur ce matériau afin de le rendre plus imperméable (Bisson et al. 2002; Marois et al. 1996). Dans un contexte vasculaire, la fixation de collagène peut aider à stimuler la croissance cellulaire mais également à retarder le dépôt de plaquettes (lors du processus de guérison dans des modèles canins par exemple) (Chlupac et al. 2009; Guidoin et al. 1996). De plus, il a été démontré que la fixation de collagène ne stimule pas davantage la cascade de la coagulation qu'une approche plus conventionnelle basée sur l'utilisation de Dacron® seul (De Mol Van Otterloo et al. 1991). La fonctionnalisation de ce

matériau avec des molécules biologiquement actives peut ainsi améliorer ses propriétés pour différentes approches *in vivo*.

1.3.3.2 Les polymères fluorés

Le polymère fluoré le plus utilisé est le polytétrafluoroéthylène (PTFE) mieux connu sous le nom de téflon (Figure 1.5). Le PTFE est synthétisé à partir de tétrafluoroéthylène sous pression avec un catalyseur (peroxyde) en présence d'excès de vapeur pour éliminer la chaleur dégagée par la réaction (Puskas and Chen 2004). Le téflon est un polymère linéaire, sa structure hautement compacte donne une molécule très rigide, son point de fusion cristallin est élevé et il possède une bonne stabilité thermique (Puskas and Chen 2004). Ces propriétés élastiques diffèrent de celles du PET avec une résistance à la traction de 14 MPa et un module d'élasticité d'environ 0,5 GPa (Puskas and Chen 2004). Le PTFE est un matériau solide et souple possédant une excellente résistance à la chaleur et aux produits chimiques. Il est également un bon isolant électrique et hautement hydrophobe (Puskas and Chen 2004). Ce biomatériau est utilisé pour la fabrication de prothèses, notamment de greffons vasculaires (Tableau 1.1). Le PTFE a été breveté en 1937 par Dupont sous le nom de Teflon® alors que le ePTFE (PTFE expansé) a été breveté en 1969 par Gore en tant que Gore-Tex® (Chlupac et al. 2009). Le ePTFE est un polymère expansé, qui est fabriqué par un processus de chauffage, d'étirement et d'extrusion (Chlupac et al. 2009). Le PTFE est relativement biostable, c'est-à-dire moins sujet à la détérioration dans un environnement biologique que le PET (Guidoin et al. 1993). De plus, la surface du PTFE est électronégative, ce qui diminue les possibles interactions avec les macromolécules sanguines. Il se compose de fibres et de nœuds lui conférant une structure filamenteuse. Sa porosité est

d'ailleurs décrite par la distance internodale (DIN) qui est habituellement comprise entre 30 et 90 µm.

La réponse de l'organisme au ePTFE de faible porosité (DIN de 30 µm) est similaire à celle obtenue pour des biomatériaux constitués de Dacron®. Après implantation de greffons vasculaires en PTFE, de petits caillots de fibrine ou de matériaux amorphes riches en plaquettes se développent à leur surface au cours du temps et un rétrécissement de la lumière endothéliale du vaisseau est observé après leur implantation chez l'homme (Guidoin et al. 1993). C'est pourquoi, la modification de leur surface pourrait améliorer leur biocompatibilité. Par exemple, il a été montré que l'immobilisation d'héparine sur du ePTFE limite les cas de thrombose chez l'homme (Bosiers et al. 2006). Le greffage combiné de FGF-1 (*fibroblaste growth factor-1*) et d'héparine sur du ePTFE améliore la capillarisation et l'endothélisation de ce polymère sans augmentation significative de l'hyperplasie intimale dans un modèle aortique canin (Chlupac et al. 2009; Gray et al. 1994).

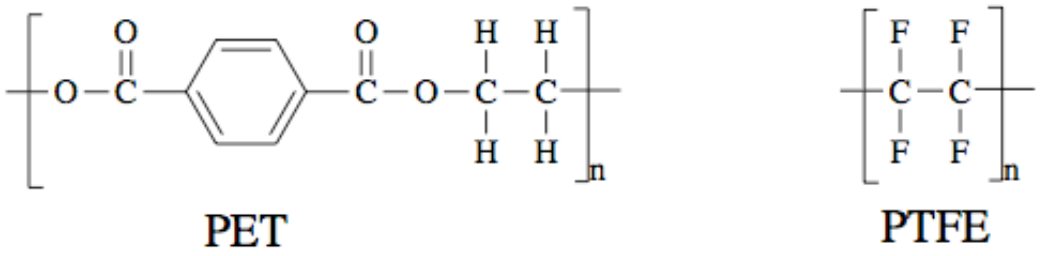

Figure 1.5 : Représentation des unités répétitives du PET et du PTFE.

Tableau 1.1 : Avantages, inconvénients et efficacité des différents types de PET et PTFE lorsque ces derniers sont utilisés pour la fabrication d'implants vasculaires (d'après (Chlupac et al. 2009)).

	PET (Dacron)		PTFE (Téflon, Gore-Tex)	
	tissé	tricoté	Faible porosité (< 30 µm DIN)	Forte porosité (> 45 µm DIN)
Avantages	Meilleure stabilité, faible perméabilité, moins de saignements	Grande porosité, Interposition de tissus et distension radiale	Biostabilité, pas de dilatation au cours du temps	Biostabilité, Meilleure apposition des tissus
Inconvénients	Diminution de la compliance et l'incorporation de tissus, faible porosité, Effilochement sur les bords, risques d'infection	Dilatation au cours du temps, risques d'infection	Incorporation limitée, risques d'infection	Désquamation néointimale tardive dans les 90 µm DIN, risques d'infection
Guérison	Capsule interne fibrineuse, capsule extérieure de collagène, îlots endothéliaux rares	Couverture luminale de fibrine, endothélium très sporadique	Formation de fibrine luminale et fixation de plaquettes, capsule de tissu conjonctif avec des cellules géantes entourant des corps étrangers	Invasion des macrophages et des polynucléaires, migration des fibroblastes, angiogenèse, néo-intima plus épaisse, endothélialisation chez les animaux

1.3.4 Les polymères synthétiques utilisés pour la génération de cornées artificielles

La génération de cornée artificielle peut actuellement être effectuée de deux manières, soit par l'utilisation de kératoprothèses, soit par le développement d'équivalents cornéens générés par ingénierie. La grande disponibilité de polymères synthétiques fait des kératoprothèses la voie actuellement privilégiée dans la majorité des recherches actuelles. Cependant, à long terme, la génération d'équivalents cornéens par ingénierie tissulaire, imitant le comportement du tissu natif, et qui pourront être intégrés complètement et naturellement chez le patient jouera sûrement un rôle majeur dans les stratégies de traitement (Griffith et al. 2002).

Les kératoprothèses idéales devraient être flexibles, composées d'un noyau optique transparent entouré par une surface poreuse, et ce, afin de permettre la croissance de fibroblastes et le dépôt d'une quantité suffisante de collagène servant de point d'ancrage pour permettre l'intégration de la prothèse dans le tissu hôte. La surface poreuse doit également être suffisamment résistante pour permettre les sutures (Griffith et al. 2002). La surface postérieure de la prothèse devrait inhiber l'attachement et la prolifération cellulaire afin d'éviter son opacification due à la formation d'une membrane rétroprosthétique (Griffith et al. 2002). Au contraire, la surface antérieure de la prothèse devrait être capable de promouvoir la croissance des cellules épithéliales à confluence afin de fournir une protection naturelle contre les infections bactériennes (Klenkler et al. 2009). Cette étape est d'ailleurs problématique pour les prothèses actuellement développées, car, en l'absence de la migration et de la croissance sur la surface antérieure des biomatériaux servant de prothèse (Legeais and Renard 1998), un risque de nécrose

du tissu stromal est possible, ce qui peut conduire à l'extrusion de la prothèse de l'œil (Klenkler et al. 2008).

Les matériaux utilisés pour la fabrication de la portion optique de cette prothèse se doivent d'avoir un indice de réfraction similaire à celui de cornées normales et la partie optique doit permettre le transfert d'oxygène ainsi que la diffusion de nutriments (Sweeney et al. 1998). Aucun des matériaux utilisés lors de la fabrication de cette prothèse ne doit entrainer le déclenchement de réactions immunitaire ou inflammatoire.

De nombreux polymères synthétiques ont été étudiés dans le but de développer des kératoprothèses. Plusieurs études se sont basées sur l'utilisation d'hydrogels, et plus spécifiquement du poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) (pHEMA) (Hicks et al. 1997). La nature hydrophile de ce gel en fait un excellent candidat pour des applications en ingénierie tissulaire. Les bonnes propriétés de transparence et de transmission de la lumière ainsi que leur perméabilité aux nutriments sont autant d'avantages que ces supports possèdent pour des applications en ophtalmologie. Ce polymère est accepté dans 80% des cas pendant au moins un an par l'organisme (Myung et al. 2008). Bien que ces matrices aient été utilisées *in vivo*, un problème de calcification a pu être observé ce qui est un inconvénient majeur dans l'optique d'une intégration à long terme (Vijayasekaran et al. 2000). Cependant, ce type de supports présente une faible perméabilité au glucose (Arica and Hasirci 1993) et ne supporte pas un recouvrement total par des cellules épithéliales (Myung et al. 2008). Bien que les raisons n'en soient pas encore bien comprises, des cas de rejet par l'organisme ont été rapportés (Myung et al. 2008).

D'autres kératoprothèses basées sur l'utilisation de PTFE en tant que surface poreuse et de polyvinyl pyrrolidone (PVP) recouvert de polydiméthylsiloxane (PDMS) comme centre optique ont déjà été utilisées (Legeais and Renard 1998) en raison de la compatibilité de ce

dernier d'un point de vue ophtalmologique (Langefeld et al. 2000; Lee et al. 1996), de ces bonnes propriétés mécaniques et de sa haute perméabilité à l'oxygène (Klenkler et al. 2008; Lloyd et al. 2001). Cependant, un problème majeur est rencontré lors de l'utilisation de ce type de kératoprothèses. En effet, il n'est actuellement pas possible d'obtenir des surfaces de PDMS permettant un recouvrement intégral par des cellules épithéliales (Klenkler et al. 2009; Klenkler et al. 2005). Etant donné que ce polymère ne contient pas de groupements fonctionnels à sa surface, Klenkler *et al.* (Klenkler et al. 2008) ont proposé de fonctionnaliser ce polymère avec le facteur de croissance EGF (après traitement préalable de la surface par plasma) afin de promouvoir l'adhésion, la prolifération et la migration de cellules épithéliales à sa surface. En raison de leur stratégie basée sur le couplage de EGF par l'intermédiaire d'un bras espaceur en polyéthylène glycol (PEG, connu pour limiter l'adsorption de molécules d'adhésion), cette équipe n'a pas été capable d'obtenir une réépithélisation totale de ces surfaces.

Finalement, le poly(méthyl méthacrylate) (PMMA) est le polymère qui est actuellement le biomatériau le plus communément utilisé lors de greffes de cornées (Myung et al. 2008). Le PMMA est un plastique transparent mais imperméable qui est la base de la kératoprothèse de Dohlman-Doane (Aquavella et al. 2005; Doane et al. 1996). Cette kératoprothèse a été utilisée pendant de nombreuses années chez des patients ; elle peut être implantée de manière routinière et conservée au site d'implantation avec un minimum de complications (Aquavella et al. 2005; Doane et al. 1996). Cependant, dans certains cas, tout comme pour les autres polymères pouvant être utilisés dans les stratégies de greffes de cornées artificielles, certaines complications apparaissent, à savoir, la formation d'une membrane rétroprosthétique sur la face postérieure de la prothèse. Il faut également noter que tout comme les autres polymères utilisés lors des greffes de cornée, l'implantation de ces prothèses nécessite des chirurgies complexes. Ces dernières sont

continuellement associées à de forts risques de complications résultant d'une biointégration sous-optimale en raison de la rigidité ou la faible mouillabilité de la prothèse (Aquavella et al. 2005).

En résumé, pour des stratégies visant à soutenir la régénération tissulaire, l'utilisation de matériaux d'origine naturelle, de matrices acellulaires ou de polyesters est actuellement la voie préférée par de nombreuses équipes de recherche. Dans la grande majorité des cas cependant, les propriétés de surface de ces matériaux ne sont pas adéquates pour le site d'implantation. Ainsi, des modifications appropriées de leurs surfaces, sans toutefois altérer leurs propriétés mécaniques, sont mises en œuvre afin d'améliorer leur bio-reconnaissance par les cellules. Par exemple, l'introduction de groupements fonctionnels permettant l'immobilisation de biomolécules est une alternative souvent adoptée afin d'améliorer les propriétés du biomatériau (Ratner 1995). Pour ce faire, différentes méthodes basées sur la chimie humide ou de traitement au plasma (Gauvreau et al. 2004) sont couramment mises en œuvre afin d'ajouter à la surface des groupements fonctionnels (par exemple des fonctions amine ou carboxyl). Le greffage de molécules modifiant l'adsorption non spécifique de protéines tel que le polyéthylène glycol (PEG) ou le dextrane peut alors être envisagé en se servant de ces groupements fonctionnels (DeLong et al. 2005; Klenkler et al. 2005; Massia et al. 2000). Dans la section suivante, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux méthodes existantes permettant l'immobilisation de protéines à la surface des biomatériaux.

1.4 Stratégies et techniques utilisées pour l'immobilisation de protéines

Les stratégies développées dans les domaines de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénératrice afin d'immobiliser des protéines se sont essentiellement inspirées des techniques précédemment mises au point dans les différents domaines de la biochimie que sont:

i) la synthèse et la purification de protéines,

ii) les tests analytiques basés sur l'utilisation de plaques multi-puits (par exemple les ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), les micropuces à protéines (*protein arrays*) ou encore les biocapteurs.

Différentes méthodes d'immobilisation sont adaptables au cas des biomatériaux, à savoir l'adsorption, le couplage covalent non orienté ou l'immobilisation orientée de macromolécules protéiques.

1.4.1 L'adsorption de protéines

L'adsorption de protéines est la méthode la plus simple à mettre en œuvre afin d'immobiliser des protéines (Bilitewski 2006; Rusmini et al. 2007). Cette méthode est principalement basée sur l'établissement d'interactions intermoléculaires non covalentes, principalement les interactions ioniques ou hydrophobes, entre la surface et les macromolécules solubles. Elle ne nécessite qu'une simple mise en contact entre les protéines et le support. Cependant, trois limitations majeures sont inhérentes à cette stratégie. Tout d'abord, la

concentration de protéines adsorbées est fonction de la capacité de liaison de la surface et de la taille des protéines. De plus, les surfaces obtenues sont hétérogènes car ce type d'immobilisation est le plus souvent non contrôlé; la stabilité des surfaces (la rétention des molécules d'intérêt) varie d'une molécule à l'autre et dépend de l'hydrophobicité et de la charge de chacun des partenaires du couple biomolécule / surface. Enfin, l'activité biologique des macromolécules ainsi fixées peut être affectée en raison du caractère aléatoire de la méthode d'immobilisation (Kuhl and Griffith-Cima 1996) (Figure 1.6 A1 et A3). Quoique difficilement contrôlable, cette stratégie de couplage a fait ses preuves : ainsi, afin de favoriser l'endothélialisation de prothèses vasculaires, Crombez *et al.* ont rapporté l'immobilisation par adsorption de VEGF sur des surfaces de PTFE (Crombez et al. 2005) sur lesquelles de l'albumine sérique humaine (*human serum albumine*, HSA) avait été préalablement greffée de façon covalente. Dans cette étude, l'adsorption de VEGF a été attribuée principalement aux interactions électrostatiques entre les deux molécules (charges positives et négatives portées respectivement par VEGF et HSA à pH physiologique).

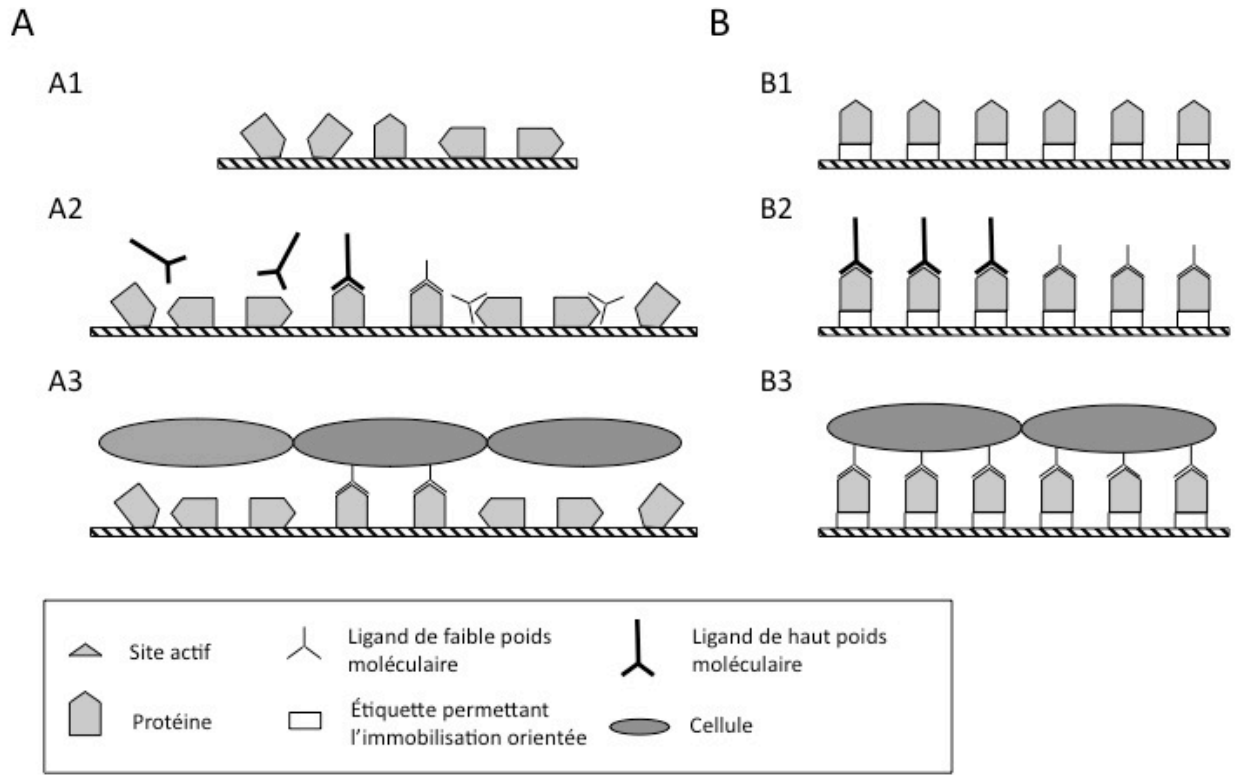

Figure 1.6 : Schématisation et comparaison des différentes stratégies permettant le greffage de protéines.

Représentation schématique d'un couplage aléatoire (adsorption ou couplage covalent) (A, A1) et d'une stratégie de couplage orientée (B, B1). Les ligands de faible poids moléculaire sont capables d'interagir avec la plupart des protéines immobilisées de manière non orientée (A2), alors que les ligands de hauts poids moléculaires ne le peuvent pas en raison de l'encombrement stérique. Lorsque les protéines sont immobilisées de manière orientée, quelque soit leur taille, les protéines peuvent interagir de manière optimale avec les ligands (B2). Pour de futures applications impliquant des protéines présentes à la surface cellulaire, la stratégie optimale semble être celle basée sur l'immobilisation orientée des protéines qui peuvent alors interagir de manière optimale avec les récepteurs à la surface des cellules (B3) contrairement aux méthodes de greffage non-orienté (A3).

1.4.2 L'immobilisation non-orientée covalente des protéines

Le greffage covalent de protéines peut être une alternative à l'adsorption afin de permettre leur fixation de manière stable. Habituellement, les stratégies employées se servent des groupements chimiques sur les chaînes latérales des résidus composant les protéines: les amines primaires (lysine et groupement amine libre du premier résidu de la protéine), les thiols (cystéine), les fonctions carboxyles (acides glutamique et aspartique, groupement carboxyliques libre du dernier résidu de la protéine) ou les alcools (sérine, thréonine, tyrosine) afin de créer un lien covalent entre les protéines et le support (Bilitewski 2006; Rusmini et al. 2007). Plusieurs études rapportent aussi l'utilisation d'un bras espaceur entre le support et la protéine afin de faciliter le greffage, comme le PEG (Klenkler et al. 2005).

L'approche la plus fréquemment employée en biotechnologie (Johnsson et al. 1991) et dans le domaine de l'ingénierie tissulaire est le couplage amine. Ce dernier repose sur l'activation des groupements carboxyliques (par exemple présents sur le support) grâce à l'action combinée de l'hydrochlorure d'éthyl-N′-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide et du N hydroxysuccinimide (EDC/NHS), qui favorisent la formation d'un lien amide avec les amines primaires portées par la protéine d'intérêt (De Crescenzo et al. 2008). Le couplage amine permet d'obtenir de hautes densités de recouvrement (si la densité des groupements fonctionnels sur la surface d'origine est assez élevée). Cependant l'homogénéité des surfaces obtenues est fonction de la protéine à immobiliser: la présence de plusieurs fonctions amine à la surface de cette dernière conduit en effet à l'obtention de plusieurs populations de protéines greffées (Figure 1.6A1 et 1.6A3). Ce manque de sélectivité envers les différents groupements amines de la protéine peut engendrer une perte de sa bioactivité si la lysine utilisée pour le couplage est importante lors de l'interaction de

la protéine avec son partenaire biologique. Un exemple probant d'une telle situation a été fourni par Vallieres et collègues pour le couplage covalent de la fibronectine (Vallieres et al. 2007). Plus préoccupant dans le contexte de cette thèse est le cas de TGF-α et de EGF humains, tous deux contenant des résidus lysines cruciaux lors de l'interaction de ces ligands avec le domaine extracellulaire de ErbB1 (De Crescenzo et al. 2000; O'Connor-McCourt et al. 1998). Dans le cas spécifique de EGF, le problème a le plus souvent été habilement contourné en utilisant l'homologue murin de ce ligand. Ce dernier ne possède aucun résidu lysine (son couplage par la voie des amines ne peut s'effectuer qu'avec l'amine primaire de sa partie N-terminale) (Kuhl and Griffith-Cima 1996). Des réponses cellulaires ont déjà été observées en présence d'EGF ainsi immobilisé. Par exemple, la prolifération de cultures primaires d'hépactocytes de rats est stimulée en présence d'EGF murin greffé de manière covalente alors que du EGF adsorbé n'engendre aucune réponse cellulaire (Kuhl and Griffith-Cima 1996). La croissance d'autres types cellulaires tels que des fibroblastes STO de souris ou de CHO (*chinese hamster ovary*) en présence de EGF greffé de manière covalente a également été rapportée (Chen and Ito 2001; Gobin and West 2003).

Une alternative à l'utilisation de la chimie humide basée sur l'utilisation de EDC/NHS est la photoimmobilisation. Cette approche a été rapportée pour l'immobilisation covalente de EGF par Ito et collègues (Ito et al. 1996a); elle nécessite cependant l'ajout d'un radical azido-benzoyl-oxysuccinimide sur les amines primaires du facteur de croissance (Chen et al. 1997; Ito et al. 1996b).

L'utilisation des fonctions thiol (portées par les cystéines) est plus rare dans des stratégies de couplage covalent car, dans la grande majorité des protéines natives, les chaînes latérales de ces résidus sont engagées dans des ponts disulfures assurant la cohésion de la structure tertiaire

(c'est notamment le cas pour les ligands de la famille de EGF, voir Figure 1.1). L'utilisation de fonctions thiol portées par les cystéines a toutefois été rapportée mais nécessite le plus souvent de produire la protéine d'intérêt en ajoutant un résidu cystéine à sa structure primaire (Zhen et al. 2004). De par la faible occurrence de cystéines sous forme réduite dans les protéines, cette approche, quoique laborieuse, garantit dans la plupart des cas une immobilisation covalente et orientée (Backer et al. 2006).

Il est aussi à noter que plusieurs bras espaceurs homo- ou hétéro-bifonctionnels réagissant avec les groupements carboxyliques, amine ou même thiol sont disponibles dans les catalogues de spécialité des principaux fournisseurs de produits chimiques. Ces derniers peuvent être utilisés pour modifier les propriétés intrinsèques de surface du matériau (hydrophobicité, charge ...) tout en garantissant une plus grande mobilité rotationnelle des molécules ainsi immobilisées de façon covalente.

1.4.3 L'immobilisation orientée de protéines

L'immobilisation orientée de protéines repose le plus souvent sur l'interaction spécifique existant entre une étiquette d'affinité (*tag*) et un support adéquatement traité (Bilitewski 2006; Rusmini et al. 2007). La mise en œuvre de ce type d'approches nécessite donc, dans un premier temps, l'adjonction de l'étiquette d'affinité choisie à la protéine d'intérêt. Cette adjonction peut s'effectuer de manière chimique ou par biologie moléculaire (c'est à dire via l'expression d'une protéine chimère correspondant à la protéine intérêt à laquelle l'étiquette a été fusionnée).

L'étiquette ajoutée par voie chimique la plus utilisée en biotechnologie est la biotine, capable d'interagir avec une très forte affinité (K_D de l'ordre de 10^{-14} M) avec la streptavidine (De Crescenzo et al. 2008; Wilchek et al. 2006). La stratégie d'immobilisation comprend alors une première étape où la biotine est fixée de façon covalente sur la protéine (le plus souvent par couplage amine), alors que la streptavidine est couplée de façon covalente à la surface. L'immobilisation s'effectue alors par simple incubation de la protéine biotinylée sur la surface présentant de la streptavidine (Blackburn and Hart 2005; Lue et al. 2004). Puisque l'étape initiale d'ajout de la biotine repose le plus souvent sur la chimie des amines, les mêmes restrictions que celles évoquées dans la section précédente s'appliquent à cette approche (Wilson and Nock 2002). Cependant, une séparation préliminaire (avant couplage) des différents composés biotinylés peut être effectuée par chromatographie en phase liquide à haute performance, garantissant ainsi par la suite une meilleure homogénéité de surface (De Crescenzo et al. 2000).

Les autres méthodes nécessitant la manipulation de l'ADN codant pour la protéine s'inspirent des approches technologiques utilisées pour la purification de protéines recombinantes. Citons notamment deux systèmes majoritairement utilisés à savoir le système basé sur l'interaction entre la portion Fc de l'immunoglobuline G et la protéine A ou G et le système basé sur l'interaction existant entre une étiquette polyhistidine et des ions métalliques (Nakaji-Hirabayashi et al. 2007; Ogiwara et al. 2005).

Ces stratégies de greffage présentent plusieurs avantages. En effet, elles n'entrainent pas dans la plupart des cas d'altération de la conformation de la protéine puisque la liaison entre la protéine et la surface est assurée par la portion 'étiquette' de la protéine de fusion. Par conséquent, les surfaces obtenues sont homogènes (Figure 1.6 B1 and 1.6B3) et les molécules immobilisées

sont bioactives, tant et autant que l'étiquette utilisée n'interfère pas avec la bioactivité de la protéine (encombrement stérique ou mauvais repliement).

1.4.3.1 Système basé sur l'interaction entre une étiquette polyhistidine et des ions métalliques

L'utilisation d'étiquette composée d'une série d'histidines (entre 6 et 12) est la méthode la plus utilisée dans la purification des protéines. Il a pu être démontré que ce système permettait aussi la capture de protéines à la surface de biocapteurs, et ce, de manière stable et orientée (Wegner et al. 2003). Les protéines comprenant une étiquette polyhistidine peuvent interagir avec des ions métalliques divalents (Ni^{2+}) capturées par une matrice d'acide nitriloacétique (NTA) (Verbelen et al. 2007; Wegner et al. 2003). Ce système a d'ailleurs été utilisé pour la conception de nouvelles plateformes protéomiques (Haddour et al. 2005; Tinazli et al. 2005) mais aussi lors d'études d'ingénierie tissulaire *in vitro* : EGF étiqueté avec une queue polyhistidine et immobilisé sur un support prétraité pour présenter une matrice Ni-NTA (Figure 1.7) promeut la différentiation et la prolifération de cellules souches neuronales pendant une période d'au moins cinq jours (Nakaji-Hirabayashi et al. 2007). Cependant, le possible relargage d'ions métalliques pourrait constituer un problème majeur pour des applications *in vivo*, en raison de leur possible toxicité (Peters et al. 2007; Zhou et al. 2009).

1.4.3.2 Immobilisation des protéines via le systène Fc-protéine A/G

La protéine G est une protéine bactérienne associée à l'adhésion surface-cellule du groupe G et D des streptocoques. Elle présente une forte affinité pour les différentes sous-classes d'immunoglobulines humaines avec une constante thermodynamique de dissociation de l'ordre du nM (Goward et al. 1990; Turkova 1999). La protéine A, quant à elle, est une protéine de surface extraite à partir de la bactérie *Staphylococcus aureus*. Cette protéine est connue pour avoir une capacité unique pour se lier au domaine constant (Fc) des immunoglobulines G (IgG) (Das et al. 1985; Turkova 1999). La protéine A est composée de 5 sous-unités qui peuvent fixer chacune son propre Fc de manière stable (K_D compris entre de 10^{-5} et 10^{-10} M) (Ogi et al. 2007). Du fait de la stabilité du complexe protéine A ou G / domaine Fc, son utilisation à des fins d'immobilisation orientée est couramment rapportée. Par exemple, EGF-Fc (une protéine chimère correspondant à EGF fusionné au domaine Fc) a été immobilisé sur du polystyrène afin de stimuler les cellules épithéliales de l'épiderme (A-431) : une augmentation de l'adhésion cellulaire ainsi qu'une activation soutenue des voies de signalisation et une modification du cytosquelette ont été observées (Ogiwara et al. 2006).

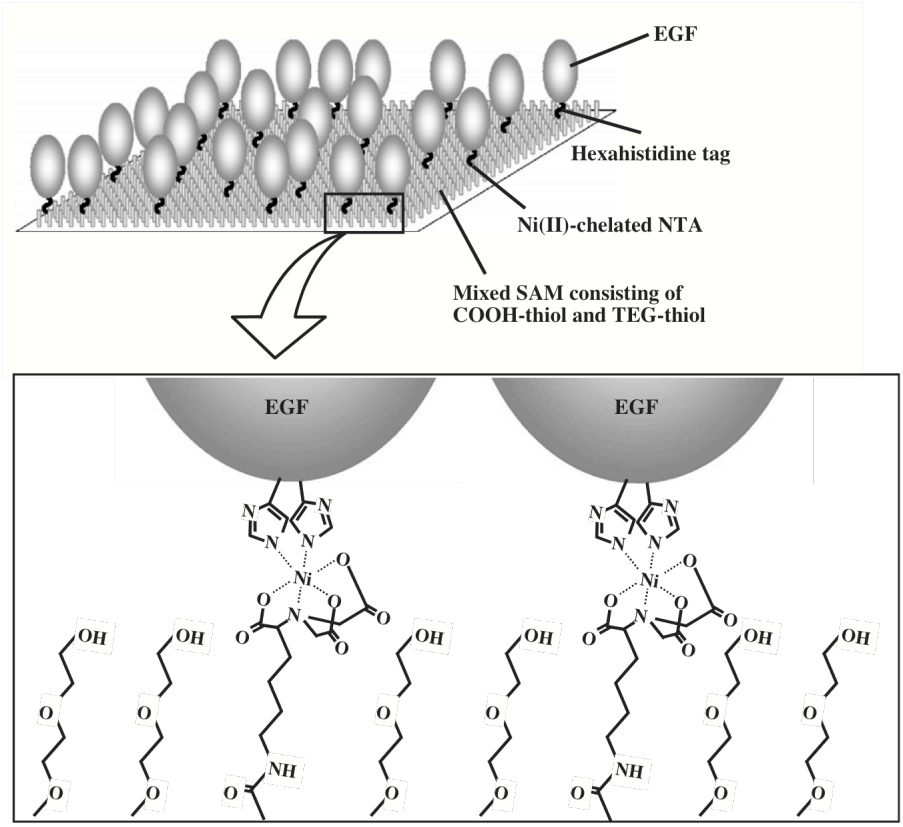

Figure 1.7 : Représentation schématique de l'immobilisation orientée de EGF-His sur un support majoritairement constitué d'une matrice Ni-NTA (d'après (Nakaji-Hirabayashi et al. 2007)).

1.4.3.3 Immobilisation via d'autres domaines protéiques

L'immobilisation orientée des protéines peut aussi être mise en œuvre grâce à l'utilisation d'étiquettes correspondant à un domaine de liaison capable d'interagir de façon spécifique avec une autre protéine ou une chaîne saccharidique : parmi ceux-ci, citons les domaines de liaison à la fibrine (*fibrin-binding domain*, FBD), à la chitine, à l'héparine ou à la cellulose (Cao et al. 2007; Chiang et al. 2009; Hwang et al. 2004; Jervis et al. 2005; Kim and Kiick 2007; Kitajima et al. 2009) utilisés pour l'immobilisation stable et orientée de protéines à la surface de billes (Chiang et al. 2009), d'hydrogels (Kim and Akaike 2007) ou de gels de silice (Hwang et al. 2004). A titre d'exemple, une protéine de fusion correspondant à l'hormone de croissance (HGF) fusionnée au domaine FBD s'est avérée capable de stimuler la croissance de cellules endothéliales une fois immobilisée via le domaine FBD (Kitajima et al. 2009).

1.4.3.4 Immobilisation via l'interaction *coiled-coil*

Les *coiled-coils* sont des domaines structuraux que l'on retrouve au sein des protéines ; ils sont composés de deux à cinq hélices α arrangées de façon parallèle ou antiparallèle. La structure *coiled-coil* est bien représentée dans la nature puisqu'il a été estimé que 2 à 4% des acides aminés composant l'ensemble des protéines l'adoptent. Ce motif permet de contrôler la dimérisation des protéines (α-kératine, vimentine, laminine, facteurs de transcription myc, max, fos et jun) (Burkhard et al. 2001). Chaque chaîne peptidique dans la structure *coiled-coil* est sous forme d'hélice α et est caractérisée par un motif répété, constitué de 7 acides aminés dénotés $\mathbf{abcdefg}_n$ formant une heptade. Dans ce motif, les positions **a** et **d** sont normalement occupées par des

acides aminés hydrophobes alors que les autres positions sont occupées par des résidus polaires. Puisque l'angle formé par les résidus successifs formant l'hélice α est d'environ 100°, cet espacement de type 3-4 entre les résidus hydrophobes d'une même chaine peptidique *coil*, génère une bande continue de résidus hydrophobes tout le long de l'hélice. L'association de ces régions hydrophobes conduit à la formation de la structure *coiled-coil* dans laquelle les résidus hydrophobes se regroupent et s'emboitent comme les dents d'une fermeture éclair (d'où l'autre nom anglais de *leucine zipper* pour ce type de structure) (Crick 1953) (voir Figure 1.8). Les études structurales (RMN et cristallographie par rayon X) (Harbury et al. 1993; Kohn and Hodges 1998; Lupas 1996; Muller et al. 2000) ainsi que les outils informatiques prédictifs (Berger et al. 1995; Wolf et al. 1997) ont permis de mieux comprendre ce type de structure et de créer de nouveaux systèmes *coiled-coil* non naturels. Parmi ceux-ci, les peptides E et K *coils* qui correspondent aux heptades EVSALEK et KVSALKE répétées de trois à cinq fois (Chao et al. 1998; Chao et al. 1996) forment un complexe hétérodimérique stable et très spécifique en raison des interactions ioniques impliquant les résidus chargés (acide glutamique E et lysine K) qui flanquent le cœur hydrophobe du complexe (Figure 1.8). Les applications des structures *coiled-coil* E/K sont nombreuses dans les domaines de l'ingénierie des protéines et de la biotechnologie. Certains chercheurs se sont en effet basés sur ces structures pour concevoir de nouveaux systèmes d'accroche permettant notamment la capture orientée de protéines à la surface de biocapteurs (Chao et al. 1996; De Crescenzo et al. 2003a; De Crescenzo et al. 2004; Hart and Gehrke 2007; Shang and Geva 2007; Zhang et al. 2005), la purification de protéines (Tripet et al. 1996) et leur détection par Western blot (Boucher et al. 2010), le ciblage de virus (Zeng et al. 2008) ou encore l'assemblage des domaines extracellulaires de certains récepteurs pour la création de nouveaux inhibiteurs (De Crescenzo et al. 2004). Ce système est

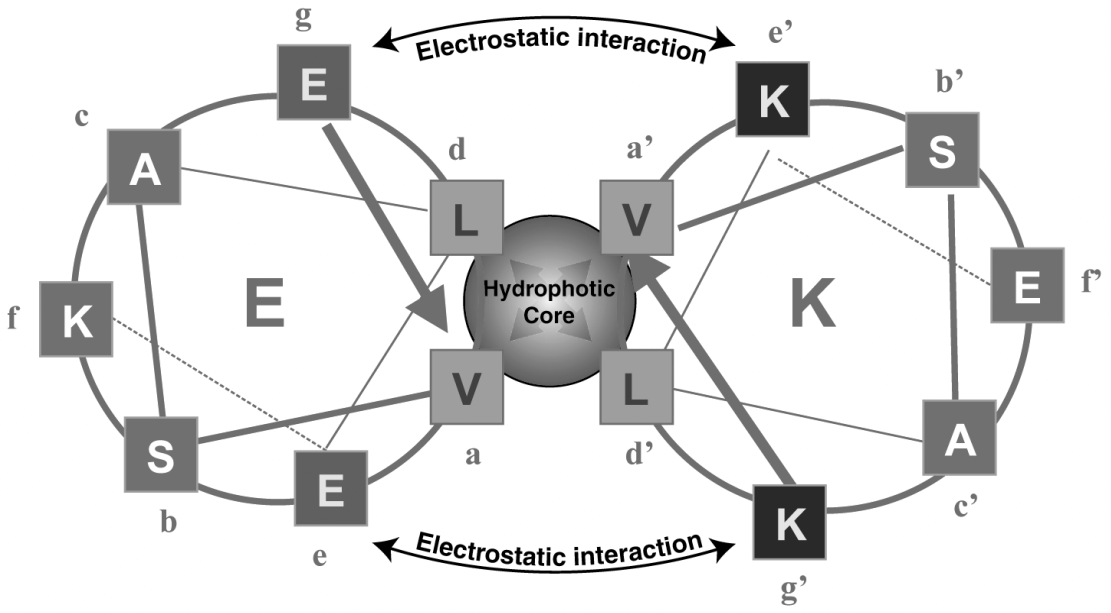

Figure 1.8 : Représentation d'Edmundson (*Helical Wheel*) d'un hétérodimère E/K dans un heptade par hélice est représenté en coupe.

Les interactions de type hydrophobe entre les deux peptides sont indiquées par le cercle. Les flèches dénotent les interactions de type électrostatique de chaque coté du cœur hydrophobe.

très stable (l'interaction E/K est caractérisée par un K_D de l'ordre du nM, (De Crescenzo et al. 2003a) et très spécifique ; il pourrait par conséquent être utilisé pour immobiliser des protéines dans le cadre de futures applications en ingénierie tissulaire.

CHAPITRE 2 OBJECTIFS ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT

L'immobilisation de protéines présente un intérêt majeur dans le but de créer de nouveaux matériaux bioactifs permettant de promouvoir la régénération de tissus et/ou d'organes. Deux stratégies principales sont actuellement utilisées pour fonctionnaliser ces matériaux: le greffage orienté ou non orienté de protéines. L'immobilisation non orientée est généralement basée sur la réaction entre des groupements fonctionnels présents sur les chaines latérales des résidus de la protéine et les groupements présents sur le matériau. La chimie employée met le plus souvent à profit les fonctions amines de la protéine, ce qui engendre dans la grande majorité des cas, un couplage hétérogène. Les résultats obtenus sont peu reproductibles et les protéines ainsi greffées présentent une activité biologique diminuée; elles ne peuvent donc pas interagir de manière optimale avec les récepteurs présents à la surface des cellules. Par conséquent, l'immobilisation orientée de protéines est l'alternative favorisée. Pour ce faire, les stratégies employées s'inspirent fortement des techniques utilisées pour la purification de protéines en se basant notamment sur l'utilisation d'étiquettes telles que la partie Fc des immunoglobulines G ou les queues polyhistidines. Celles-ci ne doivent cependant pas altérer l'activité biologique des protéines étiquetées ni nécessiter une interaction avec une matrice toxique.

Par conséquent, le développement d'une approche supprimant les inconvénients rencontrés lors de l'immobilisation orientée de protéines sur des supports biocompatibles est nécessaire afin de promouvoir de façon optimale l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire. Les travaux présentés dans ce premier chapitre sont basés sur l'utilisation de deux

peptides non naturels dénommés E coil et K coil afin de permettre le greffage orienté du facteur de croissance de l'épiderme (EGF) sur un biomatériau. L'objectif était donc de mettre au point une stratégie innovante permettant l'immobilisation orientée de ce facteur de croissance utilisé comme protéine modèle. La méthode expérimentale ne devait pas altérer la bioactivité de la protéine, elle devait être simple dans sa mise en œuvre, facilement reproductible et polyvalente c'est-à-dire transposable à tout type de protéines correctement étiquetées.

Les travaux présentés dans le chapitre 3 de cette thèse ont été publiés dans le journal scientifique '*Tissue Engineering Part A*' en 2008. Ces travaux se sont attachés à étudier l'influence des peptides coils sur la bioactivité de EGF. L'objectif était de démontrer que les coils n'interferaient pas avec celle-ci et que l'immobilisation orientée de ce facteur de croissance était possible. La bioactivité de EGF étiqueté par les coils en position N-terminale (Ecoil-EGF, Kcoil-EGF) a été comparée à celle de EGF étiqueté avec un domaine Fc en position N- ou C-terminale (EGF-Fc et Fc-EGF) car l'immobilisation orientée de EGF via l'interaction Fc - protéine A/G avait déjà été rapportée. Il a ainsi pu être démontré qu'en solution le Fc-EGF n'est pas bioactif alors que le Ecoil-EGF, le Kcoil-EGF et le EGF-Fc le sont, le Ecoil-EGF étant aussi actif que la protéine native et plus actif que les autres chimères. Par conséquent, ces résultats ont permis de démontrer que le type et la localisation de l'étiquette ont un effet sur l'activité biologique de la protéine et que le système coiled-coil est un système de choix afin d'immobiliser des facteurs de croissance pleinement bioactifs.

Les travaux présentés dans le deuxième article de cette thèse (Chapitre 4) et publiés dans *Bioconjugate Chemistry* en 2009 se sont attachés à immobiliser le Ecoil-EGF par interaction coiled-coil sur des surfaces de verre aminé. L'objectif était de mettre au point une chimie permettant le greffage du K coil sur une surface aminée, d'y immobiliser le Ecoil-EGF et de

mettre en évidence que notre stratégie de greffage était plus efficace pour promouvoir la réponse de cellules épidermiques (A-431) que des stratégies basées sur l'utilisation de EGF en solution ou de EGF immobilisé de manière non orientée. Une fois la stratégie de greffage du K coil optimisée sur du verre aminé, une forte augmentation de l'adhésion des A-431 a été mise en évidence en présence de Ecoil-EGF immobilisé contrairement aux autres conditions. Une augmentation de l'intensité et de la durée de la phosphorylation du récepteur de EGF (EGFR) a également été démontrée témoignant de l'efficacité de l'approche coiled-coil comparativement à une approche de greffage aléatoire de EGF ou à l'utilisation de protéines en solution.

Dans le troisième article (Chapitre 5) soumis pour publication dans *Biomaterials* en 2010, un biomatériau (PET) a été utilisé comme support avec pour objectif d'approfondir l'étude des effets de l'immobilisation orientée de EGF sur le comportement de cellules épithéliales de cornée (HCE-2) à des fins d'application en ingénierie tissulaire. Après avoir vérifié qu'il était possible de transposer le protocole développé dans le chapitre 4 afin de greffer le K coil sur des surfaces aminées de PET, des tests cellulaires ont été effectués. Des approches basées sur l'utilisation de Ecoil-EGF immobilisé, de EGF physisorbé et de EGF en solution ont alors été comparées. Il s'est avéré que notre approche est la plus efficace afin de promouvoir l'adhésion, l'étalement et la prolifération de cellules HCE-2. De plus, l'étude de l'activation des voies de phosphorylation suite à l'interaction de EGF avec son récepteur a été reliée aux réponses cellulaires observées. Tous ces résultats ont démontré l'intérêt de l'immobilisation orientée de EGF à des fins d'application en ingénierie tissulaire.

CHAPITRE 3 LA BIOACTIVITÉ ET L'AFFINITÉ DU RÉCEPTEUR DU FACTEUR DE CROISSANCE DE L'ÉPIDERME ÉTIQUETÉ CONCU À DES FINS D'APPLICATION EN INGÉNIERIE TISSULAIRE SONT DÉFINIES PAR LA NATURE ET LA POSITION DES ÉTIQUETTES

3.1 Présentation de l'article

Cette section reprend l'article intitulé "**The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged-EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tag"**. L'article a été publié dans la revue *Tissue Engineering Part A* en 2008 (Vol. 14, No. 12, p.2069-2077).

La mise au point de stratégies simples permettant l'immobilisation orientée de facteurs de croissance est primordiale dans l'optique d'une future application en ingénierie tissulaire. L'approche proposée dans le cadre de cette étude est basée sur l'interaction existant entre deux peptides complémentaires, le Ecoil et le Kcoil. Avant d'envisager d'immobiliser des protéines étiquetées coil sur des supports biocompatibles, il a été tout d'abord nécessaire de vérifier que ces étiquettes n'interfèrent pas avec l'activité des protéines. Dans cette optique, l'impact de ces étiquettes (Ecoil et Kcoil) sur l'activité biologique du facteur de croissance EGF a été étudié et comparé à celle de la portion Fc des immunoglobulines G actuellement utilisée pour l'immobilisation orientée de EGF.

3.2 The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged-EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags

Cyril Boucher[1,2], Gilles St-Laurent[1], Martin Loignon[1], Mario Jolicoeur[2], Grégory De Crescenzo [2] and Yves Durocher[1]

[1]Animal Cell Technology Group, Bioprocess Sector, Biotechnology Research Institute, National Research Council Canada. 6100 Royalmount Avenue Montréal (Quebec) Canada H4P 2R2

[2]Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, P,O, Box 6079, Centre-ville Station, Montréal, Quebec, Canada,

Corresponding Author :

Yves Durocher, PhD

Project Leader, Mammalian Cell Technology

Tel. :001 514 496-6192

Fax. 001 514 496-6785

yves.durocher@cnrc-nrc.gc.ca

3.2.1 Abstract

For tissue engineering applications, growth factor (GF) immobilization on cell culture scaffolds bears the potential to stimulate cell proliferation while minimizing costs associated to soluble GF supply. In order to evaluate the potential of a *de novo* designed heterodimerization peptide pair, namely the E and K coils, for epidermal growth factor (EGF) grafting on various scaffolds, production of coil-tagged EGF chimeras using a mammalian cell expression system as well as their purification have been performed. The influence of the type of coil (E or K) upon EGF bioactivity, assessed in an *in vitro* cell assay, was compared to that of the Fc domain of immunoglobulin G by monitoring phosphorylation of EGF receptor upon chimeric EGF exposure. Our results demonstrate that the type and the location of the tag have a strong impact on growth factor bioactivity (EC_{50} ranging from 5.5 to 63 nM). Additional surface plasmon resonance (SPR)-based biosensor experiments were conducted to test the ability of captured chimeric EGF to bind to their receptor ectodomain *in vitro*. These experiments indicated that the oriented coiled-coil-mediated immobilization of EGF was significantly more efficient than a random approach as coil-tagged EGF displayed enhanced affinities for artificially-dimerized EGF receptor ectodomain when compared to Fc-tagged EGF (apparent K_D of 5 pM vs 16 nM). Altogether, our results highly suggest that coil-tagged chimeras represent an attractive avenue for the oriented immobilization of growth factors for tissue engineering applications and that HEK293 cells offer a robust platform for their expression in a bioactive form.

3.2.2 Introduction

Bioengineered implants are becoming extremely promising with respect to the development of biocompatible scaffolds to promote and sustain tissue regeneration (Hoemann et al. 2005). Based on the well-documented effect of growth factors on cell survival, proliferation, differentiation and chemotaxis, several research groups have developed methodologies to immobilize them on solid supports with the ultimate goal of modulating cell growth and phenotype (Ito 1998; Kuhl and Griffith-Cima 1996; Merrett et al. 2003). Indeed, immobilization of epidermal growth factor (EGF), nerve growth factor (NGF) (Kapur and Shoichet 2004) or vascular endothelial growth factor (VEGF) (Backer et al. 2006) onto different supports (gold, polydimethylsiloxane, glass, polystyrene) (Chen et al. 1997; Ichinose et al. 2006; Kato et al. 2005; Klenkler et al. 2005; Ogiwara et al. 2005; Wang and Bohn 2006) has already been reported. Two different approaches are commonly applied for protein grafting, i.e, non-oriented or oriented immobilizations. The non-oriented immobilization strategies are based on *i)* the interactions between a charged scaffold and the protein (Crombez et al. 2005) or *ii)* the formation of covalent linkage between the growth factor and target scaffold using bifunctional reactive chemicals as well as by photoimmobilization (Chen et al. 1997; Ito 1998; Klenkler et al. 2005; Palsson et al. 2003; Wang and Bohn 2006). Although unambiguous effects on cell growth and phenotype have been reported with grafted ligands, it is likely that these immobilization methods are not optimal. That is, the surface grafting is often mediated in a random fashion by using reactive groups present on ligand amino acid side chains. The multiplicity of reactive groups results in heterogeneous ligand populations whose interactions with cell receptors may be affected by the tethering procedure and therefore this approach is poorly reproducible and

inefficient. Up to now, only few methods have described the oriented immobilization of growth factors. These methods are based on the use of different tags (such as Fc or polyhistidine) that offer the potential to be applied to both purification and tethering steps (Backer et al. 2006; Kato et al. 2005; Ogiwara et al. 2005). More recently, based on naturally occurring coiled-coil structures, a *de novo* heterodimeric coiled-coil system formed by two peptides (the E and K coils) was designed and characterized (De Crescenzo et al. 2003a; Tripet et al. 2002). The E-K coiled-coil system has been demonstrated to be an excellent tool for various biotechnology and biomedical applications such as protein capture and delivery (De Crescenzo et al. 2003b); each peptide composing the E/K complex being defined by a seven amino-acid sequence comprising both hydrophobic and charged residues that are repeated five times (De Crescenzo et al. 2003a).

EGF plays various important roles in the organism and is indeed a growth factor commonly used in tissue engineering applications (Gobin and West 2003). EGF is synthesized as a 130 kDa precursor that is then proteolytically processed to give a mature 53 amino acid-long polypeptide of 6 kDa (Bell et al. 1986; Mroczkowski et al. 1988) that contains 3 disulfide bridges. EGF mediates its biological function by promoting the oligomerization of EGF receptors (EGFR) present at the cell surface (Ferguson et al. 2003; Ogiso et al. 2002). Ligand-mediated receptor oligomerization initiates complex cascades of intracellular events resulting in a broad spectrum of phenotypic responses such as the proliferation and differentiation of epithelial or mesenchymal cells. Its role in neovascularization and chemotaxis in wound healing processes has also been demonstrated (Schultz et al. 1991).

In order to evaluate the potential of the E/K coiled-coil system for EGF grafting on various scaffolds and surfaces used in tissue engineering applications, production of coil-tagged EGF chimeras using a mammalian cell expression system as well as their purification and

characterization have been performed. The influence of the type of coil (E or K) on EGF bioactivity was compared to that of the Fc domain of immunoglobulin G. We showed that the type and the location of the tag have a strong impact on growth factor bioactivity. Additional surface plasmon resonance (SPR)-based biosensor experiments indicated that the oriented coiled-coil-mediated capture of EGF was significantly more efficient than a random approach. Altogether, our results highly suggest that coil-tagged chimeras represent an attractive avenue for the oriented immobilization of growth factors for tissue engineering applications and that Human Embryonic Kidney cells (HEK293) offer a robust platform for their expression in a bioactive form.

3.2.3 Materials and Methods

3.2.3.1 Chemicals and Reagents

Chemicals and reagents used are linear 25 kDa polyethylenimine (PEI, Polysciences, Warrington, PA), prepared as previously described (Pham et al. 2005), Salmon testes DNA (stDNA) (Sigma, Oakville, ON), TN1 peptone (OrganoTechnie SA, Teknisciences, Canada), geneticin (GIBCO/BRL, Burlington, ON) and pluronic acid F-68 (F68) (Sigma–Aldrich, Oakville, ON).

All the surface plasmon resonance (SPR) experiments were performed using a Biacore 3000 and Biacore T100 biosensors. The thiol coupling kit containing N-hydroxysuccinimide (NHS), ethyl-N′-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), 2-(2-

pyridyldithio) ethaneamine (PDEA) and CM4 sensor chips were purchased from Biacore Inc (Piscataway, NJ).

3.2.3.2 Cells

A human embryonic kidney 293 cell line stably expressing EBNA1 (293-6E) was maintained in suspension culture in shake flasks (110 rpm) in F17 medium (Invitrogen; Burlington, ON) supplemented with geneticin (25 µg/mL), glutamine (4 mM) and pluronic acid (0.1%) in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. The A-431 cells were maintained in 175 cm^2 flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (Invitrogen).

3.2.3.3 Plasmids

All the vectors were derived from the pTT plasmid previously described (Durocher et al. 2002). Four constructs (Figure 3.1) were used to express the EGF cDNA and tags (Ecoil, Kcoil, Fc). A codon-optimized human EGF cDNA containing a N-terminal Interleukin 2 signal peptide (IL2SP) was synthetized by GeneArt (Regensburg, Germany) and cloned in pTT vector as a *NotI* – *BamHI* fragments.

1. <u>Plasmid encoding Fc tag</u> : pTT5-EGF was digested with *NheI* and *BamHI*, EGF cDNA was insert in pYD5 which encoded the human Immunoglobulin G Signal Peptide (IgGSP) and Fc (Figure 3.1). pYD11-EGF-Fc was constructed by PCR amplification of EGF

cDNA with forward (5'-AAAGGATCCATGAATTCTGACAGCGAGTGCCC-3') and reverse (5'-AAATCTAGATCTCAGCTCCCACCACTTCAG-3') primers. The PCR product was digested by *BamHI* and cloned in frame with pYD11 digested with *BamHI* and *EcoRV* (Figure 3.1).

2. Plasmids encoding Ecoil or Kcoil tag : pTT5-E/Kcoil-EGF were constructed by PCR amplification of the Ecoil or Kcoil sequences with forward (5'-AAAGGTACCATGGAGGTATCCGCTTTAGAGAAAG-3' for Ecoil sequence and 5'-AAAGGTACCAAGGTATCCGCTTTAAAGGAG-3' for Kcoil sequence) and reverse (5'-AAAGGTACCATGGTGATGGTGATGGTGATGATGCAATTCAGAGCCACCGCCACCGCTGCC-3') primers. The PCR products were digested by *KpnI* and cloned in frame with pTT5-EGF digested with the same enzyme (Figure 3.1).

Plasmids were amplified in DH5α *Escherichia coli* grown in Circlegrow medium (Q-Biogene, Carlsbad, ON) and purified using Maxi-Prep kits (Qiagen, ON). Plasmids were quantified following dilution in 50mM Tris–HCl, pH 8.0, by measuring absorbance at 260 nm. The *A*260/*A*280 ratio was between 1.80 and 1.95 for all plasmids used for transient transfection.

3.2.3.4 Transfection

To express the various tagged EGF, 293-6E cells were first distributed in 6-well plates at 1.67×10^6 cells/ml in 1.8 mL medium. The transfection mixture was then prepared as follow: 2 mg plasmids (95% pTT vector and 5% pTT-GFPq) were diluted in 100 mL F17 medium and 100 mL

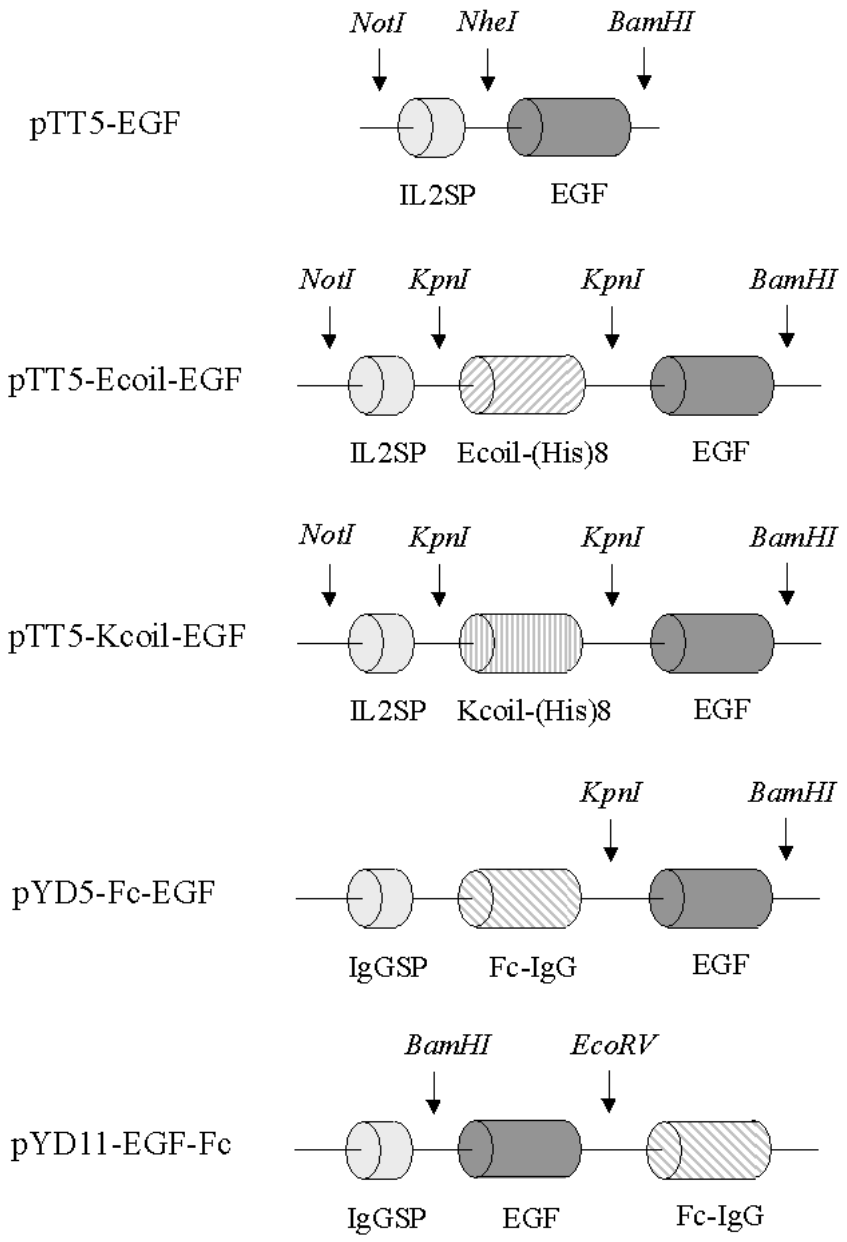

Figure 3.1 : Expression plasmids for the production of the various tagged EGFs.

Each plasmid encodes human EGF cDNA tagged with Ecoil and His-tag (pTT5-Ecoil-EGF plasmid), or with Kcoil and His-tag (pTT5-Ecoil-EGF plasmid) or with the Fc portion of an IgG (pYD5-Fc-EGF and pYD11-EGF-Fc plasmids).

F17 medium containing 4 mg 25 kDa linear PEI was added. The mixture was immediately vortexed and incubated for 15 min at room temperature prior to addition to the cells. Cells were fed 24 h post-transfection (hpt) with 0.5% TN1 peptone (w/v, final) (Pham et al. 2005). The supernatants were harvested 5 days post-transfection.

3.2.3.5 Purification

Production was performed in shake flasks. Each cell culture supernatant (500 mL) was harvested 120 hours post-transfection (hpt) and centrifuged to eliminate cells and debris. The supernatants were then filtered on 0.45 µm filters (Millipore, Mississauga, ON). Ecoil- and Kcoil-tagged EGF were purified by Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) based on the interaction existing between metallic ion and the $(His)_8$tag (Figure 3.1) whereas N- and C-terminally Fc-tagged EGF were purified by affinity chromatography based on the interaction existing between the Fc portion from Immunoglobulin G and protein A.

E/Kcoil-tagged EGF : Fractogel EMD Chelate gravity flow columns (5 ml bed size) were charged successively with 4 column volumes (CVs) of 200 mM $CoCl_2$, 5 CVs of water and 5 CVs of PBS. After E/Kcoil-EGF loading, the columns were washed with 10 CVs of 50 mM NaH_2PO_4 pH 7.0, 300 mM NaCl and 25 mM imidazole, pH 7.0. E/Kcoil-EGF were eluted in 1 mL fractions using the same buffer but containing 300 mM imidazole.

Fc-tagged EGF : The filtered supernatants were loaded onto a 2 mL protein A column (GE Healthcare). The columns were washed with 10 CVs of PBS. The Fc-tagged EGF were then eluted with 0.1 M citrate pH 3.6 in 1 mL fractions.

The protein-containing fractions were detected with Bradford reagent, pooled and desalted on Econo-Pac® 10 columns (Bio-Rad Laboratories) previously equilibrated with PBS according to the manufacturer's specifications and quantified by Bradford. To assess the purity level, proteins were analyzed by SDS-PAGE (4–12% NuPAGE Bis-Tris gradient gel) followed by Coomassie staining.

3.2.3.6 *In vitro* cell assay

Bioactivity of the purified constructs was investigated by testing EGF-induced autophosphorylation of EGF receptor (EGFR) in A-431 cells. Consequently, A-431 cells were distributed in 6-well plates at 0.5 x 10^6 cells/mL, 2 mL/well. 18 hours later, the cells (80-90 % confluence) were treated with tagged EGF (final concentrations ranging from 0 to 1 µM) for 5 min in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. Cells were then washed twice with PBS supplemented with sodium-orthovanadate (1mM, Sigma) and lysed (lysis buffer supplemented with 0.1 mM Na_3VO_4, 20 mM β-glycerophosphate, 10 mM $Na_4P_2O_7 \bullet 10\ H_2O$ and 0.5 µM microcystin). Commercially-available untagged EGF (R&D Systems, Minneapolis, MN) was used as a positive control.

3.2.3.7 SDS–PAGE and Western blot analyses

Cells from one well of a 6-well plate were lysed in 300 ml of lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Thesit, 0.5% sodium deoxycholate) and insoluble material remove by centrifugation at 10,000 x g for 5 minutes at 4°C. Samples (cell lysates or culture medium) were mixed 3:1 (v:v) with 4X NuPage sample buffer (Invitrogen) containing 50 mM DTT (for EGFR1) and heated to 70°C for 10 min. Electrophoresis was performed using 4–12% Bis-Tris NuPage gels (Invitrogen) at 200 volts in MES SDS (Tagged EGF) or MOPS SDS buffer (EGFR1). Mark12 MW standard (Invitrogen) was applied to each gel to determine molecular weights. Protein purity was determined by staining with Coomassie blue R250. For Western blots, proteins were transferred to a 0.2 µm Protran nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell) using Tris–glycine buffer for 1 h at 300 mA. The membrane was incubated in blocking reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), and then probed with appropriate antibodies against EGF (Z-12) or phosphotyrosine (PY99) (Santacruz, CA) for 1 h. Detection was performed using BM Chemiluminescence Blotting Substrate (Roche Diagnostics) with a Kodak Digital Science Image Station 440cf equipped with Kodak Digital Science 1D image analysis software version 3.0 (Eastman Kodak, NY).

3.2.3.8 Surface Plasmon Resonance (SPR) assay

The affinity of the various tagged EGF for the extracellular domain of EGFR artificially dimerized through the Fc portion of an IgG (EGFRED-Fc, R&D Systems, Minneapolis, MN) was studied by SPR.

SPR experiments were conducted at 25°C using HBS-T (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.05% Tween 20) for sample dilution and as running buffer. Cysteine-tagged Kcoil and Ecoil peptides were independently and covalently immobilized onto CM4 sensor chip surfaces using standard ligand thiol coupling procedure as previously described (De Crescenzo et al. 2003a). In addition to coil surfaces, mock surfaces were prepared using the same protocol by replacing coil injections with running buffer injections.

N- and C-terminally Fc-tagged EGF were covalently immobilized onto CM5 sensor chip surfaces adapting standard amine coupling procedure as previously described (De Crescenzo et al. 2001) and mock surfaces were prepared using the same protocol by replacing Fc-tagged EGF injections by running buffer injections.

EGFRED-Fc binding to covalently immobilized Fc-tagged EGF:

Experiments were carried out at a flow rate of 50 µL/min. Artificially-dimerized EGF receptor ectodomain (EGFRED-Fc) was then injected at concentrations ranging from 5 to 80 nM, (in addition to HBS-EP buffer injections) in duplicate over EGF and control surfaces. Regeneration of the sensor chip surfaces was accomplished by HBS-EP (10 mM Hepes, pH 6.0,

150 mM NaCl, 3.0 mM EDTA, 0.05% surfactant P20) buffer injection until original baseline levels were reached.

EGFRED-Fc binding to captured coil-tagged EGF:

Experiments were carried out at a flow rate of 50 µL/min. Coil-tagged EGF were captured (100 Resonance Units, RUs) on surfaces on which their coil partner had been previously immobilized. After EGF capture via coiled-coil interactions, the artificially-dimerized EGF receptor ectodomain (EGFRED-Fc, R&D Systems, Minneapolis, MN), was then injected over coil-tagged EGF and control surfaces (60 s). Regeneration of the sensor chip (i.e. removal of both EGFRED-Fc and coil-tagged EGF) was accomplished by 2 pulses of guanidium-HCl (25 mL at 100 mL/min). This cycle was repeated by capturing the same amount of coil-tagged EGF, followed by injection of the artificially-dimerized EGF receptor ectodomain at concentrations ranging from 1.25 to 50 nM (duplicate), in addition to buffer. For coil-tagged EGF interactions with the artificially-dimerized EGF receptor ectodomain (EGFRED-Fc), sensorgrams were globally analyzed using a simple binding model including a mass transport limitation step, available in the Biaevaluation 4.1 software package of the biosensors.

3.2.4 Results

3.2.4.1 Cloning strategies and production of tagged EGF in HEK293 cells

Plasmids corresponding to EGF tagged with i) the Ecoil or Kcoil sequences added to the N-terminus of EGF (denoted Ecoil- and Kcoil-EGF, respectively); or with *ii)* the Fc portion from immunoglobulin G added to the N- or C-terminus of EGF (denoted Fc-EGF and EGF-Fc, respectively), were generated (Figure 3.1). In order to ease subsequent purification, constructs were designed to favor chimeric protein secretion by adding sequences corresponding to signal peptide of the interleukin-2 (IL2SP, Figure 3.1) or of immunoglobulin G (IgGSP, Figure 3.1).

293-6E cells were then transfected in 6-well plates (2 mL) with each expression vector as described in Materials & Methods. One day post-transfection, TN1 tryptone was added to the cell medium in order to increase protein productivity (Pham et al. 2005). Western Blots analyses were performed to verify expression. EGF chimeras were found to be efficiently secreted (Figure 3.2, compare signal intensity for cell supernatants versus related cell lysates).

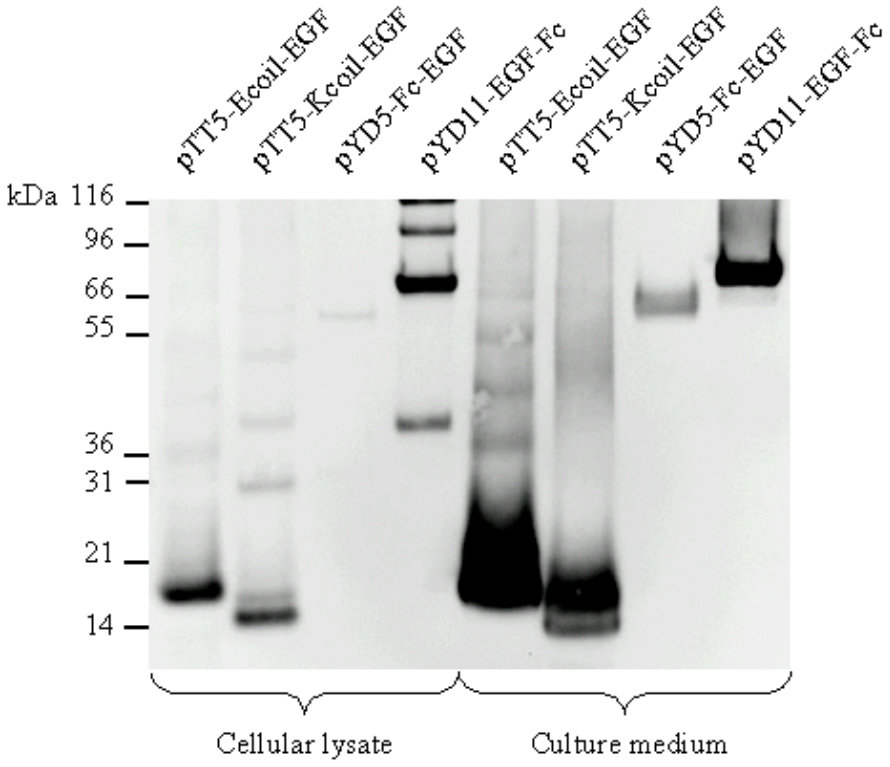

Figure 3.2 : Small-scale expression of tagged EGF in 293-6E cells.

Presence of the various EGF fusion proteins was tested in the culture medium and cell lysate 5 days post-transfection by Western Blotting. The same volume (15 µL) of cell extract and culture medium was loaded in each lane.

3.2.4.2 Purification of various tagged EGF

For each construct, production was then performed in 500-mL flasks in serum free medium to facilitate subsequent purification. Due to the presence of the $(His)_8$ tag, Ecoil-EGF and Kcoil-EGF were purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). Fc-EGF and EGF-Fc were purified by protein A affinity chromatography. Results for the purification of the different tagged EGF are shown in Figure 3.3. The purification was efficient for each construct with a yield of 4.0, 0.6, 7.2 and 4.3 mg per liter of medium for Ecoil-EGF, Kcoil-EGF, Fc-EGF and EGF-Fc, respectively.

3.2.4.3 *In vitro* cell assays

To test the bioactivity of the different fusion proteins corresponding to tagged EGF, we evaluated their ability to induce EGF receptor phosphorylation upon EGF binding in an *in vitro* cell assay. Increasing quantities of purified EGF constructs were added to A-431 cells that are known to express high levels of EGF receptor (Yarden et al. 1985). Cells were lysed 5 minutes after EGF addition and the phosphorylation level of EGF receptor was quantified by Western blot using anti-phosphotyrosine antibody (Figure 3.4a). Ecoil-EGF, Kcoil-EGF and EGF-Fc efficiently induced EGF receptor phosphorylation whereas no phosphorylation was observed for Fc-EGF (Figure 3.4b). Ecoil-EGF was found to be as active as untagged EGF (EC_{50} of 5.5 and 4.3 nM, respectively) while EGF-Fc and Kcoil-EGF had EC_{50} of 17 and 63 nM, respectively (Figure 3.4b).

3.2.4.4 Binding of the artificially dimerized EGF receptor ectodomain (EGFRED-Fc) to immobilized tagged EGF

In order to complement our *in vitro* cell assay results, the interactions of both N- and C-terminally Fc-tagged EGF with an artificially dimerized version of the extracellular domain of EGF receptor (EGFRED-Fc) was then studied in real time by surface plasmon resonance (SPR). EGF-Fc and Fc-EGF were covalently immobilized (2,800 and 3,900 RUs, respectively) onto different biosensor surfaces through their amine groups in a non-oriented fashion. Several concentrations of the artificially-dimerized EGF receptor ectodomain (EGFRED-Fc) ranging from 5 to 80 nM were then injected in duplicate over both C- and N-terminally tagged EGFs as well as over related control surfaces. Control-corrected sensorgrams related to these series of experiments are shown in Figure 3.5a and 3.5b, respectively. In the case of EGF-Fc (Figure 3.5a), the receptor ectodomain binding was detected at concentrations as low as 5 nM. Also, at the biosensor surface, the receptor ectodomain/EGF-Fc complex was found to be stable. That is, a global analysis of the corrected sensorgrams shown in Figure 3.5a indicated that the interaction was characterized by an apparent kinetic dissociation constant of $(1.11 \pm 0.01) \times 10^{-4}\ s^{-1}$. The apparent thermodynamic dissociation constant, K_D, for EGFRED-Fc/EGF-Fc interactions was in the low nanomolar range (16 ± 0.5 nM).

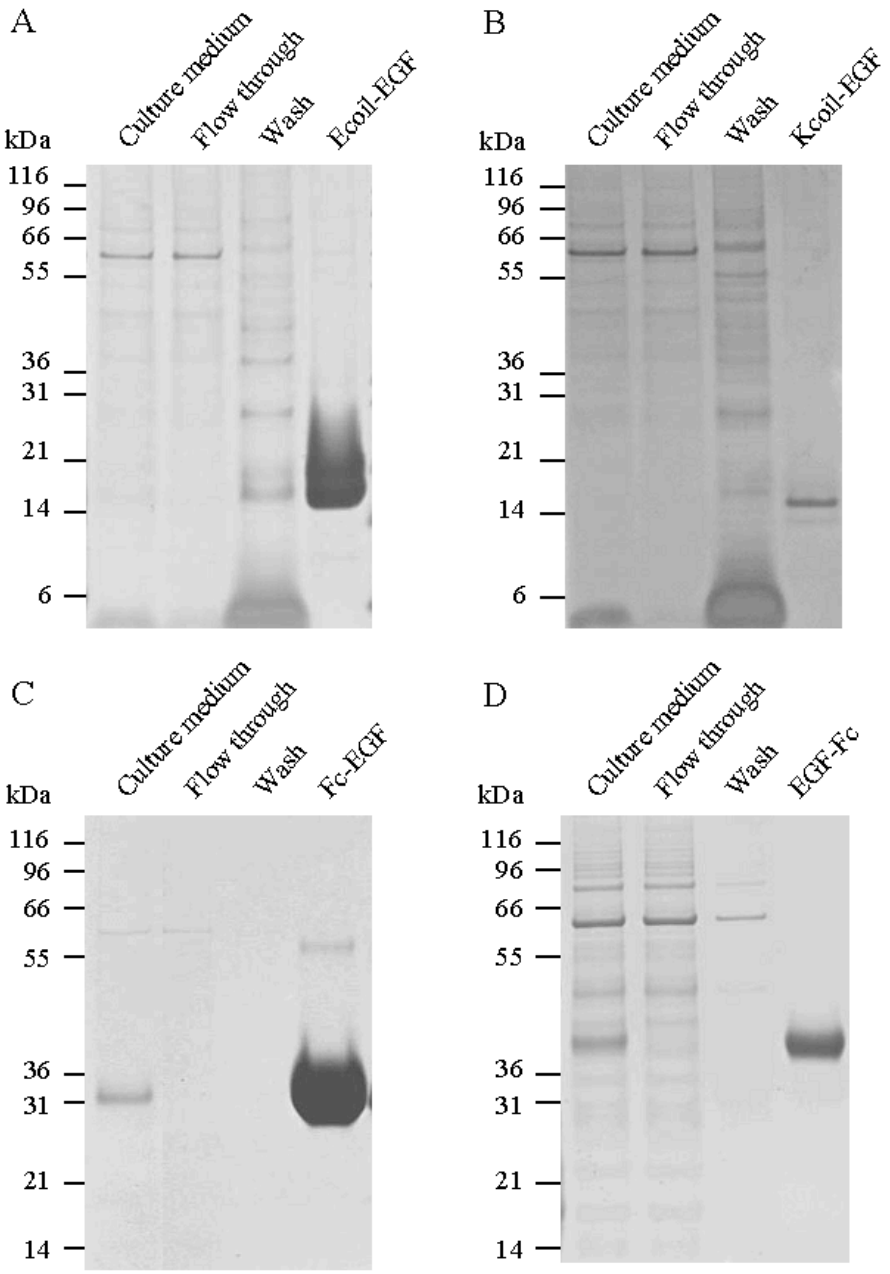

Figure 3.3 : Production and purification of tagged EGFs.

SDS-PAGE analysis of Ecoil-EGF (A), Kcoil-EGF (B), Fc-EGF (C) and EGF-Fc (D) purified by affinity chromatography as described in the Materials and Methods section. The gel was stained with Coomassie-blue R250.

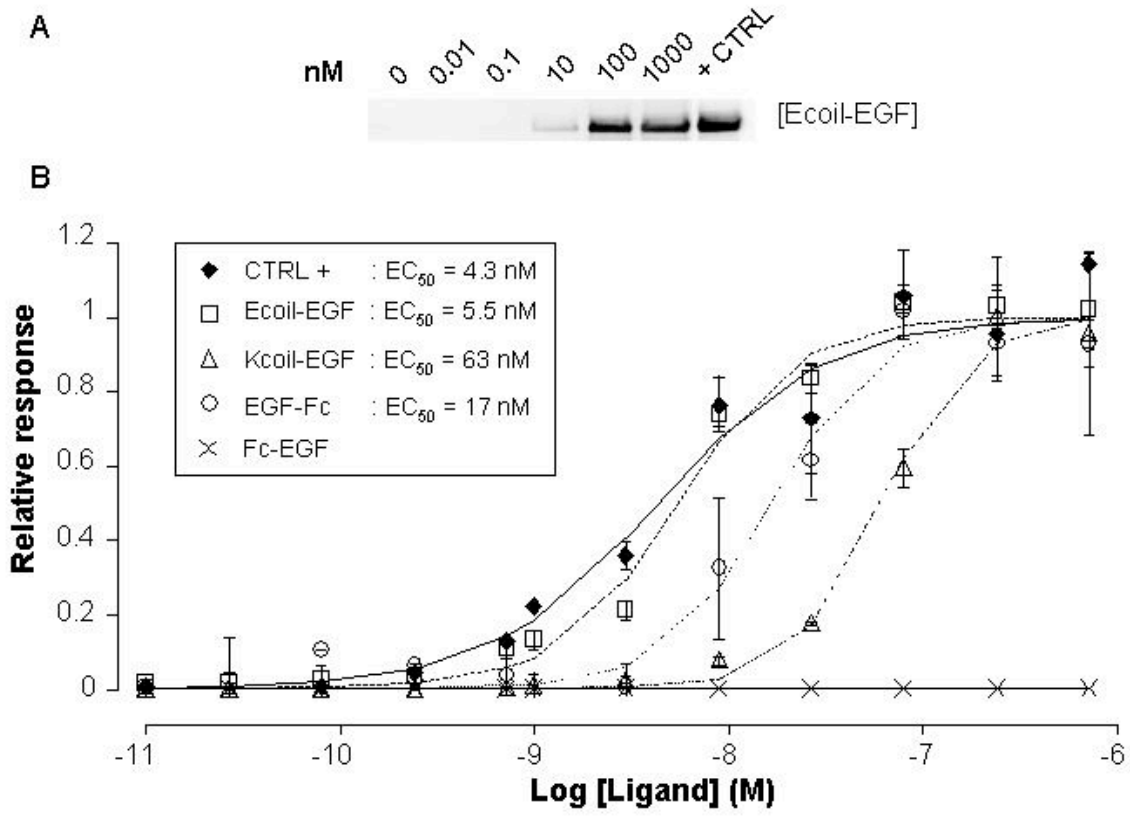

Figure 3.4 : *In vitro* cell assays.

A-431 cells were treated with various concentrations of untagged- (control) or tagged-EGF ranging from 0 to 1 μM for 5 min. Cells were then lysed and autophosphorylation of EGF receptor was monitored by Western Blot using a chemiluminescent substrate (A). The 180 kDa band immunoreactive to anti-pTyr antibody (corresponding to EGFR) was quantified using a Kodak 440cf imager (n=3 for commercial EGF and Ecoil-EGF and n=2 for Kcoil-EGF and Fc-tagged EGF) (B).

In contrast, when EGFRED-Fc, injections were performed over N-terminally immobilized Fc-tagged EGF, a weaker signal was recorded with Fc-EGF as compared to EGF-Fc (3 RUs vs 28 RUs with 80 nM EGFRED-Fc, compare Figure 3.5a and 3.5b). Numerical analysis of this sets of sensorgrams was not possible as a visual inspection of the EGFRED-Fc/Fc-EGF binding clearly indicated that the interactions were transient, i.e. characterized by extremely fast dissociation rates and very low affinity (K_D >> 100 nM).

3.2.4.5 Binding of the artificially dimerized extracellular domain of EGF receptor, EGFRED-Fc, to immobilized coil-tagged EGF

Our SPR kinetic study was complemented by monitoring the interactions of the artificially-dimerized EGF receptor ectodomain (EGFRED-Fc) with surface immobilized coil-tagged EGF. As opposed to the coupling strategy, we used in the case of Fc-tagged EGF, coil-tagged EGFs were non-covalently captured at the biosensor surface in an oriented fashion. This was achieved through coiled-coil interactions. In a first step, E and K coil peptides harbouring an engineered cysteine at their N-termini were covalently immobilized using thiol chemistry over different biosensor surfaces (400 RUs of each coil). Injections of coil-tagged EGF over surfaces on which the appropriate coil partner had been immobilized resulted in its non-covalent but stable capture (Figure 3.6). Interactions of captured EGF with the artificially-dimerized EGF receptor ectodomain (EGFRED-Fc) were then monitored by injecting the latter over coil-tagged EGF and related mock surfaces.

The control-corrected sensorgrams corresponding to ectomain injections (concentrations ranging from 0.25 to 10 nM) over 100 RUs of captured Ecoil-EGF and Kcoil-

EGF were similar (Figure 3.6). However, the amplitude of the signal corresponding to ectodomain net accumulation at the end of the injection for the highest concentration differed by 20 % (410 versus 360 RU of accumulated material over captured Ecoil-EGF and Kcoil-EGF, respectively). Of interest, both interactions were characterized by similar fast on-rates and extremely low off-rates (Table 3.1), resulting in almost equal apparent K_D (44 ± 5 and 55 ± 7 pM for Ecoil-EGF and Kcoil-EGF, respectively, see Table 3.1).

3.2.5 Discussion

Production of EGF in *E. coli* had been previously reported to lead to high final concentration in EGF but mainly present in inclusion bodies (87 mg/L of culture medium (Lee et al. 2000)). The restoration of EGF bioactivity was however reported to require labor-intensive and time-consuming refolding steps (Lee et al. 2000). EGF expression in mammalian systems has also been reported by Mroczkowski and colleagues in NIH 3T3 cells (Mroczkowski 1991; Mroczkowski et al. 1988). In that specific case, however, EGF was expressed in its precursor form and was found as membrane-associated as well as in the conditioned medium.

In order to obtain fully bioactive tagged EGF (for subsequent immobilization on scaffolds) as well as to avoid downstream processing steps such as refolding and precursor cleavage, we thus set up an experimental strategy aiming at secreting high levels of bioactive tagged EGF. The latter is based on the use of HEK293 cells, combined with PEI-mediated transfection, as we previously reported excellent yields for the expression of various bioactive proteins using this approach (Pham et al. 2005).

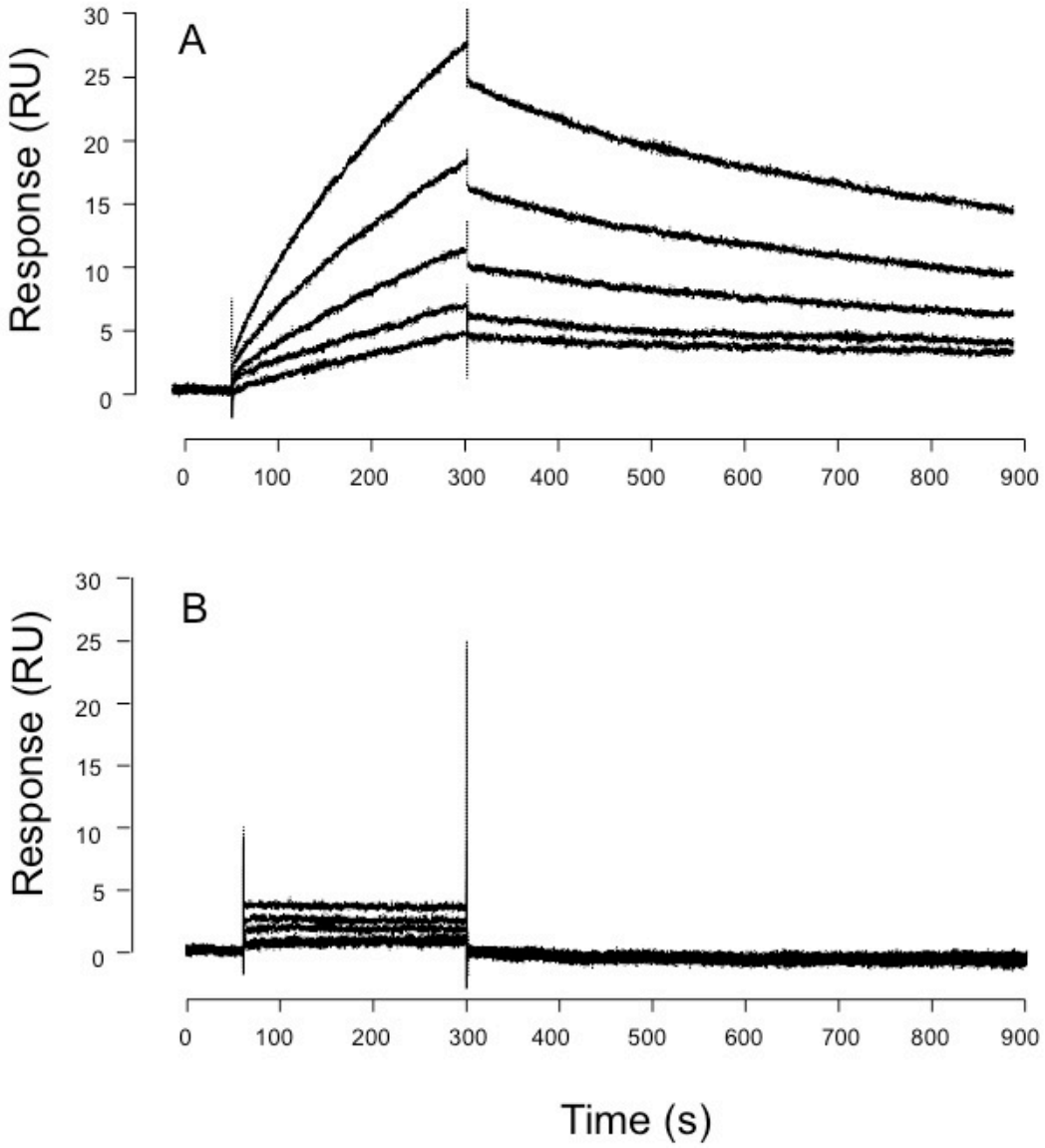

Figure 3.5 : Control-corrected sensorgrams corresponding to Fc-tagged EGF interactions with EGFRED-Fc.

Increasing concentrations of EGFRED-Fc ranging from 5 to 80 nM were injected in duplicate over biosensor surfaces coated with EGF-Fc (A) or Fc-EGF (B).

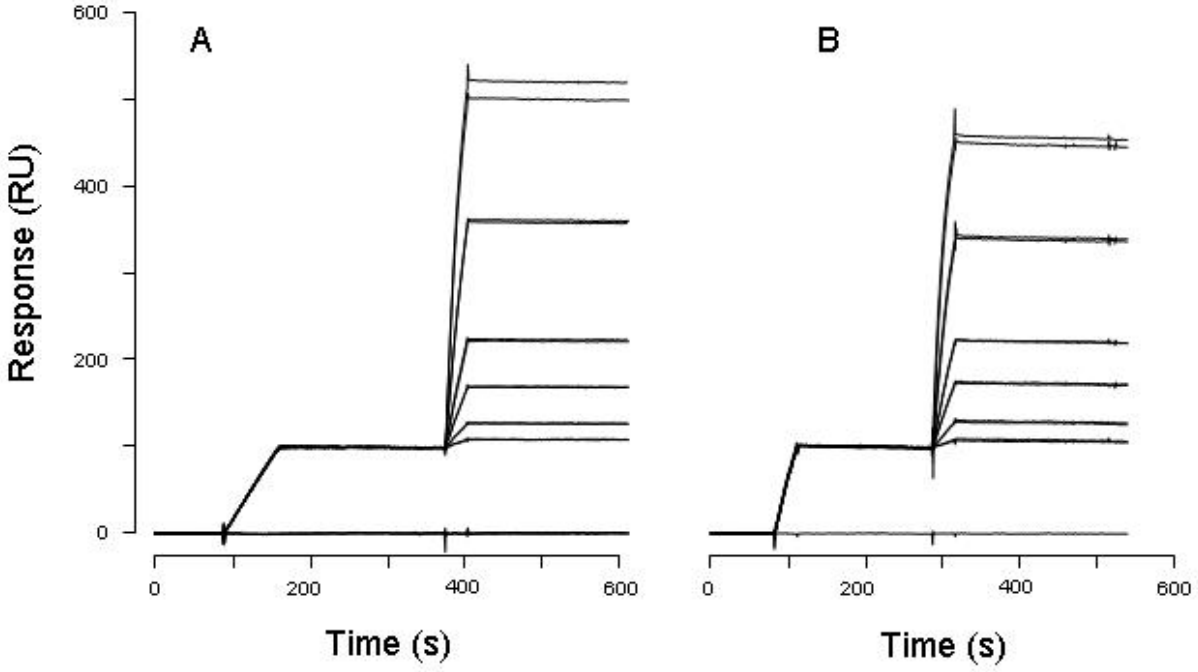

Figure 3.6 : Control-corrected sensorgrams corresponding to EGFRED-Fc interactions with captured E or Kcoil-EGF.

Increasing concentrations of EGFRED-Fc ranging from 0.25 to 10 nM were injected in duplicate over 100 RU of Ecoil-EGF (A) or Kcoil-EGF (B) previously captured to biosensor surfaces via coiled-coil interactions.

Table 3.1 : Kinetic and thermodynamic parameters corresponding to the interactions of EGFRED-Fc with captured Ecoil-EGF and Kcoil-EGF shown in Figure 3.6.

Parameters	Ecoil-EGF	Kcoil-EGF
k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	$(0.745 \pm 0.003) \times 10^{6}$	$(1.19 \pm 0.05) \times 10^{6}$
k_{off} (s^{-1})	$(3.3 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	$(6.5 \pm 0.4) \times 10^{-5}$
K_D (pM)	44 ± 5	55 ± 7

Values correspond to average value ± the standard deviation of two independent experiments.

Expression vectors coding for various versions of tagged EGF were thus generated using mature EGF cDNA. Two types of tags were also selected, based on their potential use for peptide or protein immobilization in the field of tissue engineering. Those correspond to *i) de novo* designed coils (Ecoil or Kcoil) (De Crescenzo et al. 2003a) since we already demonstrated that the E/K coiled-coil system is efficient for protein capture on three-dimensional surfaces (De Crescenzo et al. 2003b) and since functionalization of hydrogels with a similar peptide-based heterodimeric system had been recently reported (Willcox et al. 2005) and *ii)* the Fc portion of immunoglobulin G (Ogiwara et al. 2005). For each version of tagged EGF, expression vectors were designed in order to allow efficient secretion. This was achieved by inserting cDNA coding for Interleukin-2 or Immunoglobulin G signal peptides upstream of the EGF cDNA (IL2SP and IgGSP, Figure 3.1). Our approach was validated as we found that both IL2SP and IgGSP efficiently promoted secretion of coil-tagged and Fc-tagged EGF chimera, respectively (Figure

3.2). After production (500-mL scale), EGF chimeras present in conditioned serum-free media were purified by a single affinity purification step (Figure 3.3), yielding 0.6 to 7.2 mg of highly pure tagged EGF per liter of medium. In the case of Fc-tagged EGF chimera, the capacity of Fc-tagged protein to form covalent dimer (Coe et al. 2001) was also confirmed by Western blotting and Coomassie blue staining detection performed after SDS-PAGE in non-reducing and reducing conditions, respectively (Figures 3.2 and 3.3).

The bioactivity of each EGF fusion protein was then evaluated in an *in vitro* cell assay examining their ability, when in solution, to promote phosphorylation of EGF receptor present at the surface of A-431 cells. *In vitro* cell assay results unambiguously demonstrated that purified Ecoil-EGF was as active as our positive control (i.e. untagged commercially available EGF, Figure 3.4) as both untagged and Ecoil-tagged EGF were characterized by similar EC_{50} in that assay (4.3 and 5.5 nM, respectively). In contrast, Fc-EGF was not able to promote phosphorylation in the same assay. This finding is in excellent agreement with our SPR results indicating that captured Fc-EGF was not able to bind efficiently to EGF receptor ectodomain (Figure 3.5b) while EGF-Fc was (Figure 3.5a). The other tagged versions of EGF were all characterized by higher EC_{50} values than that of Ecoil-EGF (17 and 63 nM for EGF-Fc and Kcoil-EGF, respectively), indicating non-optimal bioactivity of the EGF portion of these fusion proteins (Figure 3.4). Thus, the type of tag (Ecoil, Kcoil or Fc) as well as its location within the chimera (N or C-terminal) has a strong influence on the bioactivity of the latter. Such a negative impact on bioactivity may be attributed to the high pI (10.36) of the Kcoil moiety that may interact non-specifically with cell-surface heparan sulphate proteoglycans, thus reducing its effective concentration in the medium. Neutralization of the Kcoil with free Ecoil prior to its addition to the cells should be performed to confirm this hypothesis.

Finally, additional SPR experiments demonstrated the usefulness of the E/K coiled-coil system in tissue engineering for achieving optimal ligand tethering (Figure 3.6) as both Ecoil- and Kcoil-EGF, when captured to biosensor surfaces via coiled-coil interactions, were demonstrated to bind to the artificially dimerized extracellular domain of EGF receptor in a highly stable fashion (dissociation rates of 3.3×10^{-5} and 6.5×10^{-5} s^{-1}, Table 3.1) with strong apparent affinities (K_D of approx. 50 pM, Table 3.1). Of interest, a comparison of EGF receptor ectodomain interactions with oriented Kcoil-EGF (Figure 3.6a) to those with EGF-Fc (Figure 3.5a) further highlights the benefit of an oriented capture approach of EGF. That is, even though higher molar amounts of EGF-Fc were immobilized for SPR experiments (3,900 RUs of immobilized EGF-Fc corresponds to 40×10^{-15} mol/mm^2 while 100 RUs of Kcoil-EGF corresponds to 6×10^{-15} mol/mm^2) and even though EGF-Fc was found to be more active *in vitro* (see above), injections of the EGF receptor moiety resulted in a higher accumulation and in the formation of a more stable EGF- receptor complex on the Kcoil-EGF surface (optimized capture) versus EGF-Fc surface (random coupling) (compare accumulation and stability in Figures 3.5a and 3.6a).

In conclusion, the present study highly suggests that combining the Ecoil tag to an efficient mammalian expression system (transient gene expression in HEK293 cells cultured in serum-free medium) allows for the rapid production, purification and efficient capture of bioactive EGF that can be immobilized onto various Kcoil-supports. Furthermore, our strategy can be readily applied to other growth factors. In that respect, the use of the Ecoil tag would significantly ease the grafting of any growth factor since only one type of support preparation (e.g., Kcoil-functionalization) would be compatible with any Ecoil tagged protein. This concept

sharply contrasts with current approaches relying on direct chemical coupling, which is a trial-and-error process dependent on the physiochemical properties of each individual protein.

3.2.6 Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to Dr.Maureen O'Connor-McCourt (BRI, NRC) for providing the E and Kcoil sequences and A-431 cells as well as for fruitful discussion during the writing of this manuscript. This work was supported by the Canada Research Chair on Protein-Enhanced Biomaterials (G.D.C.), the Canada Research Chair on the Development of Metabolic Engineering Tools (M.J.) and by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (C.B., G.D.C., M.J.). This is an NRC publication number 47816.

3.2.7 References

Backer MV, Patel V, Jehning BT, Claffey KP, Backer JM. 2006. Surface immobilization of active vascular endothelial growth factor via a cysteine-containing tag. Biomaterials 27(31):5452-5458.

Bell GI, Fong NM, Stempien MM, Wormsted MA, Caput D, Ku LL, Urdea MS, Rall LB, Sanchez-Pescador R. 1986. Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization. Nucleic Acids Res 14(21):8427-8446.

Chen G, Ito Y, Imanishi Y. 1997. Photo-immobilization of epidermal growth factor enhances its mitogenic effect by artificial juxtacrine signaling. Biochim Biophys Acta 1358(2):200-208.

Coe AP, Askari JA, Kline AD, Robinson MK, Kirby H, Stephens PE, Humphries MJ. 2001. Generation of a minimal alpha5beta1 integrin-Fc fragment. J Biol Chem 276(38):35854-35866.

Crombez M, Chevallier P, Gaudreault RC, Petitclerc E, Mantovani D, Laroche G. 2005. Improving arterial prosthesis neo-endothelialization: application of a proactive VEGF construct onto PTFE surfaces. Biomaterials 26(35):7402-7409.

De Crescenzo G, Grothe S, Zwaagstra J, Tsang M, O'Connor-McCourt MD. 2001. Real-time monitoring of the interactions of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms with latency-associated protein and the ectodomains of the TGF-beta type II and III receptors reveals different kinetic models and stoichiometries of binding. J Biol Chem 276(32):29632-29643.

De Crescenzo G, Litowski JR, Hodges RS, O'Connor-McCourt MD. 2003a. Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. Biochemistry 42(6):1754-1763.

De Crescenzo G, Pham PL, Durocher Y, O'Connor-McCourt MD. 2003b. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding to the extracellular domain of the type II TGF-beta receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system

demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding. J Mol Biol 328(5):1173-1183.

Durocher Y, Perret S, Kamen A. 2002. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. Nucleic Acids Res 30(2):E9-1-E9/9.

Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, Lemmon MA. 2003. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. Mol Cell 11(2):507-517.

Gobin AS, West JL. 2003. Effects of Epidermal Growth Factor on Fibroblast Migration through Biomimetic Hydrogels. Biotechnol Prog. 19(6):1781-1785.

Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E, Sun J, Chevrier A, Shive MS, Buschmann MD. 2005. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. J Bone Joint Surg Am 87(12):2671-2686.

Ichinose J, Morimatsu M, Yanagida T, Sako Y. 2006. Covalent immobilization of epidermal growth factor molecules for single-molecule imaging analysis of intracellular signaling. Biomaterials 27(18):3343-3350.

Ito Y, Chen G, Imanishi Y. 1998. Micropatterned immobilization of epidermal growth factor to regulate cell function. Bioconjug Chem 9(2):277-282.

Kapur TA, Shoichet MS. 2004. Immobilized concentration gradients of nerve growth factor guide neurite outgrowth. J Biomed Mater Res A 68(2):235-243.

Kato K, Sato H, Iwata H. 2005. Immobilization of histidine-tagged recombinant proteins onto micropatterned surfaces for cell-based functional assays. Langmuir 21(16):7071-7075.

Klenkler BJ, Griffith M, Becerril C, West-Mays JA, Sheardown H. 2005. EGF-grafted PDMS surfaces in artificial cornea applications. Biomaterials 26(35):7286-7296.

Kuhl PR, Griffith-Cima LG. 1996. Tethered epidermal growth factor as a paradigm for growth factor-induced stimulation from the solid phase. Nat Med 2(9):1022-1027.

Lee JY, Yoon CS, Chung IY, Lee YS, Lee EK. 2000. Scale-up process for expression and renaturation of recombinant human epidermal growth factor from Escherichia coli inclusion bodies. Biotechnol Appl Biochem 31(3):245-248.

Merrett K, Griffith CM, Deslandes Y, Pleizier G, Dube MA, Sheardown H. 2003. Interactions of corneal cells with transforming growth factor beta 2-modified poly dimethyl siloxane surfaces. J Biomed Mater Res A 67(3):981-993.

Mroczkowski B. 1991. Expression of epidermal growth factor precursor cDNA in animal cells. Methods Enzymol 198:175-185.

Mroczkowski B, Reich M, Whittaker J, Bell GI, Cohen S. 1988. Expression of human epidermal growth factor precursor cDNA in transfected mouse NIH 3T3 cells. Proc Natl Acad Sci U S A 85(1):126-130.

Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M and others. 2002. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. Cell 110(6):775-787.

Ogiwara K, Nagaoka M, Cho CS, Akaike T. 2005. Construction of a novel extracellular matrix using a new genetically engineered epidermal growth factor fused to IgG-Fc. Biotechnol Lett 27(20):1633-1637.

Palsson B, Hubbell JA, Plonsey R, Bronzino JD. 2003. Boca Raton: CRC Press. 407 p.

Pham PL, Perret S, Cass B, Carpentier E, St-Laurent G, Bisson L, Kamen A, Durocher Y. 2005. Transient gene expression in HEK293 cells: peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis. Biotechnol Bioeng 90(3):332-344.

Schultz G, Rotatori DS, Clark W. 1991. EGF and TGF-alpha in wound healing and repair. J Cell Biochem 45(4):346-352.

Tripet B, De Crescenzo G, Grothe S, O'Connor-McCourt M, Hodges RS. 2002. Kinetic analysis of the interactions between troponin C and the C-terminal troponin I regulatory region and validation of a new peptide delivery/capture system used for surface plasmon resonance. J Mol Biol 323(2):345-362.

Wang Q, Bohn PW. 2006. Surface composition gradients of immobilized cell signaling molecules. Epidermal growth factor on gold. Thin Solid Films 513(1-2):338-346.

Willcox PJ, Reinhart-King CA, Lahr SJ, DeGrado WF, Hammer DA. 2005. Dynamic heterodimer-functionalized surfaces for endothelial cell adhesion. Biomaterials 26(23):4757-4766.

Yarden Y, Harari I, Schlessinger J. 1985. Purification of an active EGF receptor kinase with monoclonal antireceptor antibodies. J Biol Chem 260(1):315-319.

CHAPITRE 4 LE FACTEUR DE CROISSANCE DE L'ÉPIDERME IMMOBILISÉ PAR L'INTERMÉDIAIRE DE L'INTERACTION COILED-COIL INDUIT LA PHOSPHORYLATION DES RÉCEPTEURS PRÉSENTS À LA SURFACE DES CELLULES

4.1 Présentation de l'article

Cette section reprend l'article intitulé "**Epidermal growth factor tethered through coiled-coil interactions induces cell surface receptor phosphorylation"** qui a été publié dans la revue *Bioconjugate Chemistry* en 2009 (Vol. 20, No. 8, p.1569-1577).

L'immobilisation orientée de la protéine Ecoil-EGF via l'interaction coiled-coil nécessite la fixation préalable du coil K sur un support. Dans cet article, le greffage covalent du coil K et l'immobilisation orientée de la protéine Ecoil-EGF via l'interaction coiled-coil ont pu être caractérisés par ellipsométrie et mesures de l'angle de contact. L'efficacité de la chimie utilisée a également été testée en utilisant un biocapteur dont le principe de détection est basé sur la résonance plasmonique de surface. Des essais cellulaires basés sur l'utilisation de cellules épidermiques (A-431) ont permis de comparer notre stratégie de fixation de EGF à des approches basées sur l'utilisation de EGF en solution ou de EGF immobilisé de manière non orientée.

4.2 Epidermal growth factor tethered through coiled-coil interactions induces cell surface receptor phosphorylation

Cyril Boucher[†,‡], Benoît Liberelle[†], Mario Jolicoeur[†], Yves Durocher[‡] and Gregory De Crescenzo[†,]*

†Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologie Biomédicales (GRSTB), Bio-P^2 Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (Qc), Canada H3C 3A7.

‡Animal Cell Technology Group, Bioprocess Sector, Biotechnology Research Institute,

Corresponding Author :

Grégory De Crescenzo, PhD

Tel. : 001 514 340-4711 (#7428)

Fax : 001 514 340-2990

gregory.decrescenzo@polymtl.ca

4.2.1 Abstract

We have elaborated and validated a novel approach for the oriented tethering of proteins such as the epidermal growth factor (EGF) on aminated surfaces. The grafting reactions were optimized to generate dense and homogeneous EGF layer. Impact of EGF orientation on A-431 cellular response was investigated. Our results demonstrate that, in sharp contrasts to responses obtained with soluble EGF supply or with randomly grafted EGF, oriented immobilization of EGF via a *de novo*-designed coiled-coil capture system lead to a sustained phosphorylation of A-431 cell surface EGF receptors. Our results thus indicate that oriented protein immobilization via coiled-coil interactions is an efficient and versatile method to control tethering of bioactive molecules for future applications in the field of regenerative medicine and tissue engineering.

4.2.2 Keywords

EGF, E/K coiled-coil interactions, Surface characterization, Cell culture

4.2.3 Introduction

The development of new materials with potential to serve as two- and three-dimensional scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine purposes has undergone rapid expansion (Little et al. 2008). Advances in surface chemistry, much of it propelled by plasma-based polymer modification (Merrett et al. 2003; Vallieres et al. 2007) and chemical modification

methodologies (Nakajima et al. 2007; Vallieres et al. 2007) have opened interesting avenues for controlling protein binding as well as cell adhesion and differentiation (Lerouge et al. 2007). Another level of tailoring may also be added to this new class of materials by tethering specific macromolecules including peptides (Hadjizadeh et al. 2007) or proteins (Kuhl and Griffith-Cima 1996) in order to synergistically enhance material intrinsic properties.

In that endeavour, immobilization of the epidermal growth factor (EGF) has already been reported (Elloumi et al. 2006; Fan et al. 2007; Ichinose et al. 2006; Klenkler et al. 2005; Kuhl and Griffith-Cima 1996; Ogiwara et al. 2005; Ogiwara et al. 2006; Stefonek and Masters 2007). EGF is known to promote the oligomerization and activation of EGF receptors (EGFR) present at the cell surface (Ogiso et al. 2002) which ultimately leads in a broad spectrum of phenotypic responses such as the proliferation and differentiation of many cell types, including epithelial and mesenchymal cells. The role of soluble EGF in neovascularization and chemotaxis in wound healing processes has also been documented (Barrientos et al. 2008). Recently, EGF has also been proposed as a promising candidate for *ex vivo* expansion of mesenchymal stem cells as well as neuronal stem cells, two attractive cell sources for tissue engineering applications (Fan et al. 2007; Nakaji-Hirabayashi et al. 2009). Of interest, EGF immobilization has been demonstrated to enhance EGF mitogenic effect on CHO cells when compared to its soluble form (Chen et al. 1997). On the same note, tethered EGF gradient surfaces were also shown to induce accelerated and polarized migration of keratinocytes, a key issue in wound closure mechanism (Stefonek and Masters 2007).

The most frequent method for tethering human or murine EGF on solid supports relies on covalent immobilization through the reactive amine groups present at the EGF N-terminus or on its lysine side-chain (at position 28 and 48 for human EGF, no lysine in murine EGF) or by

photoimmobilization. Although unambiguous effects on cell growth and phenotype have been reported with these approaches, it is likely that these immobilization methods are not efficiently transposable to growth factors harboring multiple lysine residues. That is, random amine coupling may not be optimal since it may negatively impact protein internal conformation, relative molecular orientation and spatial homogeneity, leading to diminished or even totally abrogated bioactivity (Kuhl and Griffith-Cima 1996). These concerns have led to the development of alternative strategies for oriented tethering of proteins on various substrates (Nakaji-Hirabayashi et al. 2007; Ogiwara et al. 2005). For EGF, most of them rely on the design of an EGF fusion protein comprising the Fc region of immunoglobulin G (IgG) or a His tag for their capture onto solid supports that have been previously functionalized with Protein A/G or nitrilotriacetate (NTA), respectively (Nakaji-Hirabayashi et al. 2009; Ogiwara et al. 2005). The use of a hydrophobic tag has also been reported for EGF immobilization on hydrophobic supports (Elloumi et al. 2006).

In a previous study (Boucher et al. 2008), we have highlighted the potential of a new capture system based on *de novo*-designed peptides, i.e., the E and K coils (Chao et al. 1996; De Crescenzo et al. 2003a). These two distinct and unstructured 35 amino acid-long peptides form a stable heterodimeric E/K coiled-coil complex upon binding (De Crescenzo et al. 2003a). This coiled-coil system was demonstrated to be efficient for the stable and oriented capture of coil tagged proteins (De Crescenzo et al. 2003a), including fully-bioactive N-terminally coil-tagged EGF that had been produced in mammalian cells (Boucher et al. 2008) or in bacteria (Le et al. 2009).

The aim of this work was to further investigate the extend to which coiled-coil oriented immobilization of EGF would promote EGFR activation and, in turn, modulate cell response.

Silicon surfaces with native oxide overlayer (Si/SiO_2) harboring primary amines through 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) functionalization, were used to characterize and optimize the oriented covalent immobilization of Kcoil peptides and the subsequent capture of Ecoil-tagged EGF proteins (Ecoil-EGF). Dry thickness and water contact angle measurements were achieved to evaluate the amount of end-grafted molecules and the macroscopic homogeneity of the grafted layer, respectively. The optimized experimental conditions were then applied to cell culture-compatible amino-coated glass surfaces. Our study was then complemented by culturing A-431 cells on these Ecoil-EGF derivatized surfaces. This cell line was selected as a model system since A-431 response to EGF is well documented. Our *in vitro* cellular assays demonstrated that oriented EGF immobilization lead to a strong and sustained EGFR autophosphorylation as compared to that observed with randomly immobilized or soluble EGF. Altogether, our results demonstrated that the E/K coiled-coil system is an interesting alternative for the oriented immobilization of EGF, and by extension, of any growth factor, for future applications in the fields of tissue engineering and regenerative medicine.

4.2.4 Materials and Methods

4.2.4.1 Chemicals and Reagents

Native silicon wafers (Prime Si P/Boron) were obtained from University Wafer (South Boston, MA), and amino-coated glass slides (10 x 10 mm) were from Erie Scientific Co. (Portsmouth, NH). Anhydrous 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES, 99% purity),

ethylenediamine, cysteine (99+% purity), glutaric anhydride (95% purity) and sodium chloride (99.99% purity) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON). Succinimidyl 6-[30-(2-pyridyldithio)-propionamido]hexanoate (LC-SPDP, 95+% purity) was obtained from Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL). Hydrogen peroxide (30% v/v), chlorhydric acid (37% v/v), chloroform (99.8% purity), sulfuric acid (98% purity), dimethylsulfoxide (DMSO, 99+% purity) and toluene (99.5% purity) were purchased from VWR International Inc (Mont-Royal, Qc). All solvents were distilled under strict anhydrous conditions prior to use. MilliQ quality water (18.2 MΩ.cm; total organic compounds (TOC) = 4 ppb) was generated with a Millipore Gradient A 10 purification system. Cysteine-tagged Kcoil peptides were synthesized as previously described (De Crescenzo et al. 2003a). Untagged human EGF was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). All the surface plasmon resonance (SPR) experiments were performed using a Biacore 3000 instrument (GE Healthcare, Baie d'Urfe, Qc). CM4 sensor chips and the amine coupling kit containing N-hydroxysuccinimide (NHS), ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), ethanolamine, were also purchased from GE Healthcare.

4.2.4.2 Cell Culture

A human embryonic kidney (HEK) 293 cell line stably expressing EBNA1 (293-6E) was maintained in shake flasks (110 rpm) in F17 medium (Invitrogen, Burlington, ON) supplemented with glutamine (4 mM), geneticin (25 µg/mL) and pluronic acid (0.1%) in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. The A-431 cells were maintained in 175 cm^2 flasks in Dulbecco's modified

Eagle's medium (GIBCO/BRL, Burlington, ON) supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (Invitrogen, Burlington, ON) in 5% CO_2 incubator until 85-90% confluence.

4.2.4.3 E/Kcoil-EGF Production

As previously described (Boucher et al. 2008), Ecoil- and Kcoil-EGF were produced in HEK 293-6E cells and purified by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). Protein concentration was determined by Bradford method and analysed by SDS-PAGE. Purified Ecoil-EGF was then stored at -80°C until use. Note that the bioactivity of Ecoil-EGF was assayed in solution as described in (Boucher et al. 2008) and was found to be equal to that of untagged EGF.

4.2.4.4 Surface Preparation

All glassware was carefully cleaned by overnight immersion in a bath of KOH-saturated isopropyl alcohol followed by intensive rinsing with MilliQ water. Glassware was dried in a clean oven at 120 °C under atmospheric pressure. Prior to layers grafting, silicon and amino-coated glass surfaces were washed to remove any adsorbed organic compounds. The silicon surfaces (10 x 10 mm) were cleaned according to the Piranha procedure, i.e. the surfaces were immersed in a 3:1 mixture of sulfuric acid and hydrogen peroxide for 10 min at 100°C. After intensive rinsing with MilliQ water, the surfaces were dried in air at room temperature and then introduced in a dried Schlenk. To ensure anhydrous conditions, two cycles of vacuum/dry argon

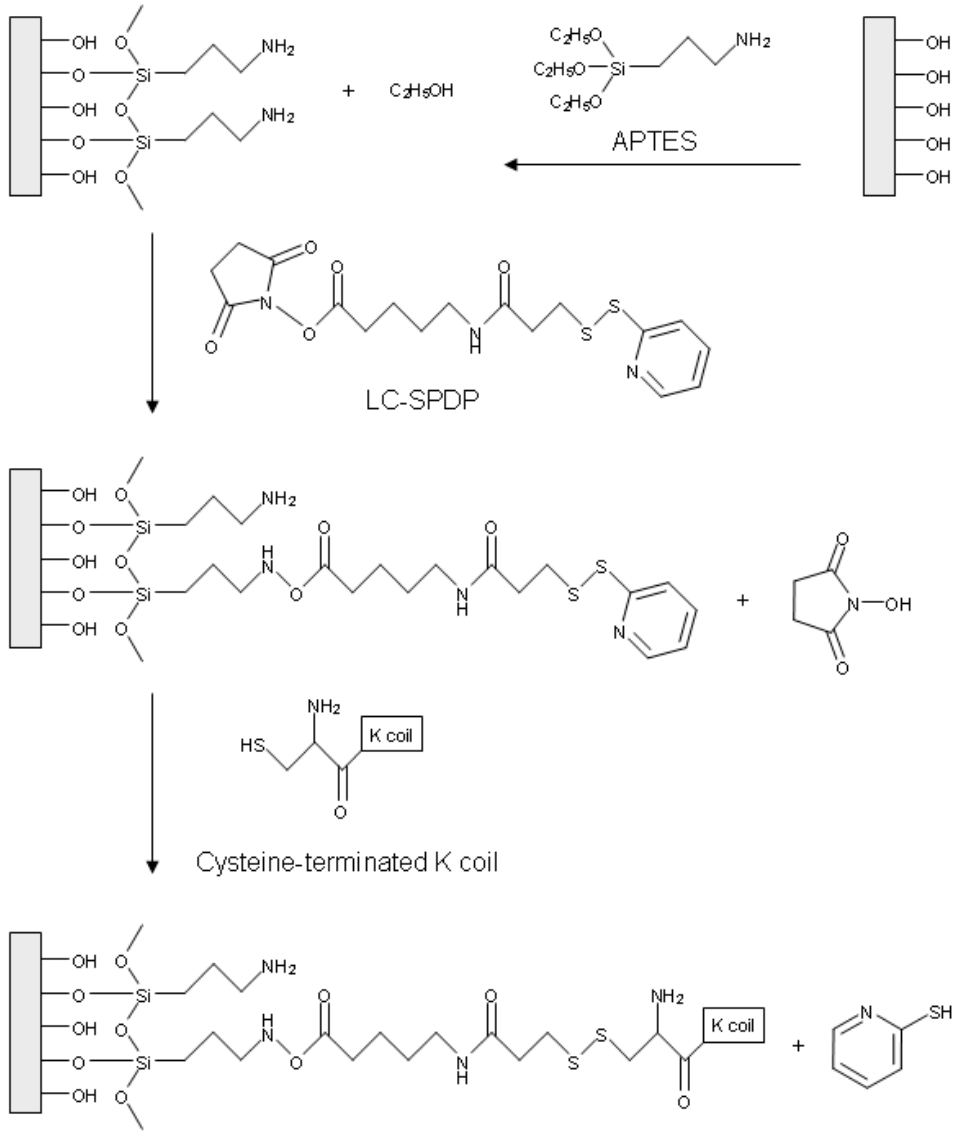

Figure 4.1 : Schematic illustration of the chemical grafting procedure.

End-grafting of APTES on silicon surfaces was followed by chemical immobilization of cysteine-tagged Kcoil peptides on APTES-coated surfaces using LC-SPDP as linker.

were performed in the Schlenk. The amino-coated glass surfaces (10 x 10 mm) were cleaned in an ultrasonic bath for 1 min in distilled chloroform and then dried in air at room temperature.

4.2.4.5 Grafting Procedures

APTES Grafting on Silicon Surfaces. APTES layers were generated on silicon surfaces using a silanization procedure as previously reported (Liberelle et al. 2008). Briefly, APTES was first dissolved in anhydrous toluene at a concentration of 10 mM. The solution was injected through a 0.2 µm PTFE filter in dry Schlenk tubes each containing one silicon surface. After a reaction time of 3 h at room temperature, the surfaces were taken out from the Schlenk tubes, dried in air for 1 min, and placed in an oven at 120 °C for 1.5 h. Then, the surfaces were rinsed by soaking them in freshly distilled toluene for 5 min.

Kcoil Peptides Grafting on APTES-coated Silicon and Glass Surfaces. Kcoil peptides were immobilized onto APTES-coated surfaces via LC-SPDP linker (Ichinose et al. 2006). The surfaces were covered with 150 mL of 2 mM LC-SPDP in 100 mM phosphate buffer (10% DMSO) for 2 h at room temperature. The surfaces were rinsed by soaking them in MilliQ water for 5 min. Then, the thiol-reactive surfaces were covered with 150 mL of 10 mM cysteine-tagged Kcoil peptides (5 heptad repeats (De Crescenzo et al. 2003a)) in 10 mM phosphate buffer for 2 h at room temperature. The surfaces were finally rinsed by soaking them in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) and in MilliQ water. Unreacted LC-SPDP sites were blocked using 150 mL of 50 mM cysteine solution (1M NaCl in 0.1 M sodium acetate, pH 4.0) followed by rinsing with MilliQ water.

Ecoil-EGF Grafting and Degrafting. To immobilize the Ecoil-EGF on covalently attached Kcoil peptides, the Kcoil-grafted surfaces were covered with 150 mL of 600 nM Ecoil-EGF for 2 h at room temperature. The surfaces were finally rinsed by soaking them in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) and MilliQ water for 5 min. The detachment of the coil-tagged EGF from the surface was performed by soaking the surfaces in a 5M guanidium hydrochloride solution, followed by rinses in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) and MilliQ water for 5 min each.

Non-Oriented EGF Grafting. Untagged EGF was covalently grafted onto APTES-coated surfaces using disuccinimide glutarate (DSG) as linker. A glutaric acid solution was prepared by dissolving glutaric anhydride in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) to reach a final concentration of 0.1 mM. Reactive DSG molecules were obtained by mixing 200 µL of 200 mM EDC and 200 µL of 50 mM NHS in 2 mL of the glutaric acid solution. 150 µL of the freshly prepared reactive DSG solution was then deposited on the APTES-coated surfaces for 45 min at room temperature. The surfaces were rinsed in MilliQ water for 5 min, dried in air, and were reacted with 150 mL of 600 nM untagged EGF in MilliQ water (pH 5.5) for 2 h at room temperature.

4.2.4.6 SPR assays

SPR experiments were conducted at 25°C using HBS-T (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.05% Tween 20) as running buffer.

Kcoil Immobilization on Sensorchip. All the steps of the immobilization procedure were carried out at a flow rate of 5 mL/min. The carboxylic groups of CM4 sensorchips were activated by the injection of 50 mL of a mixture containing 0.05 M NHS and 0.2 M EDC. The NHS ester

groups were reacted with 50 mL of 1M ethylenediamine to introduce amino groups on the sensorchip surface (thus mimicking amino-coated glass surfaces). Remaining reactive NHS ester groups were blocked by injecting ethanolamine (50 mL of 1M ethanolamine). The amino groups were reacted with LC-SPDP (50 mL of 2 mM in 100 mM phosphate buffer, 10% DMSO) to end-graft cysteine-tagged Kcoil (30 mL of 10 mM Kcoil in 100 mM phosphate buffer). Finally, freshly prepared cysteine solution (150 mL of 50 mM cysteine in 0.1 M sodium acetate, 1M NaCl, pH 4.0) was injected to block any unreacted LC-SPDP sites.

E/Kcoil-EGF Immobilization. Ecoil-EGF proteins were injected 3 times at 10 nM, 100 nM and 500 nM for 2 min at a flow rate of 10 µL/min. Regeneration of the sensorchip (i.e. removal of Ecoil-EGF) was accomplished by 2 pulses of guanidium hydrochloride (50 µL, 100 µl/min, 5M). Finally, 100 nM Kcoil-EGF was injected for 2 min at 10 µL/min (control).

4.2.4.7 Contact Angle Measurements

Contact angle measurements were performed using a FTA200 Dynamic Contact Angle Analyzer (First Ten Angstrom Inc., Portsmouth, VA). All measurements were carried out in equilibrium static mode using MilliQ quality water as the probe liquid. Equilibrium contact angles q correspond to the mean values of measurements performed at three different locations on at least two different surfaces. Data analysis was performed using the FTA32 Video software.

4.2.4.8 Ellipsometric Measurements

Thickness measurements on silicon surfaces were performed with an automatic M2000 ellipsometer (J.A. Woollam Co. Inc., Lincoln, NE). Data were acquired in the wavelength range of 245–1650 nm. All measurements were carried out at an angle of incidence of 75°, with air as the ambient medium, at room temperature and at a normal relative humidity (ca 50%). The assumed refractive index of the grafted films was n = 1.465 (Wettero et al. 2002). Effective thickness was computed as the difference between the thickness of modified and unmodified surface. Three measurements were taken on each surface and repeated for at least two samples to obtain average values.

4.2.4.9 Immobilized EGF quantification

MicroBCA protein assay kit (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) was used to determine the EGF surface density by comparing the EGF concentration in the solution before and after immobilisation. The microBCA reaction mixture (50 mL) was added to protein solution (50 μL) in a 96-well plate. Absorbance was measured using a Victor v3^{TM} spectrophotometer (562 nm, Perkin-Elmer, Woodbridge, ON) after a 2 h incubation at 37°C. Bovine serum albumin was used as standard.

4.2.4.10 Stimulation of A-431 Cells

EGF is known to induce a rapid tyrosine phosphorylation of EGF receptor present at the A-431 cell surface (Hunter and Cooper 1981). To test physiological activity of immobilized EGF, five hours before experiment, A-431 cells were washed with DMEM medium without serum. Cells were then trypsinized for 5 min at 37°C, washed by centrifugation and resuspended in DMEM. A-431 cells were distributed in 24-well plates containing one glass surface at 0.3 x 10^6 cells/mL, 1 mL/well and kept at 37°C in a 5% CO_2 incubator. Five hours after inoculation, Ecoil-EGF was added at 4 nM in the wells corresponding to unmodified glass surfaces (control). This soluble Ecoil-EGF concentration was selected since we previously demonstrated that the EC_{50} related to the phosphorylation of A-431 cell surface EGFR by soluble untagged and Ecoil-tagged EGF was close to 4 nM (Boucher et al. 2008).

Adhesion assays. Medium was removed 5 h after inoculation and immobilized cells were washed 3 times with DMEM (serum-free). Cells were observed using inverted microscope Axiovert S100TV (Carl Zeiss Canada, North York, ON). Images were processed with a QICAM Fast 1394 camera (QImaging) and cell count was operated using Northern Eclipse image acquisition software (Empix imaging).

4.2.4.11 Phosphorylation Assays by Western Blot

DMEM medium was removed and A-431 cells were washed three times with PBS supplemented with sodium-orthovanadate (1mM, Sigma) and extracted with lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Thesit, 0.5% Na Deoxycholate, Complete™ protease

inhibitor cocktails (Roche, Laval, QC)) supplemented with 0.1 mM Na_3VO_4, 20 mM β-glycerophosphate, 10 mM $Na_4P_2O_7.10\ H_2O$ and 0.5 μM microcystin) 5 min, 2h, 3h and 4h after inoculation for wells corresponding to unmodified glass surfaces and 2h, 3h, 4h and 5h for wells corresponding to EGF-functionalized surfaces. Insoluble material was removed by centrifugation at 10,000 x *g* for 5 min at 4°C. Western blotting experiments were then performed as previously described (Boucher et al. 2008). Briefly, samples were mixed with 4X NuPAGE sample buffer (Invitrogen) containing 50 mM DTT and heated to 70°C for 10 min. Electrophoresis was performed at 200 volts and proteins transferred to nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell) for 1 h at 300 mA. Membrane were incubated in blocking reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), and then probed with phosphotyrosine (PY99) (Santacruz, CA) for 1 h. Detection was performed using BM Chemiluminescence Blotting Substrate (Roche Diagnostics) with a Kodak Digital Science Image Station 440cf equipped with Kodak Digital Science 1D image analysis software version 3.0 (Eastman Kodak, NY).

4.2.4.12 Statistical analysis

Values are given as mean value ± standard deviation. Statistical analysis was performed by independent two-sample t-test with equal variances. Value of $P<0.05$ and $P<0.001$ was considered to be statistically significant and are identified by * and **, respectively.

4.2.5 Results

4.2.5.1 Immobilization of EGF on surfaces

Silicon substrates with native oxide overlayer (Si/SiO_2), whose surface chemistry is comparable to that of glass, were used to optimize the grafting reactions since high optical contrast at the Si/SiO_2 interface improved the sensitivity of ellipsometric thickness and contact angle measurements. Once optimized on silicon wafers, the experimental conditions for the grafting reactions were then applied to commercially available amino-coated glass surfaces.

Our oriented EGF immobilization strategy consisted in end-grafting cysteine-tagged Kcoil peptides on APTES-coated surfaces using a LC-SPDP linker (Figure 4.1). Ecoil-EGF proteins were then captured to the Kcoil-modified surface via reversible coiled-coil interaction (Boucher et al. 2008).

The APTES, LC-SPDP, and Kcoil layers that were successively grafted on silicon surfaces were each characterized using ellipsometric and contact angle measurements as reported in Figure 4.2. APTES was self-assembled in solution under strict anhydrous conditions to avoid cross-polymerization of the ethoxysilane groups that might have lead to surface heterogeneities and multilayer formation. APTES-deposited layers were heated to promote condensation reactions with the surface and crosslinking of monolayer film. Grafted APTES layers appeared thin and homogeneous with an ellipsometric thickness of 0.9 ± 0.1 nm and a water contact angle of 50 ± 2° (Figure 4.2, condition a). The bifunctional LC-SPDP linker was then grafted onto the surface via a chemical reaction between its amine-reactive N-hydroxysuccinimide ester and the

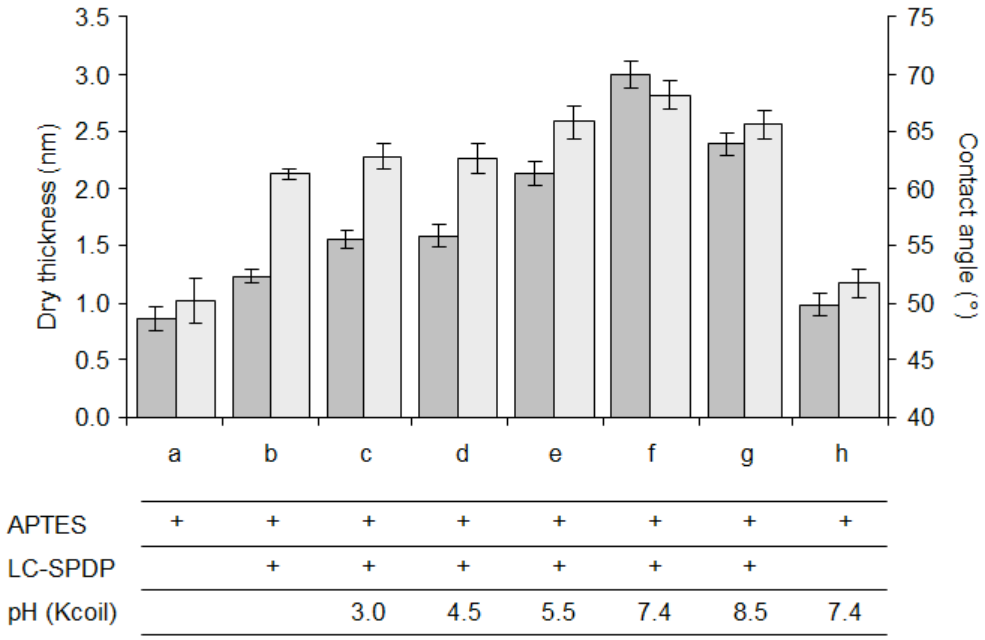

Figure 4.2 : Characterization of the (a) APTES, (b) LC-SPDP, and Cysteine-tagged Kcoil layers grafted on silicon surfaces.

The dark and the light grey bars correspond to dry thickness and contact angle measurements, respectively. The cysteine-tagged Kcoil peptides were reacted on LC-SPDP-coated surfaces at (c) pH 3.0, (d) pH 4.5, (e) pH 5.5, (f) pH 7.4, and (g) pH 8.5. As a comparison, the characterization of Kcoil incubation on APTES-coated surfaces (without LC-SPDP addition), at pH 7.4 is also presented (h). The reference was set as (0 nm, 0°) for a cleaned silicon surface. The successive grafting reactions were performed as described in the “Materials and Methods” section.

free amino groups of APTES to form a stable amide bond. The resulting films displayed a thickness of 1.2 ± 0.1 nm and a water contact angle of 61 ± 1° (Figure 4.2, condition b). The other extremity of the LC-SPDP linking agent was terminated in a pyridyl disulfide group that was reacted with thiol groups of cysteine-tagged Kcoil peptides to form a disulfide bond. In order to maximize the Kcoil grafting density, the influence of the pH of the reaction (from 3.0 to 8.5) was studied (Figure 4.2, conditions c to g). Maximal dry thickness and contact angle values were obtained for Kcoil peptides reacted at pH 7.4 (Figure 4.2). Of interest, when the same reaction was performed in the absence of LC-SPDP linker, a minor variation of the surface characteristics was observed when compared to the APTES layer (+ 0.1 nm and +1° for dry thickness and contact angle measurements, respectively, Figure 4.2, compare conditions a and h). This strongly suggested that non-specific adsorption of Kcoil peptides on the surface was negligible.

After Kcoil grafting, cysteine was used to block the unreacted pyridyl disulfide group of LC-SPDP in order to prevent the attachment of undesired molecules containing thiol groups. No significant changes in the thickness and the water contact angle were observed after cysteine-mediated LC-SPDP deactivation (Figure 4.2, compare conditions b and f with Figure 4.3, conditions e and a, respectively). Kcoil-functionalized surfaces were shown to be able to recruit Ecoil-EGF (Figure 4.3). The resulting film was characterized by a net thickness increase of 0.8 nm and a water contact angle of 61°. The reversibility of the E-K coiled-coil interaction was demonstrated by washing bound Ecoil-EGF with 5M guanidium hydrochloride. This lead to total thickness and contact angle measurements varying from 3.7 nm and 61° to 3.2 nm and 68°, respectively (Figure 4.3 conditions b and c). The high specificity of Ecoil-EGF binding to Kcoil surfaces was also demonstrated since Kcoil-EGF addition onto Kcoil-functionalized surfaces did

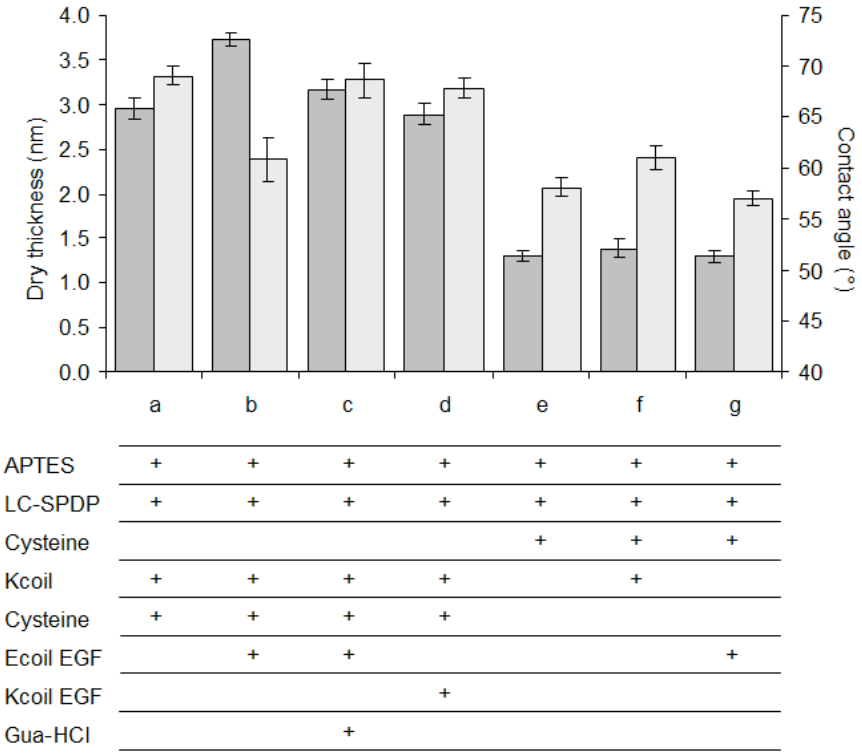

Figure 4.3 : Sequential grafting of Ecoil-EGF via coiled-coil interactions.

The dark and the light grey bars correspond to dry thickness and contact angle measurements, respectively. (a) APTES + LC-SPDP + Kcoil + Cysteine, pH 7.4, (b) Ecoil-EGF capture on (a), (c) Ecoil-EGF removal after capture (as in b) with guanidium hydrochloride (5M). In contrast to Ecoil-EGF, (d) Kcoil-EGF does not bind to Kcoil-functionalized surface (a). As negative controls, the deposition of (f) cysteine-tagged Kcoil peptides, and (g) Ecoil-EGF proteins on (e) LC-SPDP layers that had been blocked by cysteine are reported. The reference was set as (0 nm, 0°) for a cleaned silicon wafer surface. The successive grafting reactions were performed as described in the “Materials and Methods” section.

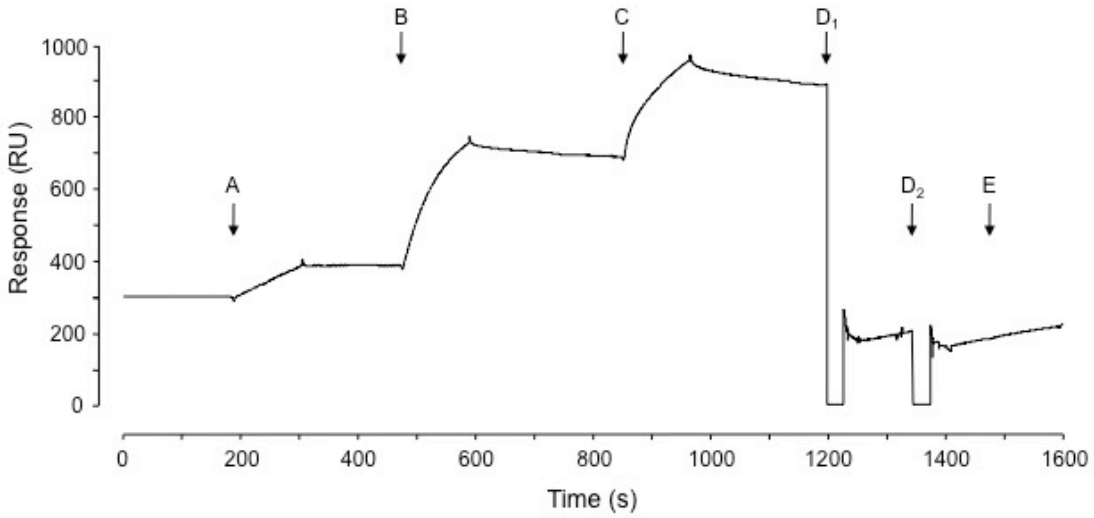

Figure 4.4 : Control-corrected sensograms corresponding to Ecoil-EGF capture via E/K coiled-coil interactions by SPR.

Kcoil peptides were immobilized on CM4 sensorchips using the same chemistry strategy (i.e. LC-SPDP as linkers) as for silicon wafers and glass surfaces. Ecoil-EGF was then injected three times at 10 nM (A), 100 nM (B) and 500 nM (C). After surface regeneration with 2 pulses of guanidium hydrochloride ($D_{1,2}$), 100 nM Kcoil-EGF were injected (E).

not lead to any thickness or contact angle variations (Figure 4.3, condition d). Finally, cysteine-tagged Kcoil or Ecoil-EGF were incubated on LC-SPDP layers previously blocked by cysteine molecules, as reported in Figure 4.3 (conditions f and g). In both cases, thickness and contact angle values were similar to those measured prior each incubation (Figure 4.3, condition e), once again demonstrating that non-specific adsorption was negligible.

The efficiency of the grafting procedure was also evaluated by using a Surface Plasmon Resonance instrument (Figure 4.4). In order to further demonstrate the adequacy of our chemical strategy, carboxymethylated dextran sensorchip surfaces (CM4) were first chemically modified to present amine groups at their surface (hence mimicking amine groups present on our glass surfaces). Cysteine-tagged Kcoil was covalently immobilized (950 arbitrary Resonance Units, RUs) on these surfaces using LC-SPDP linker. After Kcoil oriented covalent coupling, Ecoil-EGF was then injected three times (10 nM, 100 nM and 500 nM) on Kcoil-functionalized and mock (no immobilized Kcoil on amines) surfaces. This resulted in the net accumulation of 90, 420 and 870 RUs of proteins, respectively. As expected, SPR experiments also demonstrated that the Ecoil-EGF/Kcoil complexes were stable as almost no dissociation occurred during each buffer injection following each Ecoil-EGF injection. The kinetic profile corresponding to the first Ecoil-EGF injection was found comparable to that already observed when the Kcoil had been covalently coupled using standard thiol-coupling chemistry (Boucher et al. 2008). After Ecoil-EGF dissociation (promoted by injections of guanidium hydrochloride) no Kcoil-EGF binding was observed. This absence of interaction between Kcoil and Kcoil-EGF cannot be attributed to any damage to surface-bound Kcoil by guanidium hydrochloride since we already demonstrated that guanidium hydrochloride promoted E/K coiled-coil dissociation without affecting surface-

bound Kcoil capacity to subsequently recruit Ecoil-tagged proteins (Boucher et al. 2008). This once again confirmed the high specificity of the E/K coiled-coil interaction (Figure 4.4). Altogether, these results unambiguously demonstrated that Ecoil-EGF had been immobilized on APTES-coated surface via stable and specific E/K coiled-coil interactions.

In order to further validate our coiled-coil-based strategy and to compare its efficiency to that of random coupling procedures, EGF proteins were also immobilized on APTES-coated silicon surfaces using disuccinimide glutarate (DSG) as linker. This lead to thickness and contact angle measurements varying from 1.0 ± 0.1 nm and 30 ± 2° (after DSG treatment) to 3.0 ± 0.1 nm and 55 ± 2° (after EGF coupling).

4.2.5.2 Quantification of immobilized EGF

600 nM of Ecoil-EGF were incubated on a Kcoil-coated silicon wafer surface, resulting in the stable capture of 115 ± 8 pmol/cm^2 of Ecoil-EGF (surface density was quantified in a MicroBCA assay). This surface density is at least two times higher than what previously reported with other protocols for oriented EGF immobilization (Nakaji-Hirabayashi et al. 2007; Ogiwara et al. 2005). Combined to dry protein thickness measurements, we then estimated the variation of Ecoil-EGF surface density induced by varying Ecoil-EGF concentration during incubation (Figure 4.5). Assuming that the Ecoil-EGF/Kcoil interaction followed a Langmuirian isotherm, an apparent thermodynamic dissociation constant (K_D) of 13 nM was determined for the Ecoil-EGF/Kcoil interaction (Figure 4.5). In parallel, covalent coupling of untagged EGF was performed on APTES-coated silicon wafer surface using DSG as linker. This resulted in the covalent capture of 330 ± 87 pmol/cm^2 of untagged EGF.

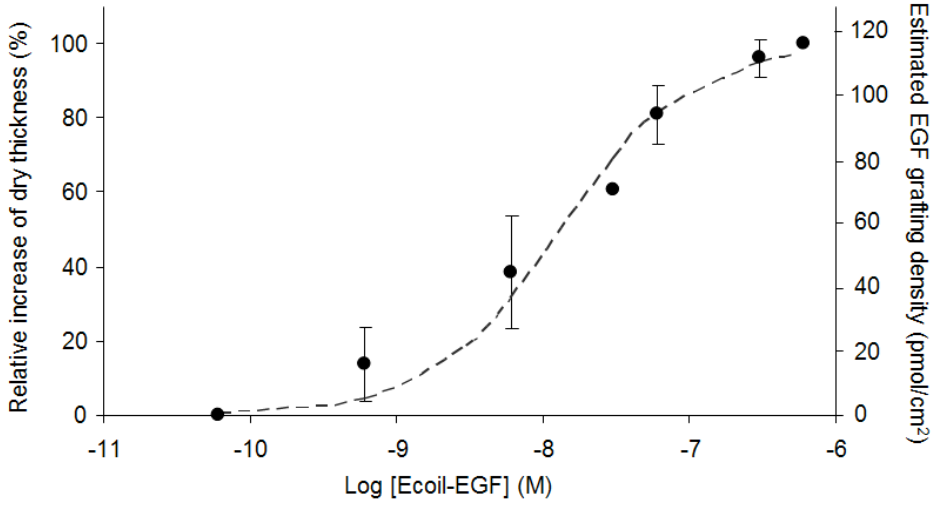

Figure 4.5 : Variation of captured Ecoil-EGF density with Ecoil-EGF concentration during incubation.

Various concentrations of Ecoil-EGF ranging from 0,6 to 600 nM were incubated on Kcoil-coated silicon wafer surfaces, as described in the "Materials and Methods" section, before dry thickness measurements. Surface density (pmol/cm^2) was deduced from the maximum Ecoil-EGF value determined using MicroBCA assay (see text for details). Each black dot corresponds to values obtained for 3 independent measurements while the dotted line corresponds to data fitting using a simple Langmuirian isotherm (K_D = 13 nM).

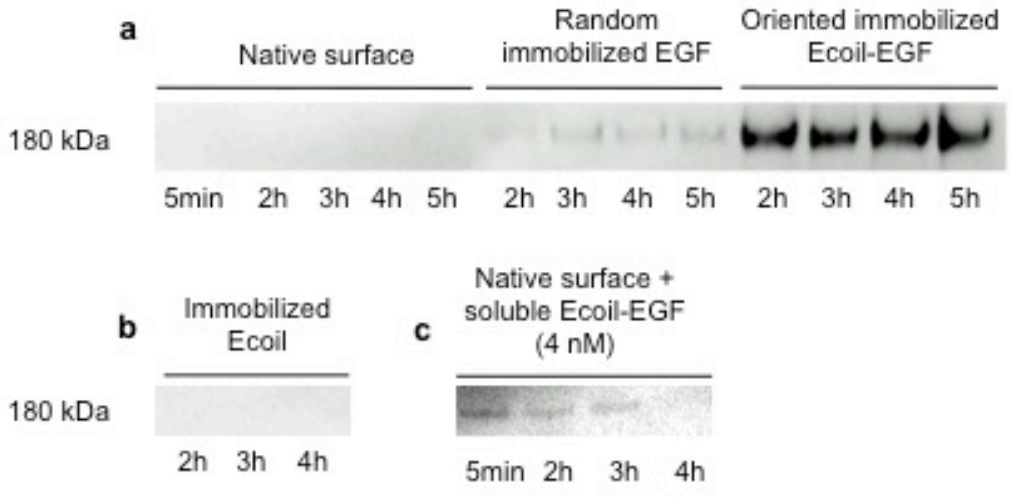

Figure 4.6 : Phosphorylation of A-431 cell surface EGF receptors.

The phosphorylation of EGF receptors on A-431 cells was monitored at different times by Western blot (A) on native surface, random immobilized EGF and oriented immobilized Ecoil-EGF (same membrane), (B) on immobilized Ecoil peptide and (C) on native surfaces with soluble Ecoil-EGF. The 180 kDa band immunoreactive to anti-pTyr antibody (corresponding to EGFR) was captured using a Kodak 440cf imager.

4.2.5.3 EGF receptor phosphorylation assays

EGF mediates its biological effects by binding to EGF receptors (EGFR). Ligand/receptor complex formation leads to cell surface receptor tyrosine autophosphorylation (Schlessinger 2002). Levels of EGFR phosphorylation were assayed for A-431 cells, at different times, by Western Blot analysis. Results corresponding to cells that had been grown on different Kcoil-coated surfaces or on native glass surfaces are presented in Figure 4.6. As expected, no phosphorylation of EGFR was observed for native surfaces or for Kcoil-functionalized surfaces to which Ecoil peptide had been captured (Figure 4.6). Of salient interest, we observed that Ecoil-EGF, when immobilized via coiled-coil interactions, induced a sustained phosphorylation of EGFR for at least 5h (Figure 4.6). This observation sharply contrasted with EGFR phosphorylation induced by soluble Ecoil-EGF (autophosphorylation was not detectable after 3 hours, Figure 4.6). The influence of EGF orientation, i.e. random versus coiled-coil-oriented, on EGFR phosphorylation was also demonstrated (Figure 4.6) since EGFR phosphorylation was more intense with coiled-coil oriented EGF compared to randomly coupled EGF.

4.2.5.4 In vitro adhesion assays

The effect of immobilized EGF on A-431 cell adhesion was also assayed. A-431 cells were incubated on native or Kcoil-coated surfaces (in the presence or absence of soluble EGF), on Ecoil peptides or Ecoil-EGF that had been tethered on Kcoil-coated surfaces and on covalently immobilized EGF surfaces (random immobilization; Figure 4.7). An increase of the

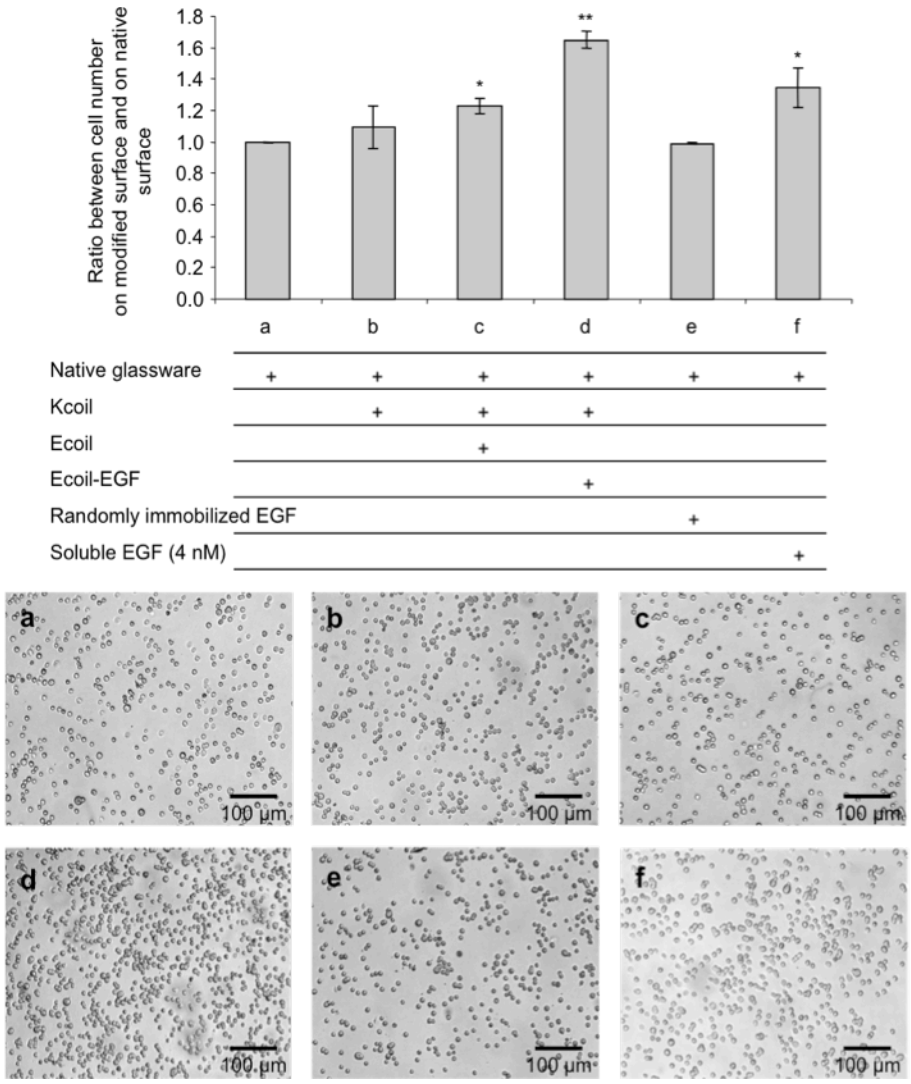

Figure 4.7 : Images of attached cells after 5 hours of incubation for adhesion assays.

A-431 cells were incubated during 5 hours on glass surfaces harbouring (a) native amino groups, or coated with (b) grafted Kcoil peptide layer, (c) Ecoil peptides bound to grafted Kcoil peptide layer, (d) Ecoil-EGF bound to grafted Kcoil peptide layer, (e) randomly immobilized EGF layer, and (f) native amino groups with an injection of soluble Ecoil-EGF (4 nM). Differences were significant for $p < 0.05$ (*) and $p < 0.001$ (**).

cell adhesion (+ ca 65%) was observed for coiled-coil immobilized Ecoil-EGF whereas a lower increase was observed in presence of soluble Ecoil-EGF (+ ca 35%). In contrast, no significant differences with negative control were observed for surfaces harboring randomly immobilized EGF (Figure 4.7). These results demonstrate that modified glass surfaces on which Ecoil-EGF had been immobilized via coiled-coil interactions promoted initial A-431 cell adhesion.

4.2.6 Discussion

The development of biocompatible surfaces to promote and sustain tissue regeneration presents a great interest for many biomedical applications, including the promotion of the wound healing processes around stent grafts after endovascular aneurysm repair (Lerouge et al. 2007) or the attachment of epithelial cells to polymeric corneal devices (Klenkler et al. 2005). Immobilization of specific proteins, such as growth factors, is now acknowledged to improve the potential of these engineered surfaces in stimulating the recruitment of cells, their adhesion and proliferation (Hadjizadeh et al. 2007; Ichinose et al. 2006; Nakaji-Hirabayashi et al. 2007; Ogiwara et al. 2005). In that context, we have developed a versatile and cell culture-compatible strategy for the oriented immobilization of proteins on surfaces harboring primary amine functionalities. Our experimental approach takes advantage of a *de novo*-designed heterodimerizing peptide system composed of the Ecoil and Kcoil pair. This grafting system has already been used as a tool for different biotechnology applications such as protein capture on biosensor surfaces (De Crescenzo et al. 2003b), controlled protein dimerization (De Crescenzo et al. 2004; Nakaji-Hirabayashi et al. 2009) or virus targeting (Le et al. 2009). For the first time, we here make the proof of concept that the E/K coiled-coil system can be used for protein capture,

aiming at enhancing material properties with the ultimate goal of developing tailored materials for tissue engineering and regenerative medicine applications.

In that effort, we first optimized Kcoil covalent and oriented immobilization on APTES-functionalized silicon wafers and characterized using dry thickness and water contact angle measurements. Low standard deviations in the measurements indicates that the successive grafted layers are homogeneous and that our protocols highly reproducible (Figure 4.2). Non-specific adsorption on Kcoil-functionalized surfaces was negligible (Figure 4.2 and 4.3). Therefore, as previously described (De Crescenzo et al. 2003a), the protein immobilization via E/K coiled-coil interactions is highly specific, mostly due to the importance of both ionic and hydrophobic interactions during E/K coiled-coil complex formation. Furthermore, additional SPR experiments on sensorchips mimicking the functionalities displayed on our surfaces, unambiguously demonstrates that covalently immobilized Kcoil is able to recruit Ecoil-EGF in a highly stable fashion (Figure 4.4), once again, in excellent agreement with previous studies in which we applied a different Kcoil coupling chemistry (Tripet et al. 2002; Tripet et al. 1996).

Our optimized grafting conditions were then successfully applied to glass surfaces for cell culture. The amount of immobilized EGF was quantified for surfaces supporting the highest EGF grafting density, i.e. 115 and 330 pmol/cm^2 for the coiled-coil oriented capture and non-oriented covalent immobilization, respectively. Dry thicknesses of EGF layers for the corresponding surfaces were of 0.7 and 2.0 nm as measured on silicon wafers (Figure 4.3), thus supporting that dry thickness is directly related to the amount of immobilized EGF (Liberelle and Giasson 2007). Ellipsometric measurements were performed on Kcoil-grafted silicon wafers in order to evaluate the influence of soluble Ecoil-EGF concentration upon EGF surface density during the grafting process (Figure 4.5). Our results underline that varying the concentration of added soluble Ecoil-

EGF allows for the controllable modulation of EGF density on Kcoil-derivatized surfaces. The apparent thermodynamic dissociation constant (K_D) between grafted Kcoil peptides and Ecoil-tagged EGF proteins was in the low nanomolar range, in good agreement with previously reported K_D (De Crescenzo et al. 2003b).

In order to evaluate the full potential of our grafting strategy, *in vitro* cellular assays were performed with A-431 cell line. Of interest, after 5 hours of incubation with A-431 cells, we noticed an increase of ca 10%, 20% and 65% for A-431 cell adhesion for surfaces derivatized with Kcoil alone, Kcoil/Ecoil complexes and Kcoil/Ecoil-EGF, respectively. In contrast, no increase in cell adhesion was observed for randomly grafted EGF (Figure 4.7), more likely due to the loss of EGF bioactivity that may have resulted from the random coupling procedure and the absence of linker, as already reported by Kuhl and colleagues (Kuhl and Griffith-Cima 1996). Altogether, our results suggest that our immobilization strategy *per se* has a positive effect on cell attachment, a desirable property in tissue engineering. Our results are also in excellent agreements with previous observations by Ogiwara et al. that cultivated 3T3 cells and A-431 cells on surfaces where *i)* bioactive EGF fused to the Fc region of an antibody (EGF-Fc) had been photo-immobilized (Ogiwara et al. 2005) and *ii)* EGF had been chemically immobilized via an engineered p-azido phenylalanine at its C-terminus, respectively (Ogiwara et al. 2006). More specifically, in both studies, cell adhesion was observed to moderately increase with soluble EGF supply (when compared to negative control) while immobilized EGF surfaces were shown to further increase cell adhesion in an integrin-independent fashion. Of interest, the authors noticed differences in A-431 cell phenotype whether EGF receptors were activated with soluble or tethered EGFs. Cells adhering to tethered EGF were characterized by filipodia structures whereas

cells exposed to soluble EGF displayed lamellipodia structures, hence suggesting that the signal transduction pathways activated in both cases were slightly different.

Cell exposure to immobilized EGF has been reported to sustain EGF-induced autophosphorylation of cell surface EGFR when compared to soluble EGF (Ito et al. 1997; Ogiwara et al. 2006). This effect has been attributed to ligand internalization impediment and/or to limited degradation of the EGF-EGFR complexes. Our results support these conclusions and further illustrate the advantage of oriented EGF capture. Indeed, a more intense EGFR autophosphorylation is observed with coiled-coil-captured EGF (oriented approach, 115 pmol/cm^2) when compared to that corresponding to EGF that has been covalently immobilized in a random fashion (330 pmol/cm^2) (Figure 4.6).

Altogether, our results demonstrate our coiled-coil based capture approach offers several advantages when compared to previously reported systems for oriented protein immobilization, in terms of protein bioactivity, surface density and grafting process. First, coil tags do not affect EGF bioactivity since soluble N- or C-terminally coil-tagged EGF were shown to be behave as EGF in various *in vitro* cell assays (Le et al. 2009; Nakaji-Hirabayashi et al. 2009). This sharply contrast with the negative effect of an Fc tag that totally abrogated EGF bioactivity when positioned at the N-terminus of EGF (Boucher et al. 2008). Second, we observed a maximal EGF surface density for tethered Ecoil-EGF of 115 pmol/cm^2 (Figure 4.5); this is at least two times higher than previously reported values for tagged EGF grafting, i.e. 16 pmol/cm^2 for immobilization via the Fc portion of immunoglobulin G and 52 pmol/cm^2 for immobilization via polyhistidine tags (Nakaji-Hirabayashi et al. 2007; Ogiwara et al. 2005). Oriented protein layers may thus be generated over a wider range of surface density with our coiled-coil-based strategy. Furthermore, the length of the coiled-coil motif, in combination with that of LC-SPDP provides

coiled-coil tethered EGF with enough mobility, a critical factor for optimal EGF signaling (Boucher et al. 2008; Kuhl and Griffith-Cima 1996). This is likely dictated by the 2:2 overall stoichiometry of the signaling-competent ligand/receptor complex (Nakaji-Hirabayashi et al. 2009; Ogiso et al. 2002).

At last, our coiled-coil-based approach is sequential and versatile: stable Kcoil layers can be produced several days before grafting with any Ecoil-tagged protein. As opposed to protein A or G, Kcoil-derivatized surfaces can be treated with strong acidic, basic or chaotropic solutions as Kcoil on its own is unstructured and can thus withstand these treatments (De Crescenzo et al. 2003a). Moreover, our proposed strategy is simple in its implementation and allows for the oriented immobilization of every coil-tagged protein on any aminated surface.

4.2.7 Conclusion

We here report a new approach for oriented immobilization of growth factors on aminated surfaces based on a coiled-coil interaction. This method relies on a sequential grafting process based on the covalent grafting of a homogeneous Kcoil peptide layer and on the subsequent capture of Ecoil-tagged proteins. The first step can be realized in dry and non-sterile environment several days before protein immobilization whereas the second step allows for a specific and stable immobilization of the Ecoil-tagged protein over a wide range of grafting density. Consequently, this easy and versatile approach could be applied to specifically tailor any type of biomaterials.

4.2.8 Acknowledgement

This work was supported by the Canada Research Chair on Protein-Enhanced Biomaterials (G.D.C.), the Canada Research Chair in Applied Metabolic Engineering (M.J.), by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (G.D.C., M.J.) and by GRSTB (post-doctoral fellowship to B.L.).

4.2.9 References

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 16(5):585-601.

Boucher C, St-Laurent G, Loignon M, Jolicoeur M, Crescenzo GD, Durocher Y. 2008. The Bioactivity and Receptor Affinity of Recombinant Tagged EGF Designed for Tissue Engineering Applications Is Defined by the Nature and Position of the Tags. Tissue engineering. Part A 14(12):2069-2077.

Chao H, Houston ME, Jr., Grothe S, Kay CM, O'Connor-McCourt M, Irvin RT, Hodges RS. 1996. Kinetic study on the formation of a de novo designed heterodimeric coiled-coil: use of surface plasmon resonance to monitor the association and dissociation of polypeptide chains. Biochemistry 35(37):12175-12185.

Chen G, Ito Y, Imanishi Y. 1997. Photo-immobilization of epidermal growth factor enhances its mitogenic effect by artificial juxtacrine signaling. Biochimica et Biophysica Acta 1358(2):200-208.

De Crescenzo G, Litowski JR, Hodges RS, O'Connor-McCourt MD. 2003a. Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. Biochemistry 42(6):1754-1763.

De Crescenzo G, Pham PL, Durocher Y, Chao H, O'Connor-McCourt MD. 2004. Enhancement of the antagonistic potency of transforming growth factor-beta receptor extracellular domains by coiled coil-induced homo- and heterodimerization. J Biol Chem 279(25):26013-26018.

De Crescenzo G, Pham PL, Durocher Y, O'Connor-McCourt MD. 2003b. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding to the extracellular domain of the type II TGF-beta receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding. Journal of Molecular Biology 328(5):1173-1183.

Elloumi I, Kobayashi R, Funabashi H, Mie M, Kobatake E. 2006. Construction of epidermal growth factor fusion protein with cell adhesive activity. Biomaterials 27(18):3451-58.

Fan VH, Tamama K, Au A, Littrell R, Richardson LB, Wright JW, Wells A, Griffith LG. 2007. Tethered epidermal growth factor provides a survival advantage to mesenchymal stem cells. Stem cells (Dayton, Ohio) 25(5):1241-51.

Hadjizadeh A, Doillon CJ, Vermette P. 2007. Bioactive polymer fibers to direct endothelial cell growth in a three-dimensional environment. Biomacromolecules 8(3):864-73.

Hunter T, Cooper JA. 1981. Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells. Cell 24(3):741-752.

Ichinose J, Morimatsu M, Yanagida T, Sako Y. 2006. Covalent immobilization of epidermal growth factor molecules for single-molecule imaging analysis of intracellular signaling. Biomaterials 27(18):3343-3350.

Ito Y, Li JS, Takahashi T, Imanishi Y, Okabayashi Y, Kido Y, Kasuga M. 1997. Enhancement of the mitogenic effect by artificial juxtacrine stimulation using immobilized EGF. Journal of biochemistry 121(3):514-20.

Klenkler BJ, Griffith M, Becerril C, West-Mays JA, Sheardown H. 2005. EGF-grafted PDMS surfaces in artificial cornea applications. Biomaterials 26(35):7286-96.

Kuhl PR, Griffith-Cima LG. 1996. Tethered epidermal growth factor as a paradigm for growth factor-induced stimulation from the solid phase. Nature Medicine 2(9):1022-1027.

Le PU, Lenferink AEG, Pinard M, Baardsnes J, Massie B, O'Connor-McCourt MD. 2009. Escherichia coli expression and refolding of E/K-coil-tagged EGF generates fully bioactive EGF for diverse applications. Protein expression and purification:in press.

Lerouge S, Major A, Girault-Lauriault PL, Raymond MA, Laplante P, Soulez G, Mwale F, Wertheimer MR, Hebert MJ. 2007. Nitrogen-rich coatings for promoting healing around stent-grafts after endovascular aneurysm repair. Biomaterials 28(6):1209-17.

Liberelle B, Banquy X, Giasson S. 2008. Stability of silanols and grafted alkylsilane monolayers on plasma-activated mica surfaces. Langmuir 24(7):3280-3288.

Liberelle B, Giasson S. 2007. Chemical end-grafting of homogeneous polystyrene monolayers on mica and silica surfaces. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids 23(18):9263-70.

Little L, Healy KE, Schaffer D. 2008. Engineering biomaterials for synthetic neural stem cell microenvironments. Chemical reviews 108(5):1787-96.

Merrett K, Griffith CM, Deslandes Y, Pleizier G, Dube MA, Sheardown H. 2003. Interactions of corneal cells with transforming growth factor beta 2-modified poly dimethyl siloxane surfaces. Journal of biomedical materials research. Part A 67(3):981-93.

Nakaji-Hirabayashi T, Kato K, Arima Y, Iwata H. 2007. Oriented immobilization of epidermal growth factor onto culture substrates for the selective expansion of neural stem cells. Biomaterials 28(24):3517-29.

Nakaji-Hirabayashi T, Kato K, Iwata H. 2009. Surface-anchoring of spontaneously dimerized epidermal growth factor for highly selective expansion of neural stem cells. Bioconjugate chemistry 20(1):102-10.

Nakajima M, Ishimuro T, Kato K, Ko IK, Hirata I, Arima Y, Iwata H. 2007. Combinatorial protein display for the cell-based screening of biomaterials that direct neural stem cell differentiation. Biomaterials 28(6):1048-60.

Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M and others. 2002. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. Cell 110(6):775-787.

Ogiwara K, Nagaoka M, Cho CS, Akaike T. 2005. Construction of a novel extracellular matrix using a new genetically engineered epidermal growth factor fused to IgG-Fc. Biotechnology Letters 27(20):1633-1637.

Ogiwara K, Nagaoka M, Cho CS, Akaike T. 2006. Effect of photo-immobilization of epidermal growth factor on the cellular behaviors. Biochemical and biophysical research communications 345(1):255-9.

Schlessinger J. 2002. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. Cell 110(6):669-672.

Stefonek TJ, Masters KS. 2007. Immobilized gradients of epidermal growth factor promote accelerated and directed keratinocyte migration. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 15(6):847-55.

Tripet B, De Crescenzo G, Grothe S, O'Connor-McCourt M, Hodges RS. 2002. Kinetic analysis of the interactions between troponin C and the C-terminal troponin I regulatory region and validation of a new peptide delivery/capture system used for surface plasmon resonance. Journal of Molecular Biology 323(2):345-362.

Tripet B, Yu L, Bautista DL, Wong WY, Irvin RT, Hodges RS. 1996. Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain off the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. Protein engineering 9(11):1029-42.

Vallieres K, Petitclerc E, Laroche G. 2007. Covalent grafting of fibronectin onto plasma-treated PTFE: influence of the conjugation strategy on fibronectin biological activity. Macromolecular bioscience 7(5):738-45.

Wettero J, Askendal A, Bengtsson T, Tengvall P. 2002. On the binding of complement to solid artificial surfaces in vitro. Biomaterials 23(4):981-991.

CHAPITRE 5 RÉPONSE DES CELLULES ÉPITHÉLIALES HUMAINES DE LA CORNÉE AU FACTEUR DE CROISSANCE DE L'ÉPIDERME IMMOBILISÉ VIA L'INTERACTION COILED-COIL

5.1 Présentation de l'article

Cette section reprend l'article intitulé "**Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor tethered via coiled-coil interactions"** qui a été soumis pour publication dans la revue *Biomaterials* en mars 2010.

Dans ce chapitre, nous proposons d'immobiliser de manière orientée le facteur de croissance de l'épiderme EGF via l'interaction coiled-coil sur un biomatériau, le polyéthylène téréphtalate (PET), et d'étudier les effets de cette immobilisation sur le comportement de cellules épithéliales humaines de la cornée (HCE-2). Dans un premier temps, le greffage du coil K sur du PET préalablement traité au plasma a été caractérisé par XPS. Les conséquences de l'immobilisation de EGF sur le comportement cellulaire ont ensuite été étudiées. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'immobilisation orientée du Ecoil-EGF promeut l'adhésion, la prolifération et l'étalement des HCE-2 comparativement à des approches basées sur l'adsorption de EGF ou sur l'addition de EGF en solution. Une étude sommaire de l'activation des voies de signalisation cellulaire a également démontré que la voie des MAP kinases (phosphorylation de Erk1/2) était favorisée.

5.2 Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor tethered via coiled-coil interactions

Cyril Boucher[1,3], Juan-Carlos Ruiz[2], Marc Thibault[1], Michael R. Wertheimer[2], Mario Jolicoeur[1], Yves Durocher[3] and Gregory De Crescenzo[1]

1. Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologie Biomédicales (GRSTB), Bio-P[2] Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (Qc), Canada H3C 3A7.
2. Department of Engineering Physics, Groupe de Recherche en Physique et Technologie des Couches Minces (GCM), École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (Qc), Canada H3C 3A7.
3. Animal Cell Technology Group, Bioprocess Sector, Biotechnology Research Institute, National Research Council Canada, Montréal (Qc), Canada H4P 2R2.

Corresponding Author :

Grégory De Crescenzo, PhD

Tel. : 001 514 340-4711 (#7428)

Fax : 001 514 340-2990

gregory.decrescenzo@polymtl.ca

5.2.1 Abstract

The development of new strategies for protein immobilization to control cell adhesion, growth and differentiation is of prime interest in the field of tissue engineering. Here we propose a versatile approach based on the interaction between two *de novo* designed peptides, E and K coils, for oriented immobilization of epidermal growth factor (EGF) on polyethylene terephthalate (PET) films. After amination of PET surfaces by ammonia plasma treatment, K coil peptides were covalently grafted in an oriented fashion using succinimidyl 6-[30-(2-pyridyldithio)-propionamido]hexanoate (LC-SPDP) linker, and the K coil-functionalized films were characterized by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Bioactivity of Ecoil-EGF captured on K coil-functionalized PET via coiled-coil interactions was confirmed by EGF receptor phosphorylation analysis following cell attachment to the surface. We also demonstrated cell biological effects where tethered EGF enhanced adhesion, spreading and proliferation of human corneal epithelial cells to a higher extent than with EGF that was physically adsorbed or present in solution. Tethered EGF effects were most likely linked to the prolonged activation of both mitogen-activated protein kinase and phosphoinositidine 3-kinase pathways. Taken together, our results indicate that coiled-coil-based oriented immobilization is a powerful method to specifically tailor biomaterial surfaces for specific tissue engineering applications.

5.2.2 Keywords

Surface modification; plasma; EGF; coiled-coil interactions; XPS; cell adhesion, proliferation, human corneal epithelial cells

5.2.3 Introduction

Eye diseases affecting the cornea are one of the major causes of blindness worldwide. Whether the underlying cause is trachoma or corneal ulceration, an eye that is blind from corneal scarring or vascularization usually remains blind throughout the individual's life (Whitcher et al. 2001). To resolve this issue, corneal transplantation is imperative, however due to the limited availability of potential donors, the development of artificial cornea has become a subject of intense investigation. Corneal devices should ideally support epithelialization over the entire anterior surface of the prosthetic device to provide a natural protection against bacterial infection (Klenkler et al. 2009). However, the generation of a layer of epithelial cells remains a persistent challenge. The absence of migration of epithelial cells over the material interface (Legeais and Renard 1998) can result in stromal tissue necrosis and eventual extrusion of the device from the eye (Klenkler et al. 2008). The development of new strategies allowing for both migration and proliferation of epithelial cells on implanted eye devices is thus highly desired (Chirila 2001).

In this context, epidermal growth factor (EGF) is a promising candidate to stimulate the formation of an epithelial layer. In mammals, EGF is synthesized as a membrane-spanning

precursor molecule that is proteolytically processed to become fully active. In its soluble active form, EGF is a 6-kDa protein that directly interacts with several cell surface receptors from the ErbB receptor tyrosine kinase family. EGF exerts its activity by promoting the formation of signaling-competent receptor homo- or hetero-dimers at the cell surface. EGF-mediated receptor dimerization triggers receptor cytoplasmic domain autophosphorylation, in turn leading to the activation of two major signaling pathways, i.e., the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the phosphoinositidine 3-kinase (PI3K) pathways. EGF has been demonstrated to be directly implicated in almost all fundamental cellular processes, including survival, proliferation, migration, differentiation and metabolism regulation, and in different cell lines. Interestingly, in the case of damaged corneal epithelium, EGF has been shown to be absolutely required to induce cell motility, a key component of the epithelial response for repair (Zieske et al. 2000).

Material surface properties (e.g., hydrophobicity, porosity, topography) are key factors to be controlled for optimal implant integration; in the context of a corneal device, material properties may be further enhanced by grafting appropriate growth factors such as EGF at its surface, as outlined by Klenkler and Sheardown (Klenkler and Sheardown 2004). Towards this end, covalent grafting of EGF on various supports such as glass (Kuhl and Griffith-Cima 1996) or polydimethylsiloxane (PDMS) (Huo et al. 2009; Klenkler et al. 2005) substrates through the use of PEG linkers have been reported with clear effects on cell growth, while adsorbed EGF showed no biological activity (Kuhl and Griffith-Cima 1996). Nonetheless, covalent grafting combined with the use of a PEG linker presents several caveats. Indeed, in a recent study, Klenkler and colleagues (Klenkler et al. 2008) reported that the formation of a confluent layer of corneal epithelial cells could not be achieved using an EGF-tethering strategy based on PEG, most likely because PEG limits the adsorption of adhesion molecules. Furthermore, covalent

coupling strategies that rely on the use of reactive amine groups present at the EGF N-terminus or on its lysine side-chain (at position 28 and 48 for human EGF) have been shown to negatively impact EGF bioactivity (Lee and Park 2002; O'Connor-McCourt et al. 1998; Ogiwara et al. 2005). Alternative strategies exploring other types of linkers while at the same time promoting the oriented immobilization of EGF, should therefore be examined.

In the current study, we have immobilized a chimeric protein (Ecoil-EGF) corresponding to human EGF fused at its N terminus to a *de novo* designed peptide, namely E coil, in order to promote EGF tethering in an oriented fashion through the interaction of the E coil peptide moiety with its interacting peptide partner, i.e., K coil peptide. The E/K peptides have been shown to form a stable heterodimeric complex in a highly specific fashion (De Crescenzo et al. 2003a). This coiled-coil heterodimerizing pair has been previously used in many applications such as virus retargeting (Zeng et al. 2008), protein purification and detection (Boucher et al. 2010; Tripet et al. 1996), or protein capture on glass (Boucher et al. 2009) and biosensor surfaces (De Crescenzo et al. 2004). In this work, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was used to characterize each step leading to the covalent grafting of K coil peptides on ammonia plasma-treated polyethylene terephthalate (PET) through the use of a small linker (LC-SPDP, Figure 5.1). Ecoil-EGF capture on K coil-derivatized PET surfaces was then achieved by simple incubation. Subsequent *in vitro* cellular assays demonstrated that oriented tethered EGF promoted human corneal epithelial adhesion, spreading and proliferation. Interestingly, immobilized EGF led to a prolonged phosphorylation of EGF receptor (EGFR) and to a prolonged activation of EGF-triggered signaling pathways, when compared to a supply of soluble EGF or to physically adsorbed EGF. Therefore, oriented immobilization of EGF via coiled-coil interactions shows great promise for the development of improved corneal implants.

5.2.4 Materials and Methods

5.2.4.1 Chemicals and Reagents

Cysteine (99+% purity) and sodium chloride (99.99% purity) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON). Succinimidyl 6-[30-(2-pyridyldithio)-propionamido]hexanoate (LC-SPDP, 95+% purity) was obtained from Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL). Cysteine-tagged K coil peptides were synthesized by the peptide facility at University of Colorado (Denver, CO). Untagged recombinant human EGF (carrier-free) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN).

5.2.4.2 Ammonia plasma treatment

Polyethylene terephthalate (PET) film samples (50 μm-thick DuPont Mylar®, DuPont Teijin Films, Hopewell, VA) were aminated with covalently-bound nitrogen (N) groups, preferably primary amines, C-NH_2, by exposing the films to ammonia (NH_3) plasma treatment, adapting the procedure described in (Girardeaux et al. 1996). Briefly, plasma treatments were carried out for 15 min in a cylindrical aluminium/steel vacuum chamber of approximately 20 cm in diameter and 20 cm in height. A turbo-molecular pump, backed by a two-stage rotary vane pump was used to evacuate the chamber to a base pressure of $< 10^{-4}$ Pa (7.5×10^{-5} mTorr), as measured by a Pirani gauge. A flow of anhydrous ammonia (99.99%, Air Liquide, Canada) was then fed into the chamber using an electronic flow meter/controller (Vacuum General Inc.), through a 'shower head' gas distributor (10 cm in diameter) at the top of the chamber. The

ammonia flow rate was kept constant at 20 standard cm^3/min (sccm). During plasma treatment, the operating pressure was set and maintained constant at 80 Pa (600 mTorr) by a 'butterfly' throttle valve combined with a capacitive pressure gauge (Baratron, MKS Instruments). The capacitively coupled radiofrequency (r.f., 13.56 MHz) plasma was generated with the help of a power supply (ENI) and an automatic impedance matching network (Advanced Energy), connected to a 10-cm diameter powered electrode / sample holder in the center of the chamber, the walls acting as the grounded electrode. The distance between the bottom of the shower head (see above) and the r.f.-driven electrode was 15 cm. The power fed to the plasma was 10 W, resulting in a negative d.c. bias voltage at the powered electrode, V_B= -40 V.

5.2.4.3 Grafting Procedures

K coil peptides grafting on aminated PET. K coil peptides were immobilized on aminated PET surfaces by adapting the experimental protocol described in (Boucher et al. 2009). Aminated PET samples (1.13 cm^2) were first covered with a 2-mM LC-SPDP solution (100 μL) for 2 h at room temperature, to allow for LC-SPDP amine-reactive N-hydroxysuccinimide ester covalent binding to free $-NH_2$ groups on the aminated PET surfaces (Figure 5.1). The surfaces were then extensively rinsed with MilliQ water and incubated with cysteine-tagged K coil peptides (10 mM, 100 μL) for 2 h at room temperature, in order to form a covalent disulfide bond between the pyridyl disulfide group of LC-SPDP and the thiol group of cysteine-tagged K coil peptide. After rinsing in MilliQ water, blockade of unreacted LC-SPDP pyridyl disulfide groups was achieved with 50 mM cysteine solution (1M NaCl in 0.1 M sodium acetate, pH 4.0) for 45 min (100 μL).

Each surface was finally rinsed by extensive soaking in 10 mM phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) and MilliQ water.

Ecoil-EGF grafting. K coil-functionalized PET samples were used untreated or after preincubation in a 1% (w/v) human serum albumin (HSA) solution (Sigma-Aldrich) for 1 h. Ecoil-EGF was then captured by simple incubation (600 nM, 100 μL) for 1 h at room temperature. The surfaces were then thoroughly rinsed by soaking in 10 mM PBS and MilliQ water for 5 min.

Direct adsorption of EGF. For the sake of comparison, untagged EGF (600 nM in PBS) was also directly adsorbed onto several aminated PET surfaces (1 h incubation at room temperature). The surfaces were then rinsed in 10 mM PBS (pH 7.4) and MilliQ water for 5 min.

5.2.4.4 X-ray photoelectron spectroscopy

Modified PET surfaces (including those corresponding to each step of our functionalization protocol) were characterized with regard to their elemental chemical compositions (in atomic %) and chemical bond types, by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analyses (survey-, as well as C, N and O high-resolution spectra, respectively), performed in a VG ESCALAB 3MkII instrument, using non-monochromatic Mg Ka radiation (12 kV, 18mA). None of the samples exhibited any evidence of X-ray induced damage during those room-temperature XPS measurements. XPS spectra were acquired at 0° emission angle, normal to the sample surface, and possible charging was corrected by referencing all peaks to the carbon (C1s) peak at binding energy, BE = 284.7 eV, in accordance with the literature (Beamson and Briggs 1992; Girardeaux et al. 1996). Quantification of the constituent elements was performed

using broad-scan spectra and Avantage v4.12 software (Thermo Electron Corp., Waltham, MA) by integrating the areas under relevant peaks after a Shirley-type background subtraction, and using sensitivity factors from the Wagner table. C1s, N1s and O1s spectra were deconvoluted by using Full Width at Half Maximum (FWHM) factors of 1.6, 1.7, and 1.8, respectively. Deconvoluted C1s peak positions (C-C, C-O, and C=O) of chemical bonds in pristine PET were kept constant for each subsequent analysis, in order to identify any new functional groups added after surface modification. Ammonia (NH_3) plasma-treated surfaces corresponding to LC-SPDP addition only, as well as to LC-SPDP addition followed by K coil grafting, were extensively washed (2 mL milli-Q water, 5 times in addition to previous washes) to remove any possible traces of unreacted chemical that could affect XPS measurements.

Derivatization with TFBA. The surface-near concentrations of primary amine groups, [-NH_2], created by NH_3 plasma treatments, were determined by the method of Favia *et al.* (Favia et al. 1996), using the highly-selective derivatization reaction of 4-(trifluoromethyl) benzaldehyde (TFBA, 98%, Aldrich) vapor with $-NH_2$ groups. By way of this reaction TFBA is covalently linked via imine bonds, following which [$-NH_2$] values can readily be deduced from the fluorine concentrations, [F], determined by XPS. To account for carbon atoms being added to the surface as a result of the derivatization reaction, we used correction formulas presented in (Truica-Marasescu and Wertheimer 2008). The reaction was carried out in a small glass desiccator vessel into which a tiny amount of TFBA liquid was dripped onto a ~1 cm deep layer of 2 mm diameter glass beads. The plasma-treated PET was placed on a microscope glass slide on the layer of glass beads, whereby direct contact between the modified sample surface and liquid TFBA could be avoided. The desiccator was then placed in an oven at 45°C for 3 h, which we determined to be

the minimum reaction time needed to convert all near-surface amine groups, in accordance with previously reported experiments (Truica-Marasescu and Wertheimer 2008).

Solubility tests. Possible decreases in nitrogen- and $–NH_2$ concentrations, [N] and [NH_2], of plasma-treated PET films after their immersion in PBS buffer solution were investigated by XPS with and without chemical derivatization with TFBA. The samples were covered with ca. 100 mL of PBS for 2 h, then washed 5 times with milli-Q water, and then dried before derivatization and XPS measurements.

5.2.4.5 Quantification of grafted EGF

Quantification of grafted EFG was performed with the ELISA human EGF kit (DuoSet® development system, R&D Systems). The surface density of EGF was determined by comparing its concentration in solution before and after immobilisation (n=4). According to the manufacturer's protocol, absorbance of Streptavidin-HRP was measured using a Victor v3^{TM} spectrophotometer (450 nm, Perkin-Elmer, Woodbridge, ON) after a 10-min incubation at room temperature. EGF concentrations were determined using a standard calibration curve prepared with serial dilutions of human recombinant EGF or Ecoil-EGF as standards.

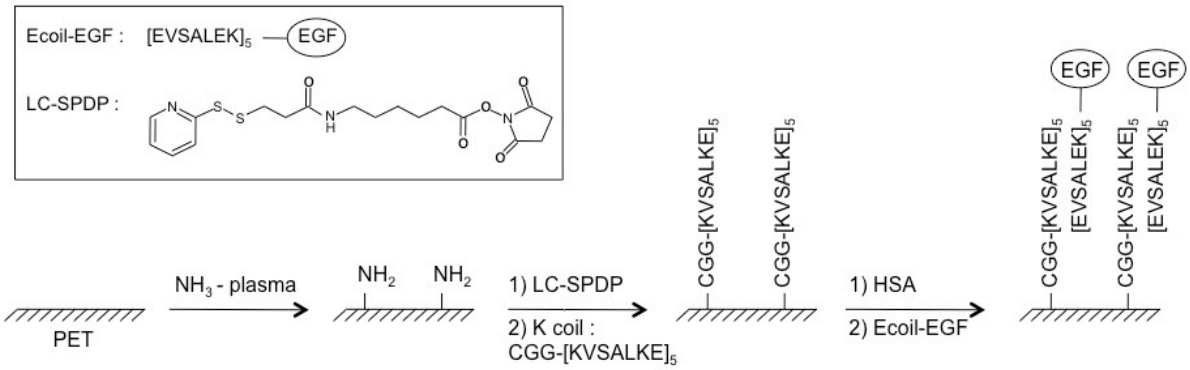

Figure 5.1 : Schematic diagram of the chemical grafting procedure used for coiled-coil mediated EGF tethering.

After amination of PET by NH_3 plasma treatment, cysteine-tagged K coil peptide was covalently bound to PET via LC-SPDP linker. Human serum albumin (HSA) treatment was then performed to prevent non-specific adsorption of EGF during subsequent steps. Ecoil-EGF was immobilized onto K coil-functionalized PET surfaces via coiled-coil interactions.

5.2.4.6 Cell culture

A-431 cells and human corneal epithelial cells (HCE-2) were maintained in 175 cm^2 flasks at 37°C with 5% CO_2 in Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO/BRL, Burlington, ON) supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (Invitrogen, Burlington, ON) or keratinocyte-serum free medium (KSFM) supplemented with 0.05 mg/ml bovine pituitary extract (BPE), 5 ng/ml epidermal growth factor (EGF) (Invitrogen), 500 ng/ml hydrocortisone and 0.005 mg/ml insulin (Sigma-Aldrich), respectively, until 85-90% confluence was reached. Prior to the inoculation of HCE-2 cells, culture vessels were pre-coated with a mixture of 0.01 mg/ml fibronectin (BD Biosciences, Bedford, MA), 0.03 mg/ml bovine collagen type I (BD Biosciences) and 0.01 mg/ml bovine serum albumin (Sigma-Aldrich).

5.2.4.7 Production of Ecoil-EGF

Ecoil-EGF was produced in HEK 293-6E cells and purified by immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) as previously described (Boucher et al. 2008). Protein concentration was determined by the Bradford method and analyzed by SDS-PAGE. Purified Ecoil-EGF was then stored at -80°C until use.

5.2.4.8 Cellular assays

A-431 inoculation. A-431 cells were washed with PBS and incubated overnight in DMEM medium without serum. Cells were then trypsinized for 5 min at 37°C, washed by

centrifugation and re-suspended in DMEM without serum. A-431 cells were distributed at 0.3 x 10^6 cells/mL, 1 mL/well, in 24-well plates containing PET surfaces on which EGF had been coiled-coil captured (with or without HSA pre-treatment) or adsorbed.

HCE-2 inoculation. HCE-2 cells were washed with PBS and incubated overnight in KSFM without supplemental EGF and bovine pituitary extract. Cells were then trypsinized for 5 min at 37°C, washed by centrifugation and re-suspended in serum-free medium complemented with hydrocortisone. HCE-2 cells were distributed at 0.3 x 10^6 cells/mL for adhesion and at 0.05 x 10^6 cells/mL for proliferation assays (1 mL/well) in 24-well plates containing native PET, K coil-functionalized PET, EGF-functionalized surfaces as well as unmodified surfaces. In the latter case, cell culture medium was supplemented with soluble EGF.

Adhesion and proliferation assays. KSFM was removed 2 h after HCE-2 cell inoculation for adhesion assays and 4, 24, 48, 72, 96 and 120 h after HCE-2 cell inoculation for proliferation assays. KSFM medium was changed at 24 h and 96 h for fresh medium complemented with bovine pituitary extract. To test the impact of soluble EGF addition on cell proliferation, EGF (4 nM) was initially added to the medium; the subsequent EGF repletion, when changing the medium, was assayed for one condition, or not for another. Immobilized cells were washed 3 times with KSFM. Cells were observed with an inverted microscope (Axiovert S100TV, Carl Zeiss Canada, North York, ON). Images were processed with a QICAM Fast 1394 camera (QImaging) and cell count was operated manually or using Northern Eclipse image acquisition software (Empix imaging).

Cell lysis. DMEM or KSFM was removed 5 min, 2 h, 3 h, 4 h and 5 h after inoculation and A-431 or HCE-2 cells were washed three times with PBS supplemented with sodium-orthovanadate (1mM, Sigma-Aldrich) and extracted with lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.4,

150 mM NaCl, 1% Thesit, 0.5% Na Deoxycholate, Complete™ protease inhibitor cocktail (Roche, Laval, QC)) supplemented with 0.1 mM Na_3VO_4, 20 mM β-glycerophosphate, 10 mM $Na_4P_2O_7.10\ H_2O$ and 0.5 μM microcystin). Insoluble material was removed by centrifugation at 10,000 x *g* for 5 min at 4°C. Protein phosphorylation was then analysed by Western blotting.

5.2.4.9 Western blot analysis

Western blotting experiments were then performed as previously described (Boucher et al. 2008). Briefly, samples were mixed with 4X NuPAGE sample buffer (Invitrogen) containing 50 mM DTT and heated to 70°C for 10 min. Electrophoresis was performed at 200 V and proteins transferred to nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell) for 1 h at 300 mA. Membranes were incubated in blocking reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), and then probed with various antibodies (anti-phosphotyrosine (PY99, Santacruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-phospho-Erk1/2 or anti-Erk2 (Santacruz Biotechnology), anti-phospho-Akt or anti-Akt (New England Biolabs Ltd., Pickering, ON), anti-β-Tubulin (Sigma-Aldrich)) for 1h. Detection was performed using BM Chemiluminescence Blotting Substrate (Roche Diagnostics) with a Kodak Digital Science Image Station 440cf equipped with Kodak Digital Science 1D image analysis software version 3.0 (Eastman Kodak, NY).

5.2.4.10 Immunochemistry and Confocal Microscopy

As previously described in the HCE-2 inoculation section, cells were distributed at 0.3 x 10^6 cells/mL, 1 mL/well, in 24-well plates containing native PET, unmodified surfaces supplemented with untagged EGF, K coil-functionalized surfaces on which untagged EGF had been physically adsorbed and K coil-functionalized surfaces that had been blocked with HSA on which Ecoil-EGF had been immobilized via coiled-coil-mediated interactions. 24h after inoculation, HCE-2 cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized in 0.4% Triton X-100 solution (Sigma–Aldrich) for 10 min and blocked in a 1% w/v bovine serum albumin (BSA)/PBS solution for 1 h. All samples were stained for actin with phalloidin-alexa 488 (1/40, Invitrogen) in 1% w/v BSA in PBS. Samples were mounted in 16.7% (w/v) mowiol 4-88 (Fluka), 33.3% (v/v) glycerol, 0.75% (w/v) n-propyl gallat in PBS. Confocal microscopy was performed using an Olympus Fluoview 1000 (Tokyo, Japan) equipped with a 1.4NA 40X objective. Alexa 488-labeled actin was excited with a 488 nm laser and visualized using a 520-500 nm emission filter.

5.2.4.11 Statistical analysis

Values are given as mean value ± standard deviation. Statistical analysis was performed by independent two-sample t-test with equal variances. Values of $P<0.05$ and $P<0.001$ were considered to be statistically significant and are identified by * and **, respectively.

5.2.5 Results

5.2.5.1 Covalent grafting of K coil on aminated PET surfaces - XPS and TFBA characterization

The immobilization of K coil peptide on PET surfaces was conducted as a multistep process as schematically described in Figure 5.1. First, amine functionalization of PET films was performed by ammonia plasma treatment at room temperature. Amine-functionalized PET surfaces (hereafter designated "PET-NH_2") were then treated with hetero-bifunctional LC-SPDP linker, to subsequently graft cysteine-tagged K coil peptide in a covalent fashion via its unique thiol group present on its N-terminal residue. In order to validate each step of our experimental grafting protocol, the elemental chemical compositions of functionalized PET resulting from the different treatments (XPS survey-spectral measurement) as well as the corresponding high resolution XPS compositions of C1s, O1s and N1s were obtained (Table 5.1, Figure 5.2).

In the case of untreated PET, XPS survey spectra revealed atomic percentages of C and O equal to 70.5% and 29.5%, respectively (Table 5.1). Furthermore, binding energies (BE) for each of the possible functional groups (compositions in percentages given between brackets) were determined from high-resolution XPS experiments: C1s peaks located at 284.7, 286.2 and 288.7 eV representing C-C and C=C (59%), C-O (22%) and C=O (19%), respectively; O1s peaks located at 531.7 and 533.3 eV representing O-C=O (47%) and C-O (53%).

Grafting of primary amines on PET film via plasma treatment was unambiguously confirmed, since PET-NH_2 samples were characterized by the appearance of 13.7 atomic % N (Table 5.1), of which primary amine groups accounted for 30.5%, as determined by chemical

derivatization with TFBA (Table 5.1). This [-NH_2] value was consistent with the deconvolution spectrum analysis of N1s (Figure 5.2). That is, the peak corresponding to BE= 398.3 eV most likely represented C-NH_2 bonding (30.7%), while the other peaks corresponding to BE= 399.2 and 399.9 eV could be attributed to C=N / C≡N (54.3%) and N-C=O (15%), respectively. Altogether, XPS analysis and chemical derivatization with TFBA indicated that 4.2 at. % of primary amine groups had been generated on PET film surfaces via the NH_3 plasma treatment. For PET-NH_2, deconvolutions of C1s and O1s high-resolution XPS spectra were also obtained (Figure 5.2). A close inspection of the deconvoluted C1s spectrum revealed that plasma treatment resulted in the appearance of two new peaks when compared to untreated PET (peaks D and E, Figure 5.2) characterized by BE= 285.6 eV (C-NH_2, 2.7%) and 287.1 eV (N-C=O, C=N, C≡N, 5.9%). For O1s, deconvolution revealed that plasma treatment led to the appearance of a new peak corresponding to BE= 530.2 eV (N-C=O, 6.3% ; Figure 5.2).

PET-NH_2 stability in PBS was then assayed. The [N] value was found to decrease from 13.7 to 1.9 % following a 2-hour incubation in PBS, resulting in a final primary amine concentration [-NH_2] of 1.3 at. %, again as determined by derivatization with TFBA. Altogether, our experimental results were in excellent agreement with those related the chemical composition and high resolution studies that had been previously reported in the literature (Girardeaux et al. 1996), thus validating our XPS experimental protocols for subsequent analysis.

Table 5.1 : Elemental composition for: PET; PET aminated via plasma treatment; aminated PET that had been incubated for 2 h in PBS; aminated PET on which LC-SPDP had been grafted; and on which K coil had been grafted via LC-SPDP. $[NH_2]/[N]$ ratios (deduced from TFBA derivatization assays) are also listed (last column).

	Survey				**$[NH_2]/[N]$ (%)**
	C1s (at. %)	**O1s (at. %)**	**N1s (at. %)**	**S2p (at. %)**	**deduced from TFBA assay**
PET	**70.5**	**29.5**	N/A	N/A	N/A
PET-NH_2 (plasma)	**63.0 (±0.2)**	**23.3 (±0.2)**	**13.7 (±0.3)**	N/A	**30.5 (±0.4)**
PET-NH_2 (plasma then 2h in PBS)	**70.1 (±0.6)**	**28.0 (±0.7)**	**1.9 (±0.2)**	N/A	**69.5**
PET-NH_2 + LC-SPDP	**68.7 (±0.5)**	**29.0 (±0.4)**	**2.0 (±0.1)**	**0.2 (±0.1)**	N/A
PET-NH_2 + LC-SPDP + K coil	**67.7 (±0.1)**	**27.9 (±0.1)**	**3.9 (±0.1)**	**0.4 (±0.1)**	N/A

PET-NH_2 surfaces, following LC-SPDP treatment, were characterized by the appearance of S (0.2 at. %) in their elemental composition (Table 5.1), strongly suggesting successful grafting, which was further supported by high-resolution XPS analyses. Indeed, LC-SPDP-mediated modification correlated with i) a variation of the peak intensity at BE= 399.1 eV in the high-resolution N1s spectrum (C-N and aromatic C-N; Figure 5.2), ii) an increase of the C-N, C-S signal at 285.2 eV in the high-resolution C1s spectrum, and iii) an increase of the N-C=O signal at a BE= 531.6 eV in the high-resolution O1s spectrum (Figure 5.2).

After a 2-h incubation with K coil peptide, the overall [N] value was doubled (from 2.0 to 3.9 at. %, see Table 5.1), while analysis by high-resolution XPS indicated an increase of i) N-C=O bonds at a BE= 531.6 eV, ii) N-C=O and C-N-O at 286.8 eV and iii) N-C=O and C-N at 399.5 eV, from O1s, C1s and N1s spectral deconvolutions, respectively (Figure 5.2). These results are consistent with the fact that K coils are nitrogen-rich peptides (one amide function per peptide bond, in addition to the primary amine on each lysine residue side-chain). Altogether, these results convincingly suggested that K coil peptide had been covalently attached to aminated-PET via LC-SPDP linker, in accord with the chemical route described in Figure 5.1.

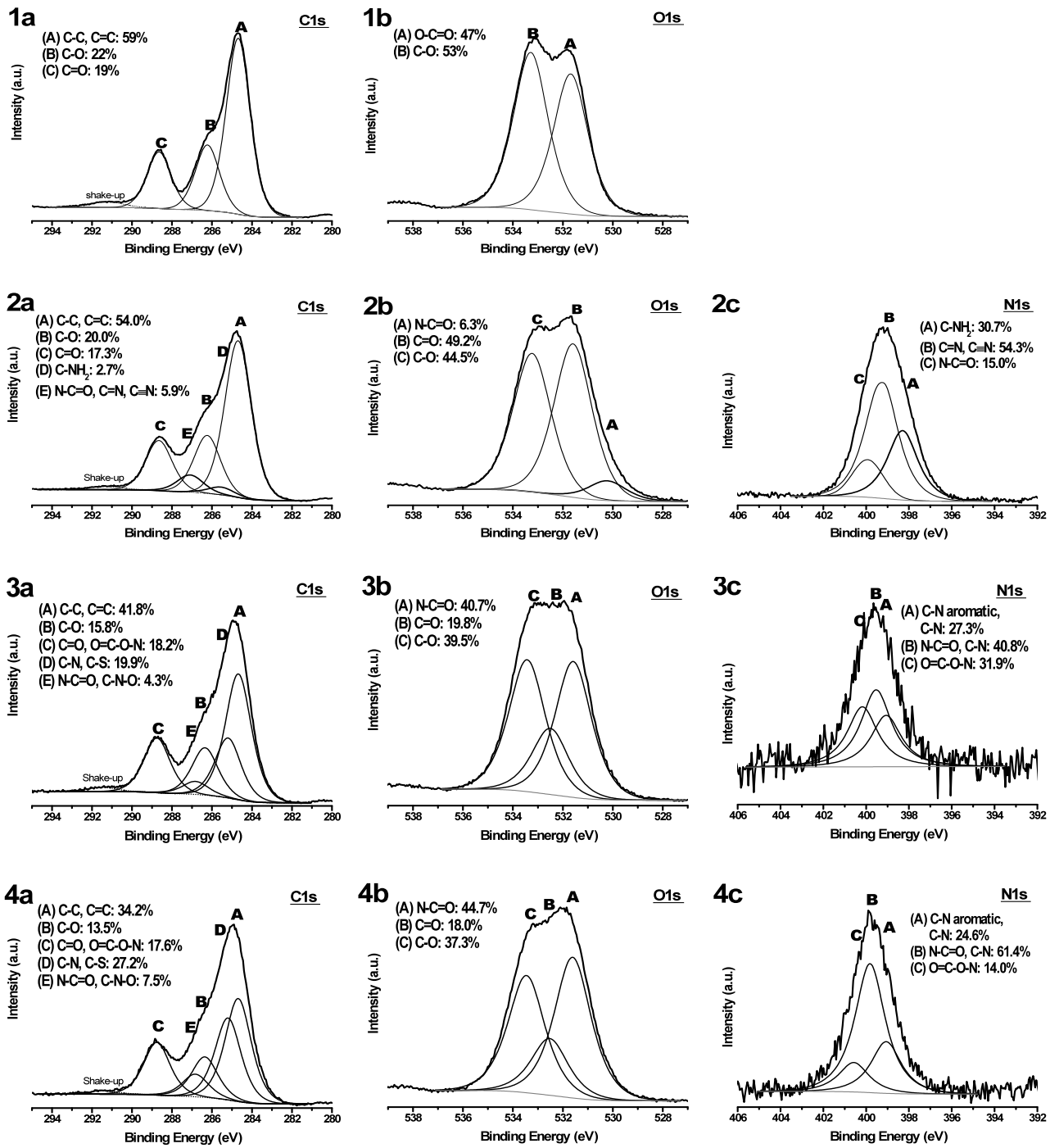

Figure 5.2 : C1s (a), O1s (b) and N1s (c) spectral analyses of native PET (1), PET following plasma treatment (2), LC-SPDP covalent grafting (3), and final K coil covalent grafting (4). Assignments of possible chemical bonds and relative compositions in atomic percentages are indicated in each panel.

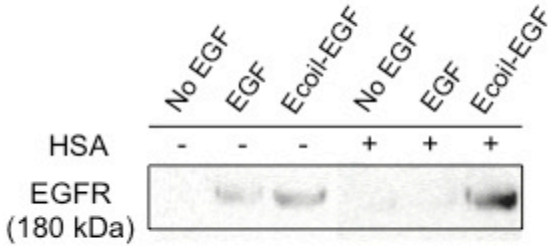

Figure 5.3 : HSA pre-treatment on K coil-functionalized PET surfaces prevents non-specific adsorption of EGF.

A-431 cells were seeded on K coil-functionalized PET on which untagged EGF and Ecoil-EGF had been previously incubated for 1 h at 600 nM. Prior EGF incubation, the surfaces were treated for 1 h with HSA (right lanes). The phosphorylation of A-431 cell EGF receptors was monitored by Western blotting 2 h after A-431 seeding. The 180 kDa band immunoreactive to anti-pTyr antibody (corresponding to EGF receptor) was captured using a Kodak 440cf imager.

5.2.5.2 EGF display on K coil-derivatized PET surfaces - specificity of coiled-coil mediated EGF immobilization

In our previous study (Boucher et al. 2008), coiled-coil mediated capture of Ecoil-EGF onto K coil-derivatized glass surfaces was demonstrated to be highly specific, most likely due to the generation of an optimal surface coverage with grafted K coil peptides. In order to judge whether such was the case for our K coil-functionalized PET surfaces, the following experiments were then performed: K coil-functionalized PET surfaces were first placed in contact with either fully bioactive Ecoil-EGF or untagged EGF (control), to promote EGF capture via coiled-coil interactions and to test to which extent the latter interaction was specific, respectively. After thorough rinsing to eliminate any excess EGF, A-431 cells which are known to over-express high amounts of EGF receptor at their surface (Hunter and Cooper 1981), were inoculated onto the various PET surfaces. Levels of EGFR phosphorylation were then assayed by Western blot analysis, as described in the materials and methods section. The same experiment was also performed by adding a one-hour human serum albumin (HSA) incubation step prior to addition of coil-tagged or untagged EGF. As can been seen in Figure 5.3, in the absence of HSA pretreatment, EGFR phosphorylation levels were observed to be of equal intensity for both E coil-tagged and untagged EGF (see lanes 1-3), indicating that EGF binding to K coil-functionalized PET occurred, to some extent, in a non-specific manner. Interestingly, HSA pretreatment resulted in the total abrogation of EGFR phosphorylation on surfaces where untagged EGF had been incubated (Figure 5.3, lane 4), whereas a strong increase in EGFR phosphorylation was observed with HSA pretreated surfaces that had been incubated with Ecoil-EGF (Figure 5.3, lane 6). These findings thus indicated that HSA treatment did not block the oriented immobilization of Ecoil-EGF via coiled-coil interactions, while efficiently abrogating its

non-specific adsorption onto K coil-functionalized PET. EGF surface density was then determined by ELISA assays as described in the materials and methods section. Incubation of 600 nM of Ecoil-EGF following HSA pretreatment resulted in the capture of 46.9 ± 9.5 pmol/cm^2 of Ecoil-EGF whereas the same concentration of untagged EGF onto unblocked K coil-functionalized PET resulted in the non-specific adsorption of 253.5 ± 38.7 pmol/cm^2.

5.2.5.3 Sensitivity of HCE-2 cells to soluble untagged EGF - dose-response assay

In order to better characterize HCE-2 cell response upon soluble EGF supply, and thus determine which concentration of soluble EGF to be used as control for adhesion and proliferation assays, increasing concentrations of soluble EGF were added to HCE-2 cells. Cells were lysed 5 min after EGF addition and EGFR phosphorylation was quantified by Western blotting (Figure 5.4). Maximal phosphorylation of EGFR was observed for concentrations higher than 3 nM. A 4 nM concentration was thus chosen for soluble EGF supply in the subsequent cellular assays with HCE-2 cells.

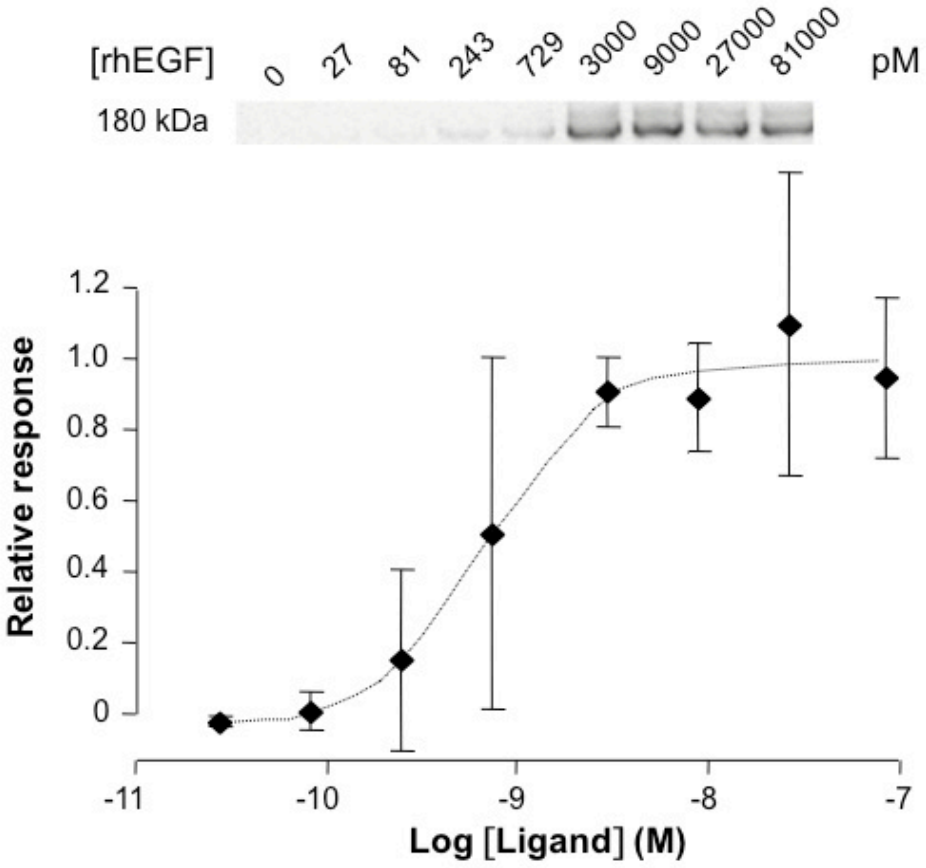

Figure 5.4 : Dose-response curve of HCE-2 cell EGF receptor phosphorylation by EGF. HCE-2 cells were treated with increasing concentrations of untagged EGF ranging from 0 to 81 nM for 5 min. Cells were then lysed and autophosphorylation of EGF receptor was monitored by Western blotting using a chemiluminescent substrate. The 180 kDa band immunoreactive to anti-pTyr antibody (corresponding to EGFR) was quantified using a Kodak 440cf imager (n=4).

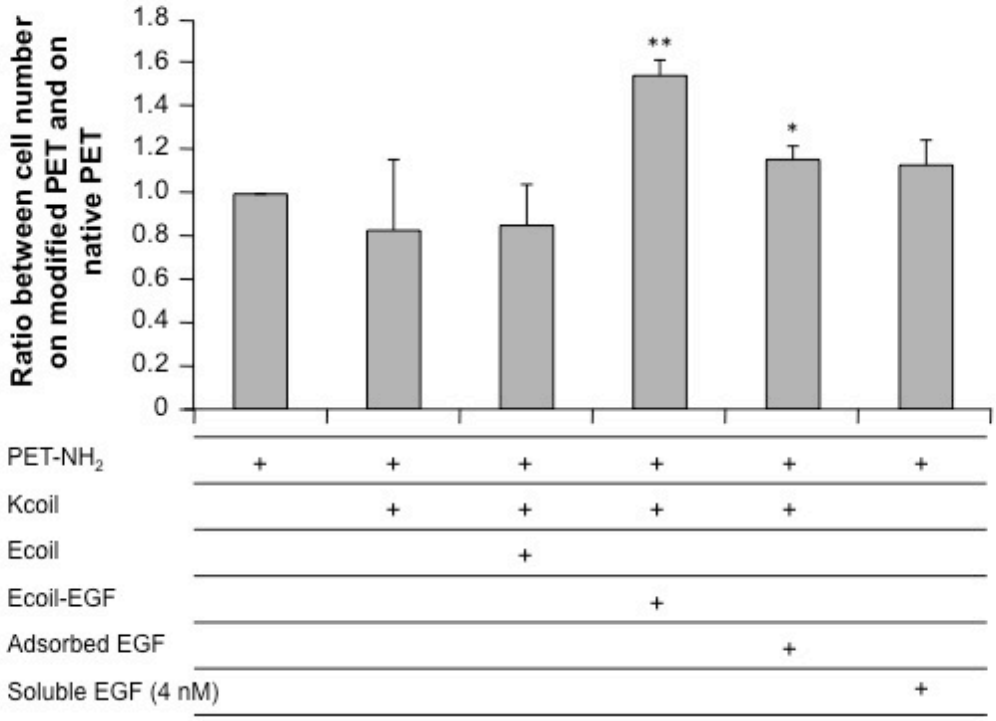

Figure 5.5 : Adhesion assays.

HCE-2 cells were incubated for 2 h on PET harbouring aminated groups (condition #1), or coated with grafted Kcoil peptide only (condition #2), E coil peptide bound to grafted K coil peptide (condition #3), Ecoil-EGF immobilized via coiled-coil interactions (condition #4), adsorbed EGF (condition #5), and aminated PET with Ecoil-EGF supply in solution (4 nM, condition #6). Note that each surface was HSA treated, with the exception of (e). Compared to PET-NH_2, differences were significant for $p < 0.05$ (*) and $p < 0.001$ (**), (n=4).

5.2.5.4 Adhesion assays

The effect of soluble EGF, adsorbed EGF and captured EGF via coiled-coil interactions onto Kcoil-functionalized surfaces upon HCE-2 cell adhesion was then investigated. For that purpose, HCE-2 cells were incubated on aminated-PET surfaces in the presence or absence of soluble EGF (4 nM), on K coil-functionalized PET surfaces where E coil peptide only or Ecoil-EGF had been previously immobilized via coiled-coil interactions (following HSA pre-treatment), and on K coil-functionalized PET surface where EGF had been adsorbed. As can be seen in Figure 5.5, a marked increase of HCE-2 adhesion was observed in the presence of coiled-coil immobilized Ecoil-EGF (+ca 55%) whereas both adsorbed EGF and soluble EGF resulted in a less significant effect when compared to control conditions (+ca 13% and +ca 16%, respectively). Of interest, no statistical differences were observed between control PET and aminated PET surfaces.

5.2.5.5 Morphological assays

The effect of immobilized EGF via coiled-coil interactions, upon cellular morphology was then compared to that of adsorbed or soluble (4nM) EGF. After a 24-h incubation period, a drastic change in HCE-2 cell morphology was observed for coiled-coil immobilized Ecoil-EGF, when compared to all other tested conditions (Figure 5.6). Whereas cells were characterized by a spherical morphology, indicative of low attachment, the presence of Ecoil-EGF that had been immobilized via coiled-coil interactions, induced cell spreading with dense peripheral actin

filament structures terminating in actin-rich domains, a typical trait of focal adhesion (indicated by arrows in Figure 5.6, panel f). For other conditions (soluble EGF supply or adsorbed EGF), most of the cell remained spherical even though spreading mechanisms were initiated.

5.2.5.6 Phosphorylation assays

EGF-dependent phosphorylation of EGFR can result in the activation of several signaling pathways. Among them, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathways have been demonstrated to be important for cell proliferation and migration (Huo et al. 2009; Klenkler and Sheardown 2004). Phosphorylation levels of EGFR were first assayed for HCE-2 cells, at different time points by Western blotting (Figure 5.7A). As expected, EGF receptor phosphorylation was observed neither for native PET nor for K coil-functionalized PET, on which untagged EGF had been previously adsorbed. On the contrary, EGFR phosphorylation in the presence of Ecoil-EGF that had been immobilized via coiled-coil interactions, was observed for 4 h, sharply contrasting with the transient EGFR phosphorylation pattern obtained with soluble EGF supply (no detectable EGFR phosphorylation was observed after 5 min, see Figure 5.7A).

In order to determine to which extent both MAPK and PI3K signaling pathways were triggered by immobilized EGF, Erk1/2 and Akt levels (total and phosphorylated) were also monitored by Western blotting. As shown in Figure 5.7B, phosphorylation of Akt was not observed for cells seeded on native PET, whereas in-solution, adsorbed and coiled-coil tethered EGF all resulted in Akt phosphorylation for at least 4 h. Note that Akt phosphorylation was

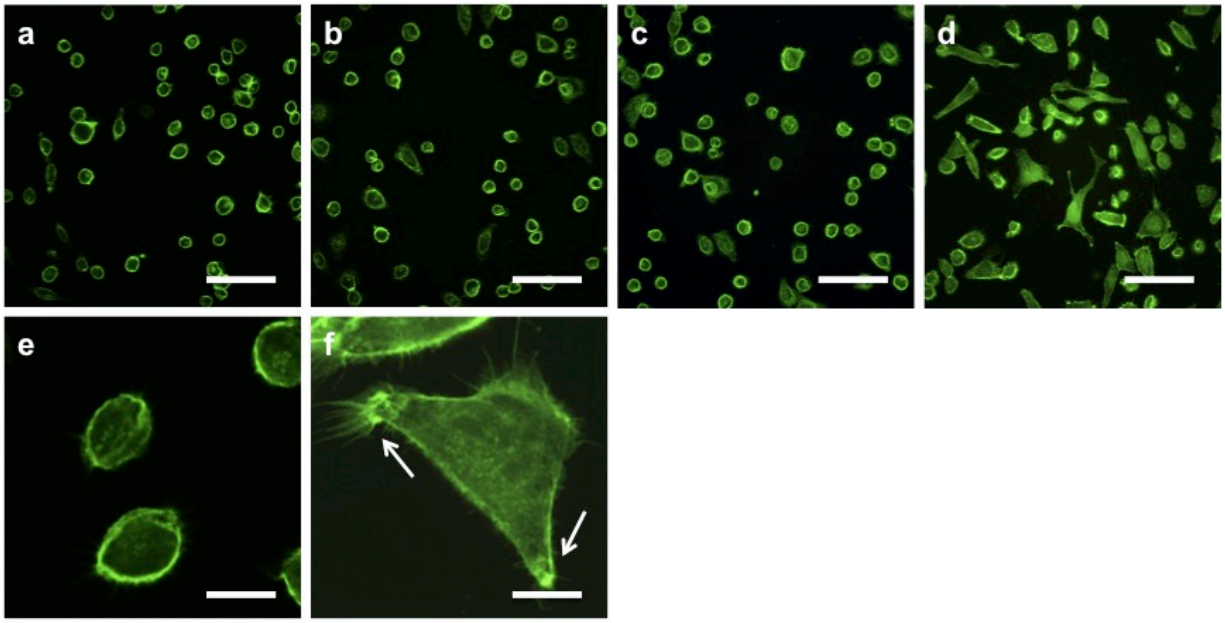

Figure 5.6 : Morphological study of adhered HCE-2 cells.

HCE-2 cells were cultured in KSFM for 24 h on native PET only (a) or with soluble EGF (4nM) (b), on K coil functionalized PET surfaces coated with adsorbed EGF (c) and coated with Ecoil-EGF immobilized in an oriented fashion via coiled-coil interactions (d). Panels (e) and (f) are magnified images of cells cultured on native PET (e) or on K coil functionalized PET on which Ecoil-EGF had been immobilized (f). HCE-2 cells were stained for actin with Alexa Fluor 488 phalloidin. Arrows point towards actin-rich domains, indicative of focal adhesion. Scale bar = 10 µm for a, b, c and d, and 2.5 µm for e and f.

further prolonged for at least 5 h in the case of coiled-coil tethered EGF, as opposed to soluble EGF supply. In the case of Erk1/2, phosphorylation was observed neither for PET alone nor adsorbed EGF. As expected, soluble EGF supply resulted in a transient Erk1/2 phosphorylation pattern (phosphorylation was only detectable for the 5-min time point). In sharp contrast, a strong and prolonged Erk1/2 phosphorylation pattern (for at least 5 hours, Figure 5.7B) was observed when HCE-2 cells were cultured on PET surfaces where Ecoil-EGF had been immobilized.

5.2.5.7 Proliferation assays

HCE-2 cells were then seeded on the same type of surfaces as those used for adhesion assays. Medium was changed 24 h and 96 h after inoculation. HCE-2 culture was stopped after 5 days. Similar growth rates (μ) of 0.0196 h^{-1}, 0.0186 h^{-1}, 0.0184 h^{-1} and 0.0184 h^{-1} (corresponding to doubling times ranging from 35.4 to 37.7 h) were calculated for cells respectively grown on native PET, K coil-functionalized PET with adsorbed EGF, native PET with soluble EGF added at inoculation only or repleted at medium change (Figure 5.8). In contrast, a growth rate of 0.0257 h^{-1}, corresponding to a doubling time of only 26.9 h, was observed for HCE-2 cells grown on coiled-coil immobilized Ecoil-EGF. This corresponded to a 30 % increase in HCE-2 cell growth rate when compared to all of the other tested conditions.

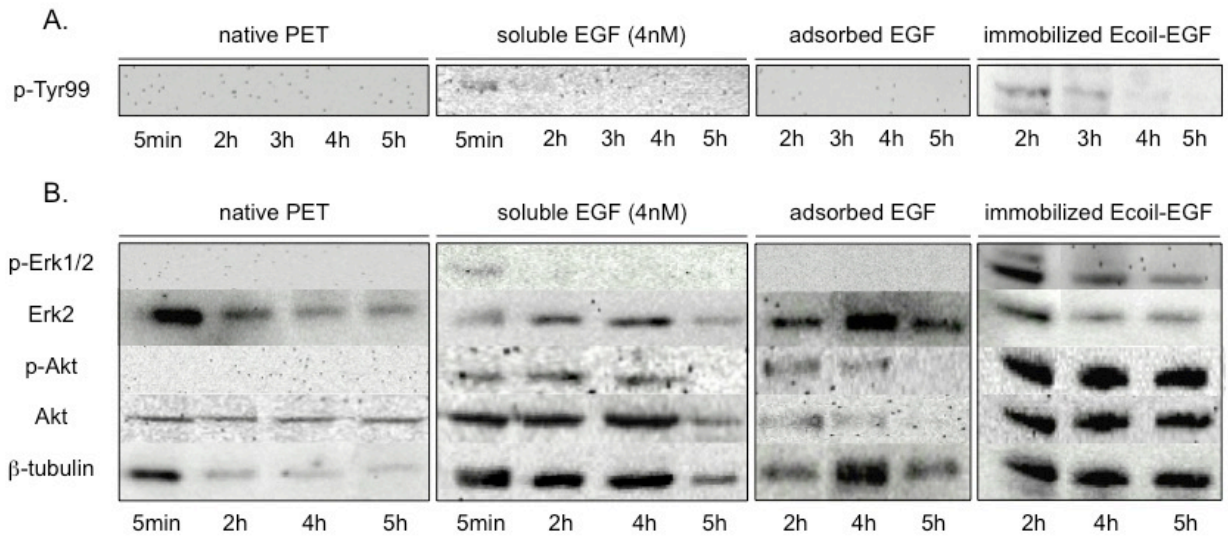

Figure 5.7 : Time course of EGF receptor, Erk1/2 and Akt phosphorylation.

The phosphorylation of EGF receptor, Erk1/2 and Akt in HCE-2 cells was monitored at different time by Western blotting on native PET, on native PET with Ecoil-EGF supply in solution (4 nM), on K coil-functionalized PET on which untagged EGF was adsorbed and on K coil-functionalized PET on which Ecoil-EGF was immobilized via coiled-coil interactions. The 180 kDa band immunoreactive to anti-pTyr antibody (corresponding to EGF receptor) (A) and the 44, 42, 60 and 55 kDa immunoreactive band corresponding, respectively, to pErk1/2, Erk2, Akt and b-tubulin (B) were captured using a Kodak 440cf imager

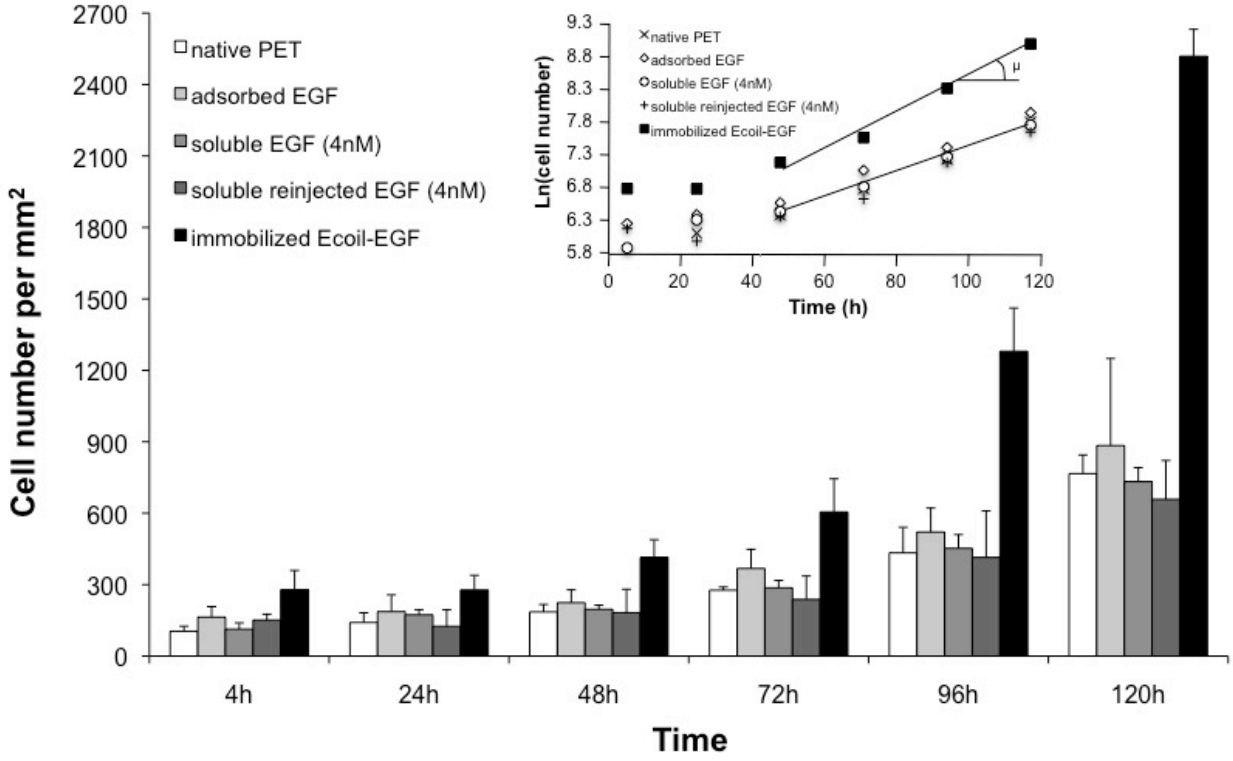

Figure 5.8 : Proliferation assays.

HCE-2 cells were cultivated in KSFM medium for 120 h on native PET, on native PET with soluble EGF supply (4 nM), on K coil-functionalized PET on which EGF had been previously adsorbed and on which Ecoil-EGF had been previously immobilized via coiled-coil interactions. KSFM medium was changed at 24h and 96h by KSFM complemented with bovine pituitary extract. Untagged EGF (4nM) was supplied in solution after each medium replacement for one condition (n=4).

5.2.6 Discussion

One of the challenges faced in tissue engineering and regenerative medicine resides in the precise, efficient and reproducible control of the interactions between cells and (bio)materials in order to promote the restoration or maintenance of tissue or organ functions (Langer and Vacanti 1993). With this goal in mind, the development of new scaffolds to stimulate and spatially guide cell growth has been burgeoning, while advances in micro/nano-patterning techniques (Curran et al. 2010), plasma- and wet chemistry-based modification methodologies have opened new pathways to control protein-coupling (Crombez et al. 2005) and cell-adhesion (Latkany et al. 1997; Mwale et al. 2006) to these polymeric materials. Growth factors are important local mediators that control proliferation and differentiation of cells in healthy tissue, and are locally stored in the cells' extracellular matrix in their active or proform. Growth factor administration, combined with biomaterial implants, is thus a highly attractive strategy to synergistically enhance tissue regeneration. The short half-life of soluble growth factors, their high cost and potential side effects related to the broad expression of their receptors at the surfaces of many cell types, are shortcomings which limit their systematic use. An alternative to overcome these issues, is stable immobilization of growth factors on scaffolds to limit their clearance through endocytosis/degradation pathways, and abolish their diffusion and thus limiting delivery to the local implant region. The proof-of-concept of the applicability of such a strategy was first made by Kuhl and colleagues with murine EGF covalently tethered to glass surfaces via PEG linkers (Kuhl and Griffith-Cima 1996). Further recent studies have highlighted the impressive potential of immobilized EGF for the recruitment and expansion of neuronal (Nakaji-Hirabayashi et al.

2007) or mesenchymal stem cells (Fan et al. 2007), bone marrow-derived multi-potent stromal cells (Platt et al. 2009), or corneal cells (Klenkler et al. 2005; Nakaji-Hirabayashi et al. 2007).

As demonstrated in our current study, as well as our previous work (Boucher et al. 2009) and by others (Kuhl and Griffith-Cima 1996), passive adsorption of EGF has a minor effect, if any, on EGF receptor phosphorylation (Figure 5.3) and subsequent activation of the MAPK signaling pathway (Figure 5.7), cell adhesion (Figure 5.5), proliferation (Figure 5.8) and spreading (Figure 5.6). In stark contrast, strategies for covalent tethering of EGF that take advantage of primary amines present on EGF N-terminus or on lysine side-chains can promote EGF-dependent signaling and cell outcomes. This approach may be suitable for murine EGF (no lysine residue) (Ichinose et al. 2006; Kuhl and Griffith-Cima 1996), but suboptimal for human EGF, as it was recognized that direct amine coupling was detrimental to its bioactivity (Lee and Park 2002; O'Connor-McCourt et al. 1998). As an alternative, several research groups have explored various strategies to display EGF in an oriented, non-direct and non-covalent fashion. These approaches relied on the use of chimeric proteins corresponding to EGF fused to tags (poly-histidine (Kato et al. 2005; Nakaji-Hirabayashi et al. 2009)), the Fc domain of an IgG (Boucher et al. 2008; Ogiwara et al. 2005) for Ni2+/NTA- and protein A/G-mediated recruitment, respectively, or protein domains that are directed to bind to specific scaffolds (e.g. collagen-binding and hydrophobic domains (Elloumi et al. 2006; Hannachi Imen et al. 2009)). However, the nature and the position of a tag per se may negatively affect the bioactivity of the fused EGF (Boucher et al. 2008). Furthermore, in the case of polyhistidine-tags, metallic ions used for chelation may be potentially toxic (Zhou et al. 2009).

In the present study, we have explored the use of a de novo heterodimeric coiled-coil system to immobilize EGF in an oriented fashion, via coiled-coil interactions, on PET surfaces,

in order to promote subsequent corneal epithelial cell adhesion and proliferation. More specifically, we have set up a capture method based on the E and K coils that hetero-dimerize in a highly specific and stable fashion (De Crescenzo et al. 2003a; De Crescenzo et al. 2003b). In our approach, tethering is achieved by simple incubation of fully bioactive Ecoil-EGF (Boucher et al. 2008) onto surfaces on which the other coil partner (i.e., the K coil) has been covalently bound. In order to achieve covalent grafting of the partner K coil, PET surfaces were first aminated by ammonia plasma treatment (Figure 5.1). Plasma-generated active species reacted with C-C, C-H and C-O bonds within the polymer's backbone, resulting in substantial addition of nitrogen-containing functional groups, of which more than 30 % were primary amines (Table 5.1). Plasma treatment is also known to promote polymer chain scissions near the surface, resulting in the generation of lower molecular-weight, soluble oligomers at the material's surface (Girardeaux et al. 1996). Many of the nitrogen functionalities introduced by our plasma treatment were likely on these oligomer molecules and were removed after a two-hour incubation in PBS, leading to the observed decrease in primary amine concentration down to 1.3 at. %, in agreement with Girardeaux and coworkers' results (Girardeaux et al. 1996). LC-SPDP linker was then successfully grafted on aminated PET via the formation of a stable amide bond (Figure 5.1), resulting in the appearance of sulfur in the elemental composition of the treated PET (Table 5.1). After a 2-h incubation of the modified PET with K coil peptide, nitrogen concentration, [N], doubled (Table 5.1) and the relative concentration of amide bonds also increased (Figure 5.2), strongly suggesting that covalent grafting of the peptide had occurred. Thereafter, HSA pretreatment that had been required to prevent non-specific adsorption of EGF (Figure 5.3) impeded further XPS characterization due to the great complexity of the modified surface. HSA pretreatment was however required to abrogate non-specific interactions of Ecoil-EGF with

aminated PET (Figure 5.3), in agreement with previous reports highlighting that protein physisorption is favored on aminated surfaces (Faucheux et al. 2004). Ecoil-EGF specific grafting via coiled-coil interactions and bioactivity were then confirmed by assaying A-431 cell surface EGF receptor phosphorylation in vitro (Figure 5.3). A surface concentration of 46.9 ± 9.5 pmol/cm2 of grafted EGF was determined by ELISA. This value is in the same range as those previously reported for the oriented grafting of EGF by various different approaches (values ranging from 16 to 66 pmol/cm2) (Nakaji-Hirabayashi et al. 2007; Ogiwara et al. 2005), but it is almost three-fold lower than the value we previously reported for coiled-coil-mediated EGF tethering on glass surfaces (Boucher et al. 2009). In that respect, N-rich plasma-polymerized ethylene (PPE:N) coating, which has been shown to dramatically increase the (stable) primary amine concentration (Truica-Marasescu and Wertheimer 2008), may in future be applied to further increase K coil grafting levels.

HCE-2 cell culture on PET surfaces displaying Ecoil-EGF was then demonstrated to be highly advantageous in a tissue engineering perspective, when compared to the others culture conditions and surface treatments we tested including EGF adsorbed on PET films, and providing soluble EGF. In particular, coiled-coil-mediated display of EGF resulted in increased adhesion (Figure 5.5), proliferation (Figure 5.8) and spreading of HCE-2 cells (Figure 5.6). EGF grafting has been shown to increase 3T3 Swiss cell adhesion (Ogiwara et al. 2005), whereas no significant differences between adsorbed and grafted EGF (PEG-mediated) were observed by Klenkler et al. upon human epithelial cell adhesion (Klenkler et al. 2009). This difference may result from our HSA pretreatment of K coil-functionalized surfaces that may provide HCE-2 cells with additional anchoring points when compared to physisorbed EGF (HSA pretreatment was not performed on these surfaces), or to EGF tethered via PEG linker (Klenkler et al. 2009). Alternatively, it may

also be attributed to the intrinsic differences within the protocols used to assay cell adhesion (centrifugation (Klenkler et al. 2009), versus manual rinsing to remove poorly-adhering cells as in this study). Following adhesion, cell spreading was accelerated in the presence of Ecoil-EGF (Figure 5.6). It is thus likely that EGF stimulated cell spreading, via the production of laminin, a6-integrin (Klenkler et al. 2009) and fibronectin (Klenkler et al. 2009; Nishida et al. 1984), an extracellular matrix component known to interact with integrins to promote spreaded morphologies with actin rich-domains indicative of focal adhesion (Bill et al. 2004; Maldonado and Furcht 1995), such as those we observed by immunofluorescence (Figure 5.6). HCE-2 cell exposure to tethered EGF drastically prolonged the duration of EGF receptor phosphorylation (Figure 5.7A) and the downstream activation of its signaling pathways, i.e. MAPK and PI3K pathways, through the phosphorylation of Erk1/2 and Akt, respectively (Huo et al. 2009; Wang et al. 2009). These findings sharply contrasted with the transient phosphorylation patterns of EGF receptor, Erk1/2 and Akt that were induced by soluble EGF supply (Figure 5.7). These results are in agreement with previous reports where Erk activation upon soluble EGF supply was transient with a strong decrease of its phosphorylation generally observed after 30 to 90 min (Fan et al. 2007; Wang et al. 2009). In the presence of Ecoil-EGF, Erk phosphorylation was observed to be intense for at least 5 hours, in agreement with results previously reported by Ito et al. for A-431 cells (Ito et al. 2001), and by Fan et al. for mesenchymal stem cells (MSC) (Fan et al. 2007) in response to stimulation by immobilized EGF. Interestingly, Erk is acknowledged to be involved in HCE-2 proliferation (Wang et al. 2009); furthermore, in the case of MSC, spreading is enhanced by tethered EGF via sustained phosphorylation of Erk1/2 (Fan et al. 2007). The prolonged activation of Erk may thus be directly linked to both increases of corneal epithelial cell

proliferation and spreading (Figures 5.6 and 5.8, 30% increase in growth rate) that we and others (Klenkler et al. 2009) observed.

5.2.7 Conclusion

We report a novel approach for the oriented immobilization of EGF on plasma-modified PET surfaces. Our approach is versatile, since it is applicable to any protein that can be E coil-tagged and thereby tethered on any aminated surface or scaffold via interaction with its Kcoil partner. Significant findings for tissue engineering applications of Ecoil-EGF being displayed in an oriented fashion are evident from the observed promotion of corneal cell response by stimulated adhesion, spreading and proliferation through a prolonged activation of ErbB receptor-signalling pathways.

5.2.8 Acknowledgements

This work was supported by the Canada Research Chair on Protein-enhanced Biomaterials (G.D.C.), the Canada Research Chair in Applied Metabolic Engineering (M.J.), by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (G.D.C., M.J., M.R.W.).

5.2.9 References

Beamson G, Briggs D. 1992. High Resolution XPS of Organic Polymers, the scienta ESCA300 database. Chichester: Wiley. 295 p.

Bill HM, Knudsen B, Moores SL, Muthuswamy SK, Rao VR, Brugge JS, Miranti CK. 2004. Epidermal growth factor receptor-dependent regulation of integrin-mediated signaling and cell cycle entry in epithelial cells. Molecular and cellular biology 24(19):8586-99.

Boucher C, Liberelle B, Jolicoeur M, Durocher Y, De Crescenzo G. 2009. Epidermal Growth Factor Tethered through Coiled-Coil Interactions Induces Cell Surface Receptor Phosphorylation. Bioconjugate chemistry 20(8):1569-1577.

Boucher C, St-Laurent G, Jolicoeur M, Crescenzo GD, Durocher Y. 2010. Protein detection by Western blot via coiled-coil interactions. Analytical biochemistry 399(1):138-140.

Boucher C, St-Laurent G, Loignon M, Jolicoeur M, Crescenzo GD, Durocher Y. 2008. The Bioactivity and Receptor Affinity of Recombinant Tagged EGF Designed for Tissue Engineering Applications Is Defined by the Nature and Position of the Tags. Tissue engineering. Part A 14(12):2069-2077.

Chirila TV. 2001. An overview of the development of artificial corneas with porous skirts and the use of PHEMA for such an application. Biomaterials 22(24):3311-7.

Crombez M, Chevallier P, Gaudreault RC, Petitclerc E, Mantovani D, Laroche G. 2005. Improving arterial prosthesis neo-endothelialization: Application of a proactive VEGF construct onto PTFE surfaces. Biomaterials 26(35):7402-7409.

Curran JM, Chen R, Stokes R, Irvine E, Graham D, Gubbins E, Delaney D, Amro N, Sanedrin R, Jamil H and others. 2010. Nanoscale definition of substrate materials to direct human

adult stem cells towards tissue specific populations. (1573-4838 (Electronic)):DOI : 10.1007/s10856-009-3976-x.

De Crescenzo G, Litowski JR, Hodges RS, O'Connor-McCourt MD. 2003a. Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. Biochemistry 42(6):1754-1763.

De Crescenzo G, Pham PL, Durocher Y, Chao H, O'Connor-McCourt MD. 2004. Enhancement of the antagonistic potency of transforming growth factor-beta receptor extracellular domains by coiled coil-induced homo- and heterodimerization. J Biol Chem 279(25):26013-26018.

De Crescenzo G, Pham PL, Durocher Y, O'Connor-McCourt MD. 2003b. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding to the extracellular domain of the type II TGF-beta receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding. Journal of Molecular Biology 328(5):1173-1183.

Elloumi I, Kobayashi R, Funabashi H, Mie M, Kobatake E. 2006. Construction of epidermal growth factor fusion protein with cell adhesive activity. Biomaterials 27(18):3451-58.

Fan VH, Tamama K, Au A, Littrell R, Richardson LB, Wright JW, Wells A, Griffith LG. 2007. Tethered epidermal growth factor provides a survival advantage to mesenchymal stem cells. Stem cells 25(5):1241-51.

Faucheux N, Schweiss R, Lutzow K, Werner C, Groth T. 2004. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. Biomaterials 25(14):2721-30.

Favia P, Stendardo MV, d'Agostino R. 1996. Selective grafting of amine groups on polyethylene by means of NH3-H2 RF glow discharges. Plasmas and Polymers 1(2):91-112.

Girardeaux C, Zammatteo M, Art M, Guillon B, Pireaux JJ, Caudano R. 1996. Amination of poly(ethylene-terephthalate) polymer surface for biochemical applications. Plasmas and Polymers 1(4):327-346.

Hannachi Imen E, Nakamura M, Mie M, Kobatake E. 2009. Construction of multifunctional proteins for tissue engineering: epidermal growth factor with collagen binding and cell adhesive activities. Journal of biotechnology 139(1):19-25.

Hunter T, Cooper JA. 1981. Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells. Cell 24(3):741-752.

Huo Y, Qiu WY, Pan Q, Yao YF, Xing K, Lou MF. 2009. Reactive oxygen species (ROS) are essential mediators in epidermal growth factor (EGF)-stimulated corneal epithelial cell proliferation, adhesion, migration, and wound healing. Experimental eye research 89(6):876-86.

Ichinose J, Morimatsu M, Yanagida T, Sako Y. 2006. Covalent immobilization of epidermal growth factor molecules for single-molecule imaging analysis of intracellular signaling. Biomaterials 27(18):3343-3350.

Ito Y, Chen G, Imanishi Y, Morooka T, Nishida E, Okabayashi Y, Kasuga M. 2001. Differential control of cellular gene expression by diffusible and non-diffusible EGF. Journal of biochemistry 129(5):733-7.

Kato K, Sato H, Iwata H. 2005. Immobilization of histidine-tagged recombinant proteins onto micropatterned surfaces for cell-based functional assays. Langmuir 21(16):7071-7075.

Klenkler B, Sheardown H. 2004. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. Experimental eye research 79(5):677-88.

Klenkler BJ, Chen H, Chen Y, Brook MA, Sheardown H. 2008. A high-density PEG interfacial layer alters the response to an EGF tethered polydimethylsiloxane surface. Journal of biomaterials science. Polymer edition 19(11):1411-24.

Klenkler BJ, Dwivedi D, West-Mays JA, Sheardown H. 2009. Corneal epithelial cell adhesion and growth on EGF-modified aminated PDMS. Journal of biomedical materials research. Part A.

Klenkler BJ, Griffith M, Becerril C, West-Mays JA, Sheardown H. 2005. EGF-grafted PDMS surfaces in artificial cornea applications. Biomaterials 26(35):7286-96.

Kuhl PR, Griffith-Cima LG. 1996. Tethered epidermal growth factor as a paradigm for growth factor-induced stimulation from the solid phase. Nature Medicine 2(9):1022-1027.

Langer R, Vacanti JP. 1993. Tissue engineering. Science (New York, N.Y.) 260(5110):920-6.

Latkany R, Tsuk A, Sheu MS, Loh IH, Trinkaus-Randall V. 1997. Plasma surface modification of artificial corneas for optimal epithelialization. Journal of biomedical materials research 36(1):29-37.

Lee H, Park TG. 2002. Preparation and characterization of mono-PEGylated epidermal growth factor: evaluation of in vitro biologic activity. Pharmaceutical Research 19(6):845-51.

Legeais JM, Renard G. 1998. A second generation of artificial cornea (Biokpro II). Biomaterials 19(16):1517-22.

Maldonado BA, Furcht LT. 1995. Epidermal growth factor stimulates integrin-mediated cell migration of cultured human corneal epithelial cells on fibronectin and arginine-glycine-aspartic acid peptide. Investigative ophthalmology & visual science 36(10):2120-6.

Mwale F, Wang HT, Nelea V, Luo L, Antoniou J, Wertheimer MR. 2006. The effect of glow discharge plasma surface modification of polymers on the osteogenic differentiation of committed human mesenchymal stem cells. Biomaterials 27(10):2258-64.

Nakaji-Hirabayashi T, Kato K, Arima Y, Iwata H. 2007. Oriented immobilization of epidermal growth factor onto culture substrates for the selective expansion of neural stem cells. Biomaterials 28(24):3517-29.

Nakaji-Hirabayashi T, Kato K, Iwata H. 2009. Surface-anchoring of spontaneously dimerized epidermal growth factor for highly selective expansion of neural stem cells. Bioconjugate chemistry 20(1):102-10.

Nishida T, Tanaka H, Nakagawa S, Sasabe T, Awata T, Manabe R. 1984. Fibronectin synthesis by the rabbit cornea: effects of mouse epidermal growth factor and cyclic AMP analogs. Japanese journal of ophthalmology 28(2):196-202.

O'Connor-McCourt MD, De CG, Lortie R, Lenferink AE, Grothe S. 1998. QUANTITATIVE ANALYSIS OF BIOSPECIFIC INTERACTIONS - 11. The Analysis of surface plasmon resonance-based biosensor data using numerical integration. Harwood Academic Publishers N/A(1):175-190.

Ogiwara K, Nagaoka M, Cho CS, Akaike T. 2005. Construction of a novel extracellular matrix using a new genetically engineered epidermal growth factor fused to IgG-Fc. Biotechnology Letters 27(20):1633-1637.

Platt MO, Roman AJ, Wells A, Lauffenburger DA, Griffith LG. 2009. Sustained epidermal growth factor receptor levels and activation by tethered ligand binding enhances osteogenic differentiation of multi-potent marrow stromal cells. Journal of Cellular Physiology 221(2):307-317.

Tripet B, Yu L, Bautista DL, Wong WY, Irvin RT, Hodges RS. 1996. Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain off the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. Protein engineering 9(11):1029-42.

Truica-Marasescu F, Wertheimer MR. 2008. Nitrogen-rich plasma-polymer films for biomedical applications. Plasma Processes and Polymers 5(1):44-57.

Wang Z, Yang H, Zhang F, Pan Z, Capo-Aponte J, Reinach PS. 2009. Dependence of EGF-induced increases in corneal epithelial proliferation and migration on GSK-3 inactivation. Investigative ophthalmology & visual science 50(10):4828-35.

Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. 2001. Corneal blindness: a global perspective. Bulletin of the World Health Organization 79(3):214-21.

Zeng Y, Pinard M, Jaime J, Bourget L, Uyen Le P, O'Connor-McCourt MD, Gilbert R, Massie B. 2008. A ligand-pseudoreceptor system based on de novo designed peptides for the generation of adenoviral vectors with altered tropism. The journal of gene medicine 10(4):355-67.

Zhou Z, Liu X, Liu Q, Liu L. 2009. Evaluation of the potential cytotoxicity of metals associated with implanted biomaterials (I). Preparative biochemistry & biotechnology 39(1):81-91.

Zieske JD, Takahashi H, Hutcheon AE, Dalbone AC. 2000. Activation of epidermal growth factor receptor during corneal epithelial migration. Investigative ophthalmology & visual science 41(6):1346-55.

CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE

Un des défis majeurs existant en ingénierie tissulaire et en médecine régénérative réside dans le contrôle précis des interactions se produisant entre les cellules et un biomatériau afin de promouvoir la restauration et/ou le maintien des fonctions de tissus ou organes (Langer and Vacanti 1993). Pour ce faire, le développement de supports biocompatibles permettant de promouvoir l'adhésion, la croissance et la migration cellulaire a connu un essor important au cours de ces dix dernières années. Toutefois, en raison de leurs propriétés de surface, certains biomatériaux ne permettent pas d'induire de telles réponses. Leur modification par le greffage de protéines peut ainsi être une solution envisageable.

L'immobilisation de protéines présente comme avantages de promouvoir une réponse cellulaire plus longue par le maintien d'une concentration protéique locale constante, d'être moins onéreuse que des approches basées sur l'injection systémique de protéines et de diminuer le risque de dégradation de ces dernières. Dans ce contexte, différentes stratégies ont été développées, à savoir : l'immobilisation orientée ou le greffage non-orienté de protéines. En raison des désavantages présentés par la fixation non-orientée, nous nous sommes concentrés sur l'élaboration d'une approche permettant l'immobilisation orientée de protéines. Notre approche a été basée sur l'interaction existant entre deux peptides synthétiques dénommés E coil et K coil. Le but de cette stratégie a été d'immobiliser une protéine étiquetée par un de ces peptides sur un biomatériau sur lequel le peptide complémentaire aura préalablement été greffé. Dans un premier temps, l'impact de ces étiquettes sur l'activité biologique du facteur de croissance EGF a été

étudié et comparé à une approche déjà utilisée pour l'immobilisation orientée de EGF à des fins d'application en ingénierie tissulaire, à savoir l'étiquetage de EGF par la portion Fc de l'immunoglobuline G (Ogiwara et al. 2005). Les protéines chimères ont donc été produites et sécrétées par des cellules HEK-293 puis purifiées par chromatographie d'affinité avec l'obtention d'excellents rendements de production, ce qui confirme que cette plateforme est un support robuste permettant la production et la sécrétion de protéines tel que précédemment rapporté (Pham et al. 2005). L'activité biologique de ces protéines a alors pu être testée et il a été mis en évidence que la protéine Ecoil-EGF est aussi active que du EGF non étiqueté (source commerciale) et plus active que les autres protéines produites à savoir le Kcoil-EGF, le EGF-Fc et le Fc-EGF. Ces résultats peuvent s'expliquer par les propriétés de ces étiquettes. En effet, le Fc est une étiquette volumineuse qui empêchera l'interaction de EGF avec son récepteur lorsqu'elle sera placée en position N-terminale de la protéine. Au contraire, les coils sont des peptides beaucoup plus petits qui n'engendreront pas d'encombrement stérique et permettront l'interaction de EGF avec son récepteur. Une différence de bioactivité a cependant été observée pour ces deux protéines produites par des cellules de mammifères, ce qui est contraire aux résultats obtenus par Le et al. qui ont démontré que du Kcoil-EGF et que du Ecoil-EGF possèdent la même activité biologique après avoir été produits dans des bactéries, purifiés et repliés (Le et al. 2009). Étant donné que seule la charge nette du coil diffère pour ces deux protéines chimères, il semblerait que la charge positive du K coil empêche le repliement optimal de la protéine Ecoil-EGF lors de sa synthèse dans des cellules de mammifères ou que le K coil empêche l'interaction optimale entre la protéine et son récepteur ce qui a été confirmé par les expériences effectuées par résonance plasmonique de surface. En effet, une fois immobilisée, le Ecoil-EGF et le Kcoil-EGF possède la même affinité pour le domaine extracellulaire de EGF. Ainsi, la localisation et la nature de

l'étiquette (position N- ou C-terminale) peut avoir un impact majeur sur l'activité biologique de EGF. Par conséquent, les protéines étiquetées coil, en raison de la conservation de leur bioactivité, semblent être une alternative prometteuse pour de futures applications en ingénierie tissulaire comparativement aux approches déjà existantes (Nakaji-Hirabayashi et al. 2007; Ogiwara et al. 2005). En raison des plus hauts rendements de production, il a été décidé d'utiliser et d'immobiliser le Ecoil-EGF pour la suite du projet. L'immobilisation du K coil a été effectuée sur des surfaces de verre aminé à l'aide d'un protocole chimique basé sur l'utilisation du LC-SPDP comme bras espaceur hétéro-bifonctionnel. Tout d'abord, l'efficacité du protocole élaboré a été évaluée par résonance plasmonique de surface. Le greffage covalent du K coil et la capture du Ecoil-EGF via l'interaction coiled-coil sur les surfaces de verre fonctionnalisé ont ensuite été caractérisés par ellisopmétrie et mesures de l'angle de contact. Le K coil est capable de recruter de manière hautement spécifique et stable la protéine Ecoil-EGF. Ces résultats corroborent les études précédentes ayant démontré la spécificité et la forte affinité existant entre ces 2 peptides lors de l'interaction coiled-coil (De Crescenzo et al. 2003a; Tripet et al. 2002; Tripet et al. 1996). 115 pmol/cm^2 de Ecoil-EGF ont été immobilisés via l'interaction coiled-coil sur les surfaces de verre aminé alors qu'à des fins de comparaison, 330 pmol/cm^2 de EGF peuvent être greffés de manière non orientée par couplage amine sur ces mêmes surfaces de verre aminé non fonctionnalisées. Mis en présence de cellules A-431, le Ecoil-EGF immobilisé promeut l'adhésion cellulaire, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Ogiwara *et al.* qui ont observé une augmentation de l'adhésion de cellules 3T3 et A-431 en présence de EGF-Fc immobilisé (Ogiwara et al. 2005; Ogiwara et al. 2006). En revanche, le greffage non orienté engendre la perte de l'activité biologique de la protéine et n'a aucun effet sur l'adhésion (Kuhl and Griffith-Cima 1996). La présence de EGF immobilisé via l'interaction coiled-coil active

également de façon soutenue la phosphorylation de EGFR comparativement à un ajout de EGF en solution, ce qui peut s'expliquer par l'absence d'internalisation de la protéine et l'absence de dégradation des complexes ligand-récepteur (Ito et al. 1997; Ogiwara et al. 2006). L'impact de l'orientation de la protéine sur le comportement cellulaire a été étudié et a permis de démontrer que le EGF immobilisé de manière non-orientée était capable d'induire la phosphorylation du récepteur de EGF (EGFR) mais celle-ci était beaucoup moins intense que la phosphorylation obtenue avec des cellules mises en présence de Ecoil-EGF immobilisé via l'interaction coiled-coil. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la présence de la protéine immobilisée de manière orientée facilite l'interaction entre la protéine et son récepteur. Tous ces résultats démontrent donc qu'il a été possible de greffer le K coil de façon covalente sur des surfaces de verre aminé, d'immobiliser le Ecoil-EGF via l'interaction coiled-coil et d'obtenir une réponse cellulaire. Étant donné que EGF induit l'apoptose des cellules A-431 (Grudinkin et al. 2007) et que les surfaces de verre ne peuvent être utilisées dans le cadre d'une future application *in vivo*, le Ecoil-EGF a été immobilisé sur un biomatériau, le PET et l'impact de l'immobilisation de EGF via l'interaction coiled-coil sur le comportement de cellules épithéliales humaines de la cornée (HCE-2) a été étudié. En effet, lors de greffes de cornée, il est actuellement très difficile de promouvoir la réépithélisation du greffon, ce qui peut entrainer son rejet de l'œil (Klenkler et al. 2008; Legeais and Renard 1998). Klenkler *et al*. ont essayé de remédier à ce problème en greffant du EGF sur PDMS. Cependant, en raison de la présence de polyéthyène glycol (PEG) comme point d'ancrage entre la surface et la protéine, l'obtention de couches confluentes de HCE-2 n'a pas été possible (Klenkler et al. 2008). Ce résultat est surement dû au fait que le PEG doit limiter l'adsorption de protéines d'adhésion. L'utilisation d'une stratégie permettant d'éviter ce problème présente donc un intérêt primordial pour de futures greffes de cornée. Le greffage

covalent du K coil sur un biomatériau (PET) a donc été effectué après un traitement préalable au plasma ammoniac permettant d'introduire des fonctions amine primaire en surface. L'utilisation du plasma présente l'avantage de stériliser les surfaces. Les espèces activées présentes dans le plasma (élections, ions…) attaquent le squelette du PET et plus particulièrement les liaisons C-C, C-H et C-O ce qui conduit à la génération d'oligomères sur lesquelles la plupart des amines primaires ont été fixées (Girardeaux et al. 1996). Ce phénomène expliquerait alors la forte décroissance de la concentration en amine primaire après lavage dans du PBS. Cependant, les analyses XPS ont démontré que les K coils ont été greffés de manière covalente sur le PET. Un traitement à la HSA s'est avéré nécessaire afin d'éviter tout risque subséquent d'adsorption non spécifique de EGF. La quantité de Ecoil-EGF immobilisé a été comparable aux valeurs retrouvées dans la littérature avec un EGF étiqueté Fc ou polyhistidine, à savoir de l'ordre de 50 pmol/cm^2 (Nakaji-Hirabayashi et al. 2007; Ogiwara et al. 2005) mais reste toutefois 2,5 fois inférieure aux chiffres obtenus lors de l'immobilisation du Ecoil-EGF sur des surfaces de verre (Boucher et al. 2009). L'étape limitante du protocole étant la quantité d'amines primaires à sa surface, l'augmentation de leur concentration surfacique pourrait permettre d'augmenter la quantité de Ecoil-EGF immobilisée sur le PET. Pour ce faire, il pourrait être envisagé d'utiliser un revêtement de PPE: N (Truica-Marasescu and Wertheimer 2008). Par la suite, le comportement de cellules épithéliales de la cornée (HCE-2) cultivées sur du PET arborant du Ecoil-EGF immobilisé via l'interaction coiled-coil a été comparé à celui de HCE-2 en présence de EGF adsorbé ou ajouté en solution. Les surfaces présentant du Ecoil-EGF stimulent l'adhésion, la prolifération et l'étalement des cellules HCE-2. Il avait déjà été démontré que le greffage de EGF stimulait l'adhésion des cellules 3T3 (Ogiwara et al. 2005) alors qu'aucune différence au niveau de l'adhésion de cellules épithéliales de la cornée entre du EGF adsorbé et

du EGF greffé (via le PEG) n'avait été observé par Klenkler *et al.* (Klenkler et al. 2009). Cette différence par rapport à nos résultats peut s'expliquer par le fait que le prétraitement à la HSA sur les surfaces fonctionnalisées par les K coils peut fournir des points d'ancrage additionnels comparativement aux surfaces présentant du EGF physisorbé (sur lesquelles il n'y a pas eu de prétraitement à la HSA) ou aux surfaces présentant du EGF greffé via un bras espaceur PEG (Klenkler et al. 2009). L'étalement cellulaire est également accéléré en présence de Ecoil-EGF. En effet, EGF promeut l'étalement des cellules via la production de laminine, de α_6-integrines (Klenkler et al. 2009) et de fibronectine (Klenkler et al. 2009; Nishida et al. 1984), qui est un composant de la matrice extracellulaire connu pour interagir avec les intégrines qui peuvent ainsi promouvoir des morphologies étalées (avec des domaines riches en actine indiquant la présence de points focaux d'adhésion) (Bill et al. 2004; Maldonado and Furcht 1995). L'exposition de HCE-2 à du EGF immobilisé prolonge également la durée de la phosphorylation du récepteur de EGF et des voies de signalisation sous-jacentes telles que la voie des MAPK ou des PI3K à travers la phosphorylation de Erk1/2 et d'Akt, respectivement (Huo et al. 2009; Wang et al. 2009). Ces résultats contrastent avec ceux obtenus avec du EGF en solution où la phosphorylation transitoire de EGFR, de Erk1/2 et d'Akt a été observée. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec la littérature où l'activation transitoire de Erk en présence de EGF (forte décroissance de sa phosphorylation généralement observée après 30 à 90 min) a été mise en évidence (Fan et al. 2007; Wang et al. 2009). Au contraire, lorsque EGF est immobilisé avec notre stratégie (interaction coiled-coil), la phosphorylation de Erk est intense pour au moins 5 h ce qui est en accord avec les résultats rapportés par Ito et al. pour les cellules A-431 (Ito et al. 2001), et par Fan *et al.* pour les cellules souches mésenchymateuses (MSC) (Fan et al. 2007). Outre son rôle connu sur la prolifération des HCE-2 (Wang et al. 2009), Erk peut également avoir

un rôle sur l'étalement cellulaire notamment sur les MSC (Fan et al. 2007). L'activation prolongée de Erk pourrait ainsi être directement liée à la fois à l'augmentation de la prolifération de cellules épithéliales et à leur étalement comme observé par d'autres (Klenkler et al. 2009).

La principale innovation de ce travail réside donc dans la stratégie utilisée pour immobiliser EGF à savoir l'interaction coiled-coil (Tripet et al. 1996). Outre les avantages connus de ce système (forte affinité et haute spécificité) (Chao et al. 1996), nous avons pu démontrer que l'immobilisation de protéines basée sur l'utilisation des coils présente de nombreux avantages comparés aux systèmes actuellement utilisés. Tout d'abord, l'activité biologique des protéines étiquetées coils n'est pas altérée (Boucher et al. 2008). Une interaction optimale entre EGF et son récepteur (Boucher et al. 2008; Kuhl and Griffith-Cima 1996) est possible en raison de la mobilité de EGF due à la longueur du motif coiled-coil et à la présence d'un bras espaceur entre la protéine et le coil. Enfin, la stratégie employée est séquentielle et polyvalente. Notre approche s'est donc inscrite dans la volonté de démontrer que l'immobilisation orientée de EGF via l'interaction coiled-coil est plus efficace que des stratégies de greffage aléatoire ou basées sur l'utilisation de protéines en solution et qu'elle présente de nombreux intérêts (polyvalente, facilité de mise en œuvre…) afin de promouvoir une réponse cellulaire. Le système coiled-coil est donc un système d'avenir pour le greffage orienté de protéines pour de futures applications en ingénierie tissulaire.

CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Le développement de substrats biologiques permettant de promouvoir la régénération de tissus ou d'organes est d'un intérêt primordial en ingénierie tissulaire. Pour ce faire, différents types de biomatériaux (PET, PDMS, PTFE…) peuvent être utilisés en tant que support mais en fonction de leurs caractéristiques et de l'application envisagée, il peut être nécessaire de modifier leurs propriétés de surface afin de favoriser la réponse cellulaire. La fixation de protéines est une des alternatives envisageables. Bien que les premières études visant à immobiliser des protéines se soient basées sur des méthodes de greffage non-orienté, ces stratégies ont rapidement été abandonnées en raison de leurs nombreux désavantages. Dans le cadre de cette thèse, une approche innovante ayant pour but l'immobilisation orientée du facteur de croissance de l'épiderme EGF sur un biomatériau (PET) a été mise au point. Pour ce faire, un système se basant sur l'affinité et la spécificité existant entre deux peptides complémentaires à savoir le E coil et le K coil a été utilisé. Tout d'abord, la production, la purification de Ecoil-EGF pleinement bioactif ainsi que son immobilisation à la surface de biocapteurs via l'interaction coiled-coil ont été effectuées (Boucher et al. 2008). Une fois le protocole de fixation du coil complémentaire (K coil) élaboré sur des surfaces de verre aminé, le Ecoil-EGF a été immobilisé et a alors favorisé l'adhésion et la phosphorylation des récepteurs de EGF des cellules A-431 (Boucher et al. 2009). Etant donné que le verre ne peut être utilisé dans la cadre d'une future utilisation *in vivo*, son remplacement par un biomatériau (PET) traité au plasma a démontré qu'il était possible de transposer la chimie développée sur du verre sur un biomatériau aminé et qu'il était possible d'immobiliser le Ecoil-EGF via l'interaction coiled-coil. L'impact de l'immobilisation de ce

facteur de croissance sur le comportement de cellules épithéliales de la cornée a permis de démontrer l'importance de l'immobilisation de protéines par une adhésion, une prolifération et une activation des voies de signalisation accrues en présence de EGF immobilisé ainsi qu'un étalement plus rapide de ces mêmes cellules.

Cette méthode présente l'avantage d'être facile dans sa mise en œuvre. En effet, il est très facile de générer des biomatériaux fonctionnalisés avec un peptide coil des jours, voire des semaines, avant et d'y immobiliser les protéines d'intérêt. Cependant, certaines étapes restent à optimiser. En effet, la concentration surfacique de Ecoil-EGF immobilisé sur le PET fonctionnalisé est 2,5 fois inférieure à celles obtenues sur les surfaces de verre. Etant donné que la méthodologie est strictement la même pour les deux surfaces utilisées (verre et PET) et que seule la concentration en amine primaire diffère, l'optimisation de cette étape devra être envisagée. L'utilisation d'un biomatériau présentant des fonctions amines primaires à leur surface tel que le chitosane (Demolliens et al. 2008; Ho et al. 2005; Nettles et al. 2002) ou l'utilisation d'un biomatériau traité au plasma enrichi en amines primaires tel que le PPE: N pourront être des solutions envisageables (Girard-Lauriault et al. 2009; Truica-Marasescu and Wertheimer 2008).

Dans le cadre de ce projet, l'immobilisation de Ecoil-EGF a permis d'induire la réponse de cellules épithéliales de cornée immortalisées. Afin de vérifier que le Ecoil-EGF permet de stimuler la réépithélisation de la cornée, il pourra être envisagé d'étudier l'effet du Ecoil-EGF immobilisé sur une lignée primaire de cellules épithéliales de cornée. Bien qu'il soit plus difficile de travailler avec ce type de lignée, des protocoles existant pourront servir de support quand à la méthode à utiliser pour l'isolement de ces cellules (Hainsworth 1991). Une attention particulière devra être portée au faible nombre de cellules pouvant être récupérées. La création d'un gradient de Ecoil-EGF à la surface du support choisi pourra servir à démontrer que les cellules sont

capables de migrer et de proliférer. En vue d'une future implantation *in vivo* de ces supports, il sera également nécessaire d'adapter le biomatériau utilisé ; des biomatériaux synthétiques tels que le chitosane (Yeh et al. 2009), le PDMS (Griffith et al. 2002) ou des supports d'origines naturelles tels que des matrices acellulaires pourraient être testés. L'utilisation de matrices acellulaires pourrait être une approche privilégiée en raison de leurs propriétés mécaniques et de leurs propriétés chimiques et physiologiques équivalentes à celles observées dans des cornées normales (Xu et al. 2008). Quelque soit le type de biomatériau choisi, ces supports devront posséder des propriétés similaires à savoir être translucide, perméable aux gaz, non toxique, non immunogène.

Le système coiled-coil pourra être utilisé afin d'immobiliser d'autres facteurs de croissance sur des biomatériaux étant donné que ce système est polyvalent. Ainsi, il sera aisé de produire d'autres facteurs de croissance étiquetés avec un peptide coil, tels que VEGF ou FGF, qui permetteront d'envisager différentes approches dans la réendothélisation de prothèses vasculaires. Dans le cadre de cette dernière application, il sera envisageable d'immobiliser du VEGF via l'interaction coiled-coil sur du PTFE (Lerouge et al. 2007) et d'étudier son effet sur le comportement de cellules endothéliales.

D'un point de vue fondamental, la compréhension des phénomènes résultant de l'interaction d'une cellule avec des protéines immobilisées pourra être approfondie et comparée aux données connues sur l'effet de ces mêmes protéines en solution. En effet, lorsqu'une cellule interagit avec une protéine immobilisée par l'intermédiaire de son récepteur, le complexe ligand/récepteur permet l'activation d'un certain nombre de voies de signalisation. Ce complexe ne pouvant être internalisé, un certain flou existe quand aux phénomènes sous-jacents se déroulant après l'activation des récepteurs. Un approfondissement des connaissances à ce sujet

pourrait permettre de répondre à quelques questions telles que : Le récepteur est-il internalisé et dégradé ? Y-a-t-il des phénomènes de répression en réponse à la suractivation du récepteur ? Quelles voies de signalisation sont privilégiées ? Quelle est la conséquence de la non-activation des voies de signalisation secondaire ? Des mécanismes de désensibilisation du récepteur sont-ils activés ? ...

BIBLIOGRAPHIE

Adams JE, Steinmann SP. 2007. Interposition arthroplasty using an acellular dermal matrix scaffold. Acta orthopaedica Belgica 73(3):319-26.

Aldridge BB, Saez-Rodriguez J, Muhlich JL, Sorger PK, Lauffenburger DA. 2009. Fuzzy logic analysis of kinase pathway crosstalk in TNF/EGF/insulin-induced signaling. PLoS computational biology 5(4):e1000340.

Alvarado D, Klein DE, Lemmon MA. 2009. ErbB2 resembles an autoinhibited invertebrate epidermal growth factor receptor. Nature 461(7261):287-91.

Aquavella JV, Qian Y, McCormick GJ, Palakuru JR. 2005. Keratoprosthesis: the Dohlman-Doane device. American journal of ophthalmology 140(6):1032-1038.

Arica MYV, Hasirci N. 1993. Permeability of PHEMA Membranes Prepared by Photoinitiation. Polymer International 32(2):177-182.

Arteaga CL. 2002. Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. Semin Oncol 29(5 Suppl 14):3-9.

Arteaga CL. 2006. EGF receptor mutations in lung cancer: from humans to mice and maybe back to humans. Cancer Cell 9(6):421-3.

Backer MV, Patel V, Jehning BT, Claffey KP, Backer JM. 2006. Surface immobilization of active vascular endothelial growth factor via a cysteine-containing tag. Biomaterials 27(31):5452-5458.

Baird A, Esch F, Mormede P, Ueno N, Ling N, Bohlen P, Ying SY, Wehrenberg WB, Guillemin R. 1986. Molecular characterization of fibroblast growth factor: distribution and biological activities in various tissues. Recent progress in hormone research 42:143-205.

Bakker D, van Blitterswijk CA, Hesseling SC, Koerten HK, Kuijpers W, Grote JJ. 1990. Biocompatibility of a polyether urethane, polypropylene oxide, and a polyether polyester copolymer. A qualitative and quantitative study of three alloplastic tympanic membrane materials in the rat middle ear. Journal of biomedical materials research 24(4):489-515.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 16(5):585-601.

Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G. 1996. All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. The Journal of biological chemistry 271(9):5251-7.

Beamson G, Briggs D. 1992. High Resolution XPS of Organic Polymers, the scienta ESCA300 database. Chichester: Wiley. 295 p.

Bell GI, Fong NM, Stempien MM, Wormsted MA, Caput D, Ku LL, Urdea MS, Rall LB, Sanchez-Pescador R. 1986. Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization. Nucleic Acids Research 14(21):8427-8446.

Berger B, Wilson DB, Wolf E, Tonchev T, Milla M, Kim PS. 1995. Predicting coiled coils by use of pairwise residue correlations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92(18):8259-63.

Bilitewski U. 2006. Protein-sensing assay formats and devices. Analytica chimica acta 568(1-2):232-47.

Bill HM, Knudsen B, Moores SL, Muthuswamy SK, Rao VR, Brugge JS, Miranti CK. 2004. Epidermal growth factor receptor-dependent regulation of integrin-mediated signaling and cell cycle entry in epithelial cells. Molecular and cellular biology 24(19):8586-99.

Bisson I, Kosinski M, Ruault S, Gupta B, Hilborn J, Wurm F, Frey P. 2002. Acrylic acid grafting and collagen immobilization on poly(ethylene terephthalate) surfaces for adherence and growth of human bladder smooth muscle cells. Biomaterials 23(15):3149-58.

Blackburn JM, Hart DJ. 2005. Fabrication of protein function microarrays for systems-oriented proteomic analysis. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 310:197-216.

Bosiers M, Deloose K, Verbist J, Schroe H, Lauwers G, Lansink W, Peeters P. 2006. Heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene vascular graft for femoropopliteal and femorocrural bypass grafting: 1-year results. Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter 43(2):313-8; discussion 318-9.

Boucher C, Liberelle B, Jolicoeur M, Durocher Y, De Crescenzo G. 2009. Epidermal Growth Factor Tethered through Coiled-Coil Interactions Induces Cell Surface Receptor Phosphorylation. Bioconjugate chemistry 20(8):1569-1577.

Boucher C, St-Laurent G, Jolicoeur M, Crescenzo GD, Durocher Y. 2010. Protein detection by Western blot via coiled-coil interactions. Analytical biochemistry 399(1):138-140.

Boucher C, St-Laurent G, Loignon M, Jolicoeur M, Crescenzo GD, Durocher Y. 2008. The Bioactivity and Receptor Affinity of Recombinant Tagged EGF Designed for Tissue

Engineering Applications Is Defined by the Nature and Position of the Tags. Tissue engineering. Part A 14(12):2069-2077.

Brem H, Piantadosi S, Burger PC, Walker M, Selker R, Vick NA, Black K, Sisti M, Brem S, Mohr G and others. 1995. Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group. Lancet 345(8956):1008-12.

Browning AC, Dua HS, Amoaku WM. 2008. The effects of growth factors on the proliferation and in vitro angiogenesis of human macular inner choroidal endothelial cells. The British journal of ophthalmology 92(7):1003-8.

Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S. 2003. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. Mol Cell 12(3):541-52.

Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV. 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. Trends in Cell Biology 11(2):82-8.

Cannon MJ, Williams AD, Wetzel R, Myszka DG. 2004. Kinetic analysis of beta-amyloid fibril elongation. Analytical biochemistry 328(1):67-75.

Cao Y, Zhang Q, Wang C, Zhu Y, Bai G. 2007. Preparation of novel immunomagnetic cellulose microspheres via cellulose binding domain-protein A linkage and its use for the isolation of interferon alpha-2b. Journal of chromatography. A 1149(2):228-35.

Cartwright L, Farhat WA, Sherman C, Chen J, Babyn P, Yeger H, Cheng HL. 2006. Dynamic contrast-enhanced MRI to quantify VEGF-enhanced tissue-engineered bladder graft

neovascularization: pilot study. Journal of biomedical materials research. Part A 77(2):390-5.

Cass B, Pham PL, Kamen A, Durocher Y. 2005. Purification of recombinant proteins from mammalian cell culture using a generic double-affinity chromatography scheme. Protein expression and purification 40(1):77-85.

Chai JK, Liang LM, Yang HM, Feng R, Yin HN, Li FY, Sheng ZY. 2007. Preparation of laser micropore porcine acellular dermal matrix for skin graft: an experimental study. Burns : journal of the International Society for Burn Injuries 33(6):719-25.

Chajra H, Rousseau CF, Cortial D, Ronziere MC, Herbage D, Mallein-Gerin F, Freyria AM. 2008. Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects. Bio-medical materials and engineering 18(1 Suppl):S33-45.

Chao H, Bautista DL, Litowski J, Irvin RT, Hodges RS. 1998. Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification. J chromatogr B 715(1):307-329.

Chao H, Houston ME, Jr., Grothe S, Kay CM, O'Connor-McCourt M, Irvin RT, Hodges RS. 1996. Kinetic study on the formation of a de novo designed heterodimeric coiled-coil: use of surface plasmon resonance to monitor the association and dissociation of polypeptide chains. Biochemistry 35(37):12175-12185.

Chen F, Yoo JJ, Atala A. 1999. Acellular collagen matrix as a possible "off the shelf" biomaterial for urethral repair. Urology 54(3):407-10.

Chen G, Ito Y. 2001. Gradient micropattern immobilization of EGF to investigate the effect of artificial juxtacrine stimulation. Biomaterials 22(18):2453-7.

Chen G, Ito Y, Imanishi Y. 1997. Photo-immobilization of epidermal growth factor enhances its mitogenic effect by artificial juxtacrine signaling. Biochimica et Biophysica Acta 1358(2):200-208.

Chen WW, Schoeberl B, Jasper PJ, Niepel M, Nielsen UB, Lauffenburger DA, Sorger PK. 2009. Input-output behavior of ErbB signaling pathways as revealed by a mass action model trained against dynamic data. Molecular systems biology 5:239.

Chenite A, Buschmann M, Wang D, Chaput C, Kandani N. 2001. Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. Carbohydrate Polymers 46(1):39-47.

Chiang CJ, Wang JY, Chen PT, Chao YP. 2009. Enhanced levan production using chitin-binding domain fused levansucrase immobilized on chitin beads. Applied Microbiology and Biotechnology 82(3):445-51.

Chirila TV. 2001. An overview of the development of artificial corneas with porous skirts and the use of PHEMA for such an application. Biomaterials 22(24):3311-7.

Chlupac J, Filova E, Bacakova L. 2009. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca 58 Suppl 2:S119-39.

Cho HS, Leahy DJ. 2002. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. Science 297(5585):1330-3.

Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW, Jr., Leahy DJ. 2003. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. Nature 421(6924):756-60.

Chollet C, Labrugere C, Durrieu MC. 2007. Impact of RGD peptide density grafted onto Poly(ethylene terephthalate) on MC3T3 cell attachment. Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference 2007:5123-6.

Chou CH, Cheng WT, Lin CC, Chang CH, Tsai CC, Lin FH. 2006. TGF-beta1 immobilized tri-co-polymer for articular cartilage tissue engineering. Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials 77(2):338-48.

Citri A, Harari D, Shohat G, Ramakrishnan P, Gan J, Lavi S, Eisenstein M, Kimchi A, Wallach D, Pietrokovski S and others. 2006. Hsp90 recognizes a common surface on client kinases. J Biol Chem 281(20):14361-9.

Citri A, Yarden Y. 2006. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. Nat Rev Mol Cell Biol 7(7):505-16.

Clayton AH, Walker F, Orchard SG, Henderson C, Fuchs D, Rothacker J, Nice EC, Burgess AW. 2005. Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-A multidimensional microscopy analysis. J Biol Chem 280(34):30392-9.

Coe AP, Askari JA, Kline AD, Robinson MK, Kirby H, Stephens PE, Humphries MJ. 2001. Generation of a minimal alpha5beta1 integrin-Fc fragment. Journal of Biological Chemistry 276(38):35854-35866.

Crick F. 1953. The Fourier transform of a coiled-coil. Acta Crystallographica 6(8-9):685-689.

Crombez M, Chevallier P, Gaudreault RC, Petitclerc E, Mantovani D, Laroche G. 2005. Improving arterial prosthesis neo-endothelialization: Application of a proactive VEGF construct onto PTFE surfaces. Biomaterials 26(35):7402-7409.

Curran JM, Chen R, Stokes R, Irvine E, Graham D, Gubbins E, Delaney D, Amro N, Sanedrin R, Jamil H and others. 2010. Nanoscale definition of substrate materials to direct human adult stem cells towards tissue specific populations. (1573-4838 (Electronic)):DOI : 10.1007/s10856-009-3976-x.

Das C, Mainwaring R, Langone JJ. 1985. Separation of complexes containing protein A and IgG or Fc gamma fragments by high-performance liquid chromatography. Analytical biochemistry 145(1):27-36.

De Crescenzo G, Boucher C, Durocher Y, Jolicoeur M. 2008. Kinetic characterization by surface plasmon resonance-based biosensors : principle and emerging trends. Cellular and Molecular Bioengineering 1(4):204-215.

De Crescenzo G, Grothe S, Lortie R, Debanne MT, O'Connor-McCourt M. 2000. Real-time kinetic studies on the interaction of transforming growth factor α with the epidermal growth factor receptor extracellular domain reveal a conformational change model. Biochemistry 39(31):9466-9476.

De Crescenzo G, Grothe S, Zwaagstra J, Tsang M, O'Connor-McCourt MD. 2001. Real-time monitoring of the interactions of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms with latency-associated protein and the ectodomains of the TGF-beta type II and III receptors reveals different kinetic models and stoichiometries of binding. Journal of Biological Chemistry 276(32):29632-29643.

De Crescenzo G, Litowski JR, Hodges RS, O'Connor-McCourt MD. 2003a. Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. Biochemistry 42(6):1754-1763.

De Crescenzo G, Pham PL, Durocher Y, Chao H, O'Connor-McCourt MD. 2004. Enhancement of the antagonistic potency of transforming growth factor-beta receptor extracellular domains by coiled coil-induced homo- and heterodimerization. J Biol Chem 279(25):26013-26018.

De Crescenzo G, Pham PL, Durocher Y, O'Connor-McCourt MD. 2003b. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding to the extracellular domain of the type II TGF-beta receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding. Journal of Molecular Biology 328(5):1173-1183.

De Mol Van Otterloo JC, Van Bockel JH, Ponfoort ED, Briet E, Brommer EJ, Hermans J, Daha MR. 1991. Systemic effects of collagen-impregnated aortoiliac Dacron vascular prostheses on platelet activation and fibrin formation. Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter 14(1):59-66.

DeLong SA, Gobin AS, West JL. 2005. Covalent immobilization of RGDS on hydrogel surfaces to direct cell alignment and migration. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society 109(1-3):139-48.

Demolliens A, Boucher C, Durocher Y, Jolicoeur M, Buschmann MD, De Crescenzo G. 2008. Tyrosinase-catalyzed synthesis of a universal coil-chitosan bioconjugate for protein immobilization. Bioconjugate chemistry 19(9):1849-54.

den Hertog J, Ostman A, Bohmer FD. 2008. Protein tyrosine phosphatases: regulatory mechanisms. The FEBS journal 275(5):831-47.

Di Guglielmo GM, Baass PC, Ou WJ, Posner BI, Bergeron JJ. 1994. Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. The EMBO journal 13(18):4269-77.

Dillon GP, Yu X, Sridharan A, Ranieri JP, Bellamkonda RV. 1998. The influence of physical structure and charge on neurite extension in a 3D hydrogel scaffold. Journal of biomaterials science. Polymer edition 9(10):1049-69.

Doane MG, Dohlman CH, Bearse G. 1996. Fabrication of a keratoprosthesis. Cornea 15(2):179-84.

Durocher Y, Perret S, Kamen A. 2002. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. Nucleic Acids Research 30(2):E9/1-E9/9.

El-Sabban ME, El-Khoury H, Hamdan-Khalil R, Sindet-Pedersen S, Bazarbachi A. 2007. Xenogenic bone matrix extracts induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Regenerative medicine 2(4):383-90.

Elloumi I, Kobayashi R, Funabashi H, Mie M, Kobatake E. 2006. Construction of epidermal growth factor fusion protein with cell adhesive activity. Biomaterials 27(18):3451-58.

Fan VH, Tamama K, Au A, Littrell R, Richardson LB, Wright JW, Wells A, Griffith LG. 2007. Tethered epidermal growth factor provides a survival advantage to mesenchymal stem cells. Stem cells 25(5):1241-51.

Faucheux N, Schweiss R, Lutzow K, Werner C, Groth T. 2004. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. Biomaterials 25(14):2721-30.

Favia P, Stendardo MV, d'Agostino R. 1996. Selective grafting of amine groups on polyethylene by means of NH3-H2 RF glow discharges. Plasmas and Polymers 1(2):91-112.

Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, Lemmon MA. 2003. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. Molecular Cell 11(2):507-517.

Ferrara N, Henzel WJ. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochemical and biophysical research communications 161(2):851-8.

Filion D, Lavertu M, Buschmann MD. 2007. Ionization and solubility of chitosan solutions related to thermosensitive chitosan/glycerol-phosphate systems. Biomacromolecules 8(10):3224-34.

Fischer OM, Hart S, Gschwind A, Ullrich A. 2003. EGFR signal transactivation in cancer cells. Biochemical Society transactions 31(Pt 6):1203-8.

French AR, Lauffenburger DA. 1996. Intracellular receptor/ligand sorting based on endosomal retention components. Biotechnology and Bioengineering 51(3):281-97.

French AR, Lauffenburger DA. 1997. Controlling receptor/ligand trafficking: effects of cellular and molecular properties on endosomal sorting. Annals of biomedical engineering 25(4):690-707.

French AR, Sudlow GP, Wiley HS, Lauffenburger DA. 1994. Postendocytic trafficking of epidermal growth factor-receptor complexes is mediated through saturable and specific endosomal interactions. The Journal of biological chemistry 269(22):15749-55.

French AR, Tadaki DK, Niyogi SK, Lauffenburger DA. 1995. Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. The Journal of biological chemistry 270(9):4334-40.

Gaissmaier C, Fritz J, Krackhardt T, Flesch I, Aicher WK, Ashammakhi N. 2005. Effect of human platelet supernatant on proliferation and matrix synthesis of human articular chondrocytes in monolayer and three-dimensional alginate cultures. Biomaterials 26(14):1953-60.

Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Kofler M, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW and others. 2003. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. Mol Cell 11(2):495-505.

Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA and others. 2002. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. Cell 110(6):763-73.

Gauvreau V, Chevallier P, Vallieres K, Petitclerc E, Gaudreault RC, Laroche G. 2004. Engineering surfaces for bioconjugation: developing strategies and quantifying the extent of the reactions. Bioconjugate chemistry 15(5):1146-56.

George M, Abraham TE. 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society 114(1):1-14.

Girard-Lauriault PL, Truica-Marasescu F, Petit A, Wang HT, Desjardins P, Antoniou J, Mwale F, Wertheimer MR. 2009. Adhesion of Human U937 Monocytes to Nitrogen-Rich Organic Thin Films: Novel Insights into the Mechanism of Cellular Adhesion. Macromolecular bioscience.

Girardeaux C, Zammatteo M, Art M, Guillon B, Pireaux JJ, Caudano R. 1996. Amination of poly(ethylene-terephthalate) polymer surface for biochemical applications. Plasmas and Polymers 1(4):327-346.

Gobin AS, West JL. 2003. Effects of Epidermal Growth Factor on Fibroblast Migration through Biomimetic Hydrogels. Biotechnology Progress 19(6):1781-1785.

Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. 1987. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. Endocrine reviews 8(2):95-114.

Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L. 1986. Fibroblast growth factor. Molecular and cellular endocrinology 46(3):187-204.

Goward CR, Murphy JP, Atkinson T, Barstow DA. 1990. Expression and purification of a truncated recombinant streptococcal protein G. The Biochemical journal 267(1):171-7.

Grassi ED, Oegema TR, Tranquillo RT. 2002. Fibrin as an alternative biopolymer to type-I collagen for the fabrication of a media equivalent. Journal of biomedical materials research 60(4):607-12.

Gray JL, Kang SS, Zenni GC, Kim DU, Kim PI, Burgess WH, Drohan W, Winkles JA, Haudenschild CC, Greisler HP. 1994. FGF-1 affixation stimulates ePTFE endothelialization without intimal hyperplasia. The Journal of surgical research 57(5):596-612.

Griffith M, Hakim M, Shimmura S, Watsky MA, Li F, Carlsson D, Doillon CJ, Nakamura M, Suuronen E, Shinozaki N and others. 2002. Artificial human corneas: scaffolds for transplantation and host regeneration. Cornea 21(7 Suppl):S54-61.

Grudinkin PS, Zenin VV, Kropotov AV, Dorosh VN, Nikolsky NN. 2007. EGF-induced apoptosis in A431 cells is dependent on STAT1, but not on STAT3. European journal of cell biology 86(10):591-603.

Guidoin R, Chakfe N, Maurel S, How T, Batt M, Marois M, Gosselin C. 1993. Expanded polytetrafluoroethylene arterial prostheses in humans: histopathological study of 298 surgically excised grafts. Biomaterials 14(9):678-93.

Guidoin R, Marois Y, Deng X, Chakfe N, Marois M, Roy R, King MW, Douville Y. 1996. Can collagen impregnated polyester arterial prostheses be recommended as small diameter blood conduits? ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992) 42(6):974-83.

Gunatillake PA, Adhikari R. 2003. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. European cells & materials 5:1-16; discussion 16.

Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL, 3rd. 1994. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91(17):8132-6.

Haddour N, Cosnier S, Gondran C. 2005. Electrogeneration of a poly(pyrrole)-NTA chelator film for a reversible oriented immobilization of histidine-tagged proteins. Journal of the American Chemical Society 127(16):5752-3.

Hadjizadeh A, Doillon CJ, Vermette P. 2007. Bioactive polymer fibers to direct endothelial cell growth in a three-dimensional environment. Biomacromolecules 8(3):864-73.

Hainsworth S. 1991. Modified culture method for human corneal epithelial cells Methods in Cell Science 13(1):45-48.

Hannachi Imen E, Nakamura M, Mie M, Kobatake E. 2009. Construction of multifunctional proteins for tissue engineering: epidermal growth factor with collagen binding and cell adhesive activities. Journal of biotechnology 139(1):19-25.

Harbury PB, Zhang T, Kim PS, Alber T. 1993. A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. Science (New York, N.Y.) 262(5138):1401-7.

Harper CA. 2000. Modern Plastics Handbook1Modern Plastics. New-York.

Hart DS, Gehrke SH. 2007. Thermally associating polypeptides designed for drug delivery produced by genetically engineered cells. Journal of pharmaceutical sciences 96(3):484-516.

Hicks CR, Fitton JH, Chirila TV, Crawford GJ, Constable IJ. 1997. Keratoprostheses: advancing toward a true artificial cornea. Survey of ophthalmology 42(2):175-89.

Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddes JC, Klagsbrun M. 1991. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. Science (New York, N.Y.) 251(4996):936-9.

Higashiyama S, Lau K, Besner GE, Abraham JA, Klagsbrun M. 1992. Structure of heparin-binding EGF-like growth factor. Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein. The Journal of biological chemistry 267(9):6205-12.

Ho MH, Wang DM, Hsieh HJ, Liu HC, Hsien TY, Lai JY, Hou LT. 2005. Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds. Biomaterials 26(16):3197-206.

Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E, Sun J, Chevrier A, Shive MS, Buschmann MD. 2005. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume 87(12):2671-2686.

Holland TA, Tabata Y, Mikos AG. 2003. In vitro release of transforming growth factor-beta 1 from gelatin microparticles encapsulated in biodegradable, injectable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society 91(3):299-313.

Holland TA, Tabata Y, Mikos AG. 2005. Dual growth factor delivery from degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society 101(1-3):111-25.

Holland TA, Tessmar JK, Tabata Y, Mikos AG. 2004. Transforming growth factor-beta 1 release from oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels in conditions that model the

cartilage wound healing environment. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society 94(1):101-14.

Huang Y, Onyeri S, Siewe M, Moshfeghian A, Madihally SV. 2005. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. Biomaterials 26(36):7616-27.

Hubbard SR, Miller WT. 2007. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. Curr Opin Cell Biol 19(2):117-23.

Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE, Friedman HS, Kwatra MM, Bigner SH, Bigner DD. 1990. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87(11):4207-11.

Hung CT, Lima EG, Mauck RL, Takai E, LeRoux MA, Lu HH, Stark RG, Guo XE, Ateshian GA. 2003. Anatomically shaped osteochondral constructs for articular cartilage repair. Journal of biomechanics 36(12):1853-64.

Hunter T. 2000. Signaling--2000 and beyond. Cell 100(1):113-27.

Hunter T, Cooper JA. 1981. Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells. Cell 24(3):741-752.

Huo Y, Qiu WY, Pan Q, Yao YF, Xing K, Lou MF. 2009. Reactive oxygen species (ROS) are essential mediators in epidermal growth factor (EGF)-stimulated corneal epithelial cell proliferation, adhesion, migration, and wound healing. Experimental eye research 89(6):876-86.

Hwang S, Ahn J, Lee S, Lee TG, Haam S, Lee K, Ahn IS, Jung JK. 2004. Evaluation of cellulose-binding domain fused to a lipase for the lipase immobilization. Biotechnology Letters 26(7):603-5.

Hynes RO. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell 110(6):673-87.

Hynes RO. 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. Science (New York, N.Y.) 326(5957):1216-9.

Ichinose J, Morimatsu M, Yanagida T, Sako Y. 2006. Covalent immobilization of epidermal growth factor molecules for single-molecule imaging analysis of intracellular signaling. Biomaterials 27(18):3343-3350.

Ito A, Mase A, Takizawa Y, Shinkai M, Honda H, Hata K, Ueda M, Kobayashi T. 2003. Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering. Journal of bioscience and bioengineering 95(2):196-9.

Ito Y. 1998. Tissue engineering by immobilized growth factors. Mat sci eng C-Bio S 6(4):267-274.

Ito Y, Chen G, Imanishi Y. 1996a. Photoimmobilization of insulin onto polystyrene dishes for protein-free cell culture. Biotechnology Progress 12(5):700-702.

Ito Y, Chen G, Imanishi Y, Morooka T, Nishida E, Okabayashi Y, Kasuga M. 2001. Differential control of cellular gene expression by diffusible and non-diffusible EGF. Journal of biochemistry 129(5):733-7.

Ito Y, Hasuda H, Terai H, Kitajima T. 2005. Culture of human umbilical vein endothelial cells on immobilized vascular endothelial growth factor. Journal of Biomedical Materials Research - Part A 74(4):659-665.

Ito Y, Li JS, Takahashi T, Imanishi Y, Okabayashi Y, Kido Y, Kasuga M. 1997. Enhancement of the mitogenic effect by artificial juxtacrine stimulation using immobilized EGF. Journal of biochemistry 121(3):514-20.

Ito Y, Zheng J, Imanishi Y, Yonezawa K, Kasuga M. 1996b. Protein-free cell culture on an artificial substrate with covalently immobilized insulin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(8):3598-3601.

Jaumotte-Thelen S, Dozet-Dupont I, Marchand-Brynaert J, Schneider YJ. 1996. Covalent grafting of fibronectin and asialofetuin at surface of poly(ethylene terephthalate) track-etched membranes improves adhesion but not differentiation of rat hepatocytes. Journal of biomedical materials research 32(4):569-82.

Jenniskens YM, Koevoet W, de Bart AC, Weinans H, Jahr H, Verhaar JA, DeGroot J, van Osch GJ. 2006. Biochemical and functional modulation of the cartilage collagen network by IGF1, TGFbeta2 and FGF2. Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society 14(11):1136-46.

Jervis EJ, Guarna MM, Doheny JG, Haynes CA, Kilburn DG. 2005. Dynamic localization and persistent stimulation of factor-dependent cells by a stem cell factor / cellulose binding domain fusion protein. Biotechnology and bioengineering 91(3):314-24.

Jiao YP, Cui FZ. 2007. Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering. Biomedical materials (Bristol, England) 2(4):R24-37.

Johnsson B, Lofas S, Lindquist G. 1991. Immobilization of proteins to a carboxymethyldextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. Analytical biochemistry 198(2):268-77.

Jones RB, Gordus A, Krall JA, MacBeath G. 2006. A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. Nature 439(7073):168-74.

Jung HJ, Park K, Kim JJ, Lee JH, Han KO, Han DK. 2008. Effect of RGD-immobilized dual-pore poly(L-lactic acid) scaffolds on chondrocyte proliferation and extracellular matrix production. Artificial organs 32(12):981-9.

Jungbluth AA, Stockert E, Huang HJ, Collins VP, Coplan K, Iversen K, Kolb D, Johns TJ, Scott AM, Gullick WJ and others. 2003. A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100(2):639-44.

Kappert K, Peters KG, Bohmer FD, Ostman A. 2005. Tyrosine phosphatases in vessel wall signaling. Cardiovascular research 65(3):587-98.

Kapur TA, Shoichet MS. 2004. Immobilized concentration gradients of nerve growth factor guide neurite outgrowth. Journal of Biomedical Materials Research - Part A 68(2):235-243.

Kato K, Sato H, Iwata H. 2005. Immobilization of histidine-tagged recombinant proteins onto micropatterned surfaces for cell-based functional assays. Langmuir 21(16):7071-7075.

Kaushansky A, Gordus A, Budnik BA, Lane WS, Rush J, MacBeath G. 2008. System-wide investigation of ErbB4 reveals 19 sites of Tyr phosphorylation that are unusually selective in their recruitment properties. Chemistry & biology 15(8):808-17.

Kay DG, Lai WH, Uchihashi M, Khan MN, Posner BI, Bergeron JJ. 1986. Epidermal growth factor receptor kinase translocation and activation in vivo. The Journal of biological chemistry 261(18):8473-80.

Kim SH, Akaike T. 2007. Epidermal growth factor signaling for matrix-dependent cell proliferation and differentiation in primary cultured hepatocytes. Tissue Eng 13(3):601-9.

Kim SH, Kiick KL. 2007. Heparin-mimetic sulfated peptides with modulated affinities for heparin-binding peptides and growth factors. Peptides 28(11):2125-36.

Kitajima T, Sakuragi M, Hasuda H, Ozu T, Ito Y. 2009. A chimeric epidermal growth factor with fibrin affinity promotes repair of injured keratinocyte sheets. Acta biomaterialia.

Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, Hynes NE, Andrews GC, Sela M, Yarden Y. 1999. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(9):4995-5000.

Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y. 2000. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. Adv Cancer Res 77:25-79.

Klenkler B, Sheardown H. 2004. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. Experimental eye research 79(5):677-88.

Klenkler BJ, Chen H, Chen Y, Brook MA, Sheardown H. 2008. A high-density PEG interfacial layer alters the response to an EGF tethered polydimethylsiloxane surface. Journal of biomaterials science. Polymer edition 19(11):1411-24.

Klenkler BJ, Dwivedi D, West-Mays JA, Sheardown H. 2009. Corneal epithelial cell adhesion and growth on EGF-modified aminated PDMS. Journal of biomedical materials research. Part A.

Klenkler BJ, Griffith M, Becerril C, West-Mays JA, Sheardown H. 2005. EGF-grafted PDMS surfaces in artificial cornea applications. Biomaterials 26(35):7286-96.

Kohn WD, Hodges RS. 1998. De novo design of alpha-helical coiled coils and bundles: models for the development of protein-design principles. Trends in Biotechnology 16(9):379-389.

Kuhl PR, Griffith-Cima LG. 1996. Tethered epidermal growth factor as a paradigm for growth factor-induced stimulation from the solid phase. Nature Medicine 2(9):1022-1027.

Lai WF, Lin MC. 2009. Nucleic acid delivery with chitosan and its derivatives. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society 134(3):158-68.

Lai WH, Cameron PH, Doherty JJ, 2nd, Posner BI, Bergeron JJ. 1989a. Ligand-mediated autophosphorylation activity of the epidermal growth factor receptor during internalization. The Journal of cell biology 109(6 Pt 1):2751-60.

Lai WH, Cameron PH, Wada I, Doherty JJ, 2nd, Kay DG, Posner BI, Bergeron JJ. 1989b. Ligand-mediated internalization, recycling, and downregulation of the epidermal growth factor receptor in vivo. The Journal of cell biology 109(6 Pt 1):2741-9.

Langefeld S, Kompa S, Redbrake C, Brenman K, Kirchhof B, Schrage NF. 2000. Aachen keratoprosthesis as temporary implant for combined vitreoretinal surgery and keratoplasty: report on 10 clinical applications. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie 238(9):722-6.

Langer R, Vacanti JP. 1993. Tissue engineering. Science (New York, N.Y.) 260(5110):920-6.

Latkany R, Tsuk A, Sheu MS, Loh IH, Trinkaus-Randall V. 1997. Plasma surface modification of artificial corneas for optimal epithelialization. Journal of biomedical materials research 36(1):29-37.

Laurencin CT, El-Amin SF, Ibim SE, Willoughby DA, Attawia M, Allcock HR, Ambrosio AA. 1996. A highly porous 3-dimensional polyphosphazene polymer matrix for skeletal tissue regeneration. Journal of biomedical materials research 30(2):133-8.

Layman H, Sacasa M, Murphy AE, Murphy AM, Pham SM, Andreopoulos FM. 2008. Co-delivery of FGF-2 and G-CSF from gelatin-based hydrogels as angiogenic therapy in a murine critical limb ischemic model. Acta biomaterialia.

Lazzara MJ, Lauffenburger DA. 2009. Quantitative modeling perspectives on the ErbB system of cell regulatory processes. Experimental cell research 315(4):717-25.

Le PU, Lenferink AE, Pinard M, Baardsnes J, Massie B, O'Connor-McCourt MD. 2009. Escherichia coli expression and refolding of E/K-coil-tagged EGF generates fully bioactive EGF for diverse applications. Protein expression and purification 64(2):108-17.

Lee CH, Singla A, Lee Y. 2001. Biomedical applications of collagen. International journal of pharmaceutics 221(1-2):1-22.

Lee H, Park TG. 2002. Preparation and characterization of mono-PEGylated epidermal growth factor: evaluation of in vitro biologic activity. Pharmaceutical Research 19(6):845-51.

Lee JY, Yoon CS, Chung IY, Lee YS, Lee EK. 2000. Scale-up process for expression and renaturation of recombinant human epidermal growth factor from Escherichia coli inclusion bodies. Biotechnology and Applied Biochemistry 31(3):245-248.

Lee KB, Yoon KR, Woo SI, Choi IS. 2003. Surface modification of poly(glycolic acid) (PGA) for biomedical applications. Journal of pharmaceutical sciences 92(5):933-7.

Lee KY, Mooney DJ. 2001. Hydrogels for tissue engineering. Chemical reviews 101(7):1869-79.

Lee SD, Hsiue GH, Kao CY, Chang PC. 1996. Artificial cornea: surface modification of silicone rubber membrane by graft polymerization of pHEMA via glow discharge. Biomaterials 17(6):587-95.

Legeais JM, Renard G. 1998. A second generation of artificial cornea (Biokpro II). Biomaterials 19(16):1517-22.

Lemmon MA. 2009. Ligand-induced ErbB receptor dimerization. Exp Cell Res 315(4):638-48.

Lerouge S, Major A, Girault-Lauriault PL, Raymond MA, Laplante P, Soulez G, Mwale F, Wertheimer MR, Hebert MJ. 2007. Nitrogen-rich coatings for promoting healing around stent-grafts after endovascular aneurysm repair. Biomaterials 28(6):1209-17.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 246(4935):1306-1309.

Li S, Wang Q, Wang Y, Chen X, Wang Z. 2009. PLC-gamma1 and Rac1 coregulate EGF-induced cytoskeleton remodeling and cell migration. Molecular endocrinology (Baltimore, Md.) 23(6):901-13.

Liberelle B, Banquy X, Giasson S. 2008. Stability of silanols and grafted alkylsilane monolayers on plasma-activated mica surfaces. Langmuir 24(7):3280-3288.

Liberelle B, Giasson S. 2007. Chemical end-grafting of homogeneous polystyrene monolayers on mica and silica surfaces. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids 23(18):9263-70.

Lippiello L. 2003. Glucosamine and chondroitin sulfate: biological response modifiers of chondrocytes under simulated conditions of joint stress. Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society 11(5):335-42.

Little L, Healy KE, Schaffer D. 2008. Engineering biomaterials for synthetic neural stem cell microenvironments. Chemical reviews 108(5):1787-96.

Liu B, Huang L, Sihlbom C, Burlingame A, Marks JD. 2002. Towards proteome-wide production of monoclonal antibody by phage display. Journal of molecular biology 315(5):1063-73.

Liu P, Sudhaharan T, Koh RM, Hwang LC, Ahmed S, Maruyama IN, Wohland T. 2007. Investigation of the dimerization of proteins from the epidermal growth factor receptor family by single wavelength fluorescence cross-correlation spectroscopy. Biophys J 93(2):684-98.

Lloyd AW, Faragher RG, Denyer SP. 2001. Ocular biomaterials and implants. Biomaterials 22(8):769-85.

Lobb RR, Harper JW, Fett JW. 1986. Purification of heparin-binding growth factors. Analytical biochemistry 154(1):1-14.

Long JL, Tranquillo RT. 2003. Elastic fiber production in cardiovascular tissue-equivalents. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology 22(4):339-50.

Long MW. 1992. Blood cell cytoadhesion molecules. Experimental hematology 20(3):288-301.

Lue RY, Chen GY, Zhu Q, Lesaicherre ML, Yao SQ. 2004. Site-specific immobilization of biotinylated proteins for protein microarray analysis. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 264:85-100.

Lupas A. 1996. Coiled coils: New structures and new functions. Trends in Biochemical Sciences 21(10):375-382.

Maciag T, Mehlman T, Friesel R, Schreiber AB. 1984. Heparin binds endothelial cell growth factor, the principal endothelial cell mitogen in bovine brain. Science (New York, N.Y.) 225(4665):932-5.

Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. 2007. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. Advanced drug delivery reviews 59(4-5):207-33.

Maldonado BA, Furcht LT. 1995. Epidermal growth factor stimulates integrin-mediated cell migration of cultured human corneal epithelial cells on fibronectin and arginine-glycine-aspartic acid peptide. Investigative ophthalmology & visual science 36(10):2120-6.

Manning BD, Cantley LC. 2002. Hitting the target: emerging technologies in the search for kinase substrates. Science's STKE : signal transduction knowledge environment 2002(162):pe49.

Markowicz M, Heitland A, Steffens GC, Pallua N. 2005. Effects of modified collagen matrices on human umbilical vein endothelial cells. The International journal of artificial organs 28(12):1251-8.

Marois Y, Chakfe N, Guidoin R, Duhamel RC, Roy R, Marois M, King MW, Douville Y. 1996. An albumin-coated polyester arterial graft: in vivo assessment of biocompatibility and healing characteristics. Biomaterials 17(1):3-14.

Marshall CJ. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. Cell 80(2):179-85.

Martin-Fernandez M, Clarke DT, Tobin MJ, Jones SV, Jones GR. 2002. Preformed oligomeric epidermal growth factor receptors undergo an ectodomain structure change during signaling. Biophys J 82(5):2415-27.

Massia SP, Stark J, Letbetter DS. 2000. Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading. Biomaterials 21(22):2253-61.

Masuda K, Pfister BE, Sah RL, Thonar EJ. 2006. Osteogenic protein-1 promotes the formation of tissue-engineered cartilage using the alginate-recovered-chondrocyte method. Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society 14(4):384-91.

Matsumoto T, Claesson-Welsh L. 2001. VEGF receptor signal transduction. Science's STKE 2001(112):RE21.

McInnes C, Wang J, Al Moustafa AE, Yansouni C, O'Connor-McCourt M, Sykes BD. 1998. Structure-based minimization of transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) through NMR analysis of the receptor-bound ligand. Design, solution structure, and activity of TGF-alpha 8-50. J Biol Chem 273(42):27357-63.

Merrett K, Griffith CM, Deslandes Y, Pleizier G, Dube MA, Sheardown H. 2003. Interactions of corneal cells with transforming growth factor beta 2-modified poly dimethyl siloxane surfaces. Journal of biomedical materials research. Part A 67(3):981-93.

Miura K, Doura H, Aizawa T, Tada H, Seno M, Yamada H, Kawano K. 2002. Solution structure of betacellulin, a new member of EGF-family ligands. Biochem Biophys Res Commun 294(5):1040-6.

Moriki T, Maruyama H, Maruyama IN. 2001. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. J Mol Biol 311(5):1011-26.

Mroczkowski B. 1991. Expression of epidermal growth factor precursor cDNA in animal cells. Methods in Enzymology 198:175-185.

Mroczkowski B, Reich M, Whittaker J, Bell GI, Cohen S. 1988. Expression of human epidermal growth factor precursor cDNA in transfected mouse NIH 3T3 cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85(1):126-130.

Muller KM, Arndt KM, Alber T. 2000. Protein fusions to coiled-coil domains. Methods in Enzymology 328:261-82.

Muzzarelli RAA. 1993. Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animals and patients. Carbohydrate Polymers 20(1):7-16.

Mwale F, Wang HT, Nelea V, Luo L, Antoniou J, Wertheimer MR. 2006. The effect of glow discharge plasma surface modification of polymers on the osteogenic differentiation of committed human mesenchymal stem cells. Biomaterials 27(10):2258-64.

Myung D, Duhamel PE, Cochran JR, Noolandi J, Ta CN, Frank CW. 2008. Development of hydrogel-based keratoprostheses: a materials perspective. Biotechnology Progress 24(3):735-41.

Nakaji-Hirabayashi T, Kato K, Arima Y, Iwata H. 2007. Oriented immobilization of epidermal growth factor onto culture substrates for the selective expansion of neural stem cells. Biomaterials 28(24):3517-29.

Nakaji-Hirabayashi T, Kato K, Iwata H. 2009. Surface-anchoring of spontaneously dimerized epidermal growth factor for highly selective expansion of neural stem cells. Bioconjugate chemistry 20(1):102-10.

Nakajima M, Ishimuro T, Kato K, Ko IK, Hirata I, Arima Y, Iwata H. 2007. Combinatorial protein display for the cell-based screening of biomaterials that direct neural stem cell differentiation. Biomaterials 28(6):1048-60.

Neidert MR, Lee ES, Oegema TR, Tranquillo RT. 2002. Enhanced fibrin remodeling in vitro with TGF-beta1, insulin and plasmin for improved tissue-equivalents. Biomaterials 23(17):3717-31.

Nettles DL, Elder SH, Gilbert JA. 2002. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering. Tissue Engineering 8(6):1009-1016.

Nielsen UB, Cardone MH, Sinskey AJ, MacBeath G, Sorger PK. 2003. Profiling receptor tyrosine kinase activation by using Ab microarrays. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100(16):9330-5.

Nishida T, Tanaka H, Nakagawa S, Sasabe T, Awata T, Manabe R. 1984. Fibronectin synthesis by the rabbit cornea: effects of mouse epidermal growth factor and cyclic AMP analogs. Japanese journal of ophthalmology 28(2):196-202.

Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. 1998. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. The American journal of pathology 152(6):1445-52.

O'Connor-McCourt MD, De CG, Lortie R, Lenferink AE, Grothe S. 1998. QUANTITATIVE ANALYSIS OF BIOSPECIFIC INTERACTIONS - 11. The Analysis of surface plasmon resonance-based biosensor data using numerical integration. Harwood Academic Publishers N/A(1):175-190.

Ogi H, Motohisa K, Hatanaka K, Ohmori T, Hirao M, Nishiyama M. 2007. Concentration dependence of IgG-protein A affinity studied by wireless-electrodeless QCM. Biosensors & bioelectronics 22(12):3238-42.

Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M and others. 2002. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. Cell 110(6):775-787.

Ogiwara K, Nagaoka M, Cho CS, Akaike T. 2005. Construction of a novel extracellular matrix using a new genetically engineered epidermal growth factor fused to IgG-Fc. Biotechnology Letters 27(20):1633-1637.

Ogiwara K, Nagaoka M, Cho CS, Akaike T. 2006. Effect of photo-immobilization of epidermal growth factor on the cellular behaviors. Biochemical and biophysical research communications 345(1):255-9.

Ostman A, Bohmer FD. 2001. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. Trends in cell biology 11(6):258-66.

Palsson B, Hubbell JA, Plonsey R, Bronzino JD. 2003. Tissue Engineering. Boca Raton: CRC Press.

Pariente JL, Villars F, Conort P. 2005. [Biological materials]. Progres en urologie : journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie 15(5):964-70.

Peters K, Unger RE, Gatti AM, Sabbioni E, Tsaryk R, Kirkpatrick CJ. 2007. Metallic nanoparticles exhibit paradoxical effects on oxidative stress and pro-inflammatory response in endothelial cells in vitro. International journal of immunopathology and pharmacology 20(4):685-95.

Pham PL, Perret S, Cass B, Carpentier E, St-Laurent G, Bisson L, Kamen A, Durocher Y. 2005. Transient gene expression in HEK293 cells: peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis. Biotechnology and Bioengineering 90(3):332-344.

Pierschbacher MD, Ruoslahti E. 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. Nature 309(5963):30-3.

Platt MO, Roman AJ, Wells A, Lauffenburger DA, Griffith LG. 2009. Sustained epidermal growth factor receptor levels and activation by tethered ligand binding enhances osteogenic differentiation of multi-potent marrow stromal cells. Journal of Cellular Physiology 221(2):307-317.

Plowman GD, Green JM, McDonald VL, Neubauer MG, Disteche CM, Todaro GJ, Shoyab M. 1990a. The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor-inhibitory activity. Molecular and Cellular Biology 10(5):1969-81.

Plowman GD, Whitney GS, Neubauer MG, Green JM, McDonald VL, Todaro GJ, Shoyab M. 1990b. Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87(13):4905-9.

Prasitsilp M, Jenwithisuk R, Kongsuwan K, Damrongchai N, Watts P. 2000. Cellular responses to chitosan in vitro: the importance of deacetylation. Journal of Materials Science. Materials in Medicine 11(12):773-778.

Puskas JE, Chen Y. 2004. Biomedical application of commercial polymers and novel polyisobutylene-based thermoplastic elastomers for soft tissue replacement. Biomacromolecules 5(4):1141-54.

Rahfoth B, Weisser J, Sternkopf F, Aigner T, von der Mark K, Brauer R. 1998. Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits. Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society 6(1):50-65.

Ratner BD. 1995. Surface modification of polymers: chemical, biological and surface analytical challenges. Biosensors & bioelectronics 10(9-10):797-804.

Ribatti D. 2004. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor in angiogenesis : a historical review. British journal of Haematology 128:303-309.

Risbud M, Bhonde M, Bhonde R. 2001. Chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogel does not activate macrophages: potentials for transplantation applications. Cell Transplant 10(2):195-202.

Rusmini F, Zhong Z, Feijen J. 2007. Protein immobilization strategies for protein biochips. Biomacromolecules 8(6):1775-89.

Saez-Rodriguez J, Alexopoulos LG, Epperlein J, Samaga R, Lauffenburger DA, Klamt S, Sorger PK. 2009. Discrete logic modelling as a means to link protein signalling networks with functional analysis of mammalian signal transduction. Molecular systems biology 5:331.

Samaga R, Saez-Rodriguez J, Alexopoulos LG, Sorger PK, Klamt S. 2009. The logic of EGFR/ErbB signaling: theoretical properties and analysis of high-throughput data. PLoS computational biology 5(8):e1000438.

Sasada R, Ono Y, Taniyama Y, Shing Y, Folkman J, Igarashi K. 1993. Cloning and expression of cDNA encoding human betacellulin, a new member of the EGF family. Biochemical and biophysical research communications 190(3):1173-9.

Saso K, Moehren G, Higashi K, Hoek JB. 1997. Differential inhibition of epidermal growth factor signaling pathways in rat hepatocytes by long-term ethanol treatment. Gastroenterology 112(6):2073-88.

Schlessinger J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell 103(2):211-25.

Schlessinger J. 2002. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. Cell 110(6):669-672.

Schlessinger J. 2004. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. Science 306(5701):1506-7.

Schoeberl B, Eichler-Jonsson C, Gilles ED, Muller G. 2002. Computational modeling of the dynamics of the MAP kinase cascade activated by surface and internalized EGF receptors. Nature biotechnology 20(4):370-5.

Schoeberl B, Pace E, Howard S, Garantcharova V, Kudla A, Sorger PK, Nielsen UB. 2006. A data-driven computational model of the ErbB receptor signaling network. Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference 1:53-4.

Schultz G, Rotatori DS, Clark W. 1991. EGF and TGF-alpha in wound healing and repair. Journal of Cellular Biochemistry 45(4):346-352.

Schulze WX, Deng L, Mann M. 2005. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. Molecular systems biology 1:2005 0008.

Seeherman H, Wozney JM. 2005. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. Cytokine & growth factor reviews 16(3):329-45.

Seno M, Tada H, Kosaka M, Sasada R, Igarashi K, Shing Y, Folkman J, Ueda M, Yamada H. 1996. Human betacellulin, a member of the EGF family dominantly expressed in pancreas and small intestine, is fully active in a monomeric form. Growth factors (Chur, Switzerland) 13(3-4):181-91.

Shang J, Geva E. 2007. Computational study of a single surface-immobilized two-stranded coiled-coil polypeptide. The journal of physical chemistry. B 111(16):4178-88.

Sharon JL, Puleo DA. 2008. Immobilization of glycoproteins, such as VEGF, on biodegradable substrates. Acta biomaterialia 4(4):1016-23.

Shen YH, Shoichet MS, Radisic M. 2008. Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells. Acta biomaterialia 4(3):477-89.

Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M. 1984. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. Science (New York, N.Y.) 223(4642):1296-9.

Shoyab M, Plowman GD, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ. 1989. Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. Science (New York, N.Y.) 243(4894 Pt 1):1074-6.

Sizeland AM, Burgess AW. 1992. Anti-sense transforming growth factor alpha oligonucleotides inhibit autocrine stimulated proliferation of a colon carcinoma cell line. Mol Biol Cell 3(11):1235-43.

Squires CH, Childs J, Eisenberg SP, Polverini PJ, Sommer A. 1988. Production and characterization of human basic fibroblast growth factor from Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry 263(31):16297-302.

Steffens GC, Yao C, Prevel P, Markowicz M, Schenck P, Noah EM, Pallua N. 2004. Modulation of angiogenic potential of collagen matrices by covalent incorporation of heparin and loading with vascular endothelial growth factor. Tissue engineering 10(9-10):1502-9.

Stefonek TJ, Masters KS. 2007. Immobilized gradients of epidermal growth factor promote accelerated and directed keratinocyte migration. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 15(6):847-55.

Strachan L, Murison JG, Prestidge RL, Sleeman MA, Watson JD, Kumble KD. 2001. Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily. J Biol Chem 276(21):18265-71.

Sweeney DF, Xie RZ, O'Leary DJ, Vannas A, Odell R, Schindhelm K, Cheng HY, Steele JG, Holden BA. 1998. Nutritional requirements of the corneal epithelium and anterior stroma: clinical findings. Investigative ophthalmology & visual science 39(2):284-91.

Tao RH, Maruyama IN. 2008. All EGF(ErbB) receptors have preformed homo- and heterodimeric structures in living cells. J Cell Sci 121(Pt 19):3207-17.

Thomson RC, Wake MC, Yaszemski MJ, Mikos AG. 1995. Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs. Advances in Polymer Science, Biopolymers II 122:245-274.

Tilakaratne HK, Hunter SK, Andracki ME, Benda JA, Rodgers VG. 2007. Characterizing short-term release and neovascularization potential of multi-protein growth supplement delivered via alginate hollow fiber devices. Biomaterials 28(1):89-98.

Tinazli A, Tang J, Valiokas R, Picuric S, Lata S, Piehler J, Liedberg B, Tampe R. 2005. High-affinity chelator thiols for switchable and oriented immobilization of histidine-tagged proteins: a generic platform for protein chip technologies. Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany) 11(18):5249-59.

Tomizawa Y. 1995. Vascular prostheses for aortocoronary bypass grafting: a review. Artificial organs 19(1):39-45.

Toyoda H, Komurasaki T, Ikeda Y, Yoshimoto M, Morimoto S. 1995a. Molecular cloning of mouse epiregulin, a novel epidermal growth factor-related protein, expressed in the early stage of development. FEBS letters 377(3):403-7.

Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D, Takayama Y, Isobe T, Okuyama T, Hanada K. 1995b. Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. The Journal of biological chemistry 270(13):7495-500.

Traverse S, Seedorf K, Paterson H, Marshall CJ, Cohen P, Ullrich A. 1994. EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. Current biology : CB 4(8):694-701.

Tripet B, De Crescenzo G, Grothe S, O'Connor-McCourt M, Hodges RS. 2002. Kinetic analysis of the interactions between troponin C and the C-terminal troponin I regulatory region and validation of a new peptide delivery/capture system used for surface plasmon resonance. Journal of Molecular Biology 323(2):345-362.

Tripet B, Yu L, Bautista DL, Wong WY, Irvin RT, Hodges RS. 1996. Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain off the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. Protein engineering 9(11):1029-42.

Truica-Marasescu F, Wertheimer MR. 2008. Nitrogen-rich plasma-polymer films for biomedical applications. Plasma Processes and Polymers 5(1):44-57.

Turkova J. 1999. Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function. Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications 722(1-2):11-31.

Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J and others. 1984. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. Nature 309(5967):418-25.

Ullrich A, Schlessinger J. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. Cell 61(2):203-12.

Ushiro H, Cohen S. 1980. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. J Biol Chem 255(18):8363-5.

Vallieres K, Petitclerc E, Laroche G. 2007. Covalent grafting of fibronectin onto plasma-treated PTFE: influence of the conjugation strategy on fibronectin biological activity. Macromolecular bioscience 7(5):738-45.

Varum KM, Ottoy MH, Smidsrod O. 1994. Water-Solubility of Partially N-Acetylated Chitosans as a Function of Ph - Effect of Chemical-Composition and Depolymerization. Carbohydrate Polymers 25(2):65-70.

Verbelen C, Gruber HJ, Dufrene YF. 2007. The NTA-His6 bond is strong enough for AFM single-molecular recognition studies. Journal of molecular recognition : JMR 20(6):490-4.

Vijayasekaran S, Chirila TV, Robertson TA, Lou X, Fitton JH, Hicks CR, Constable IJ. 2000. Calcification of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogel sponges implanted in the rabbit cornea: a 3-month study. Journal of biomaterials science. Polymer edition 11(6):599-615.

Vinall RL, Lo SH, Reddi AH. 2002. Regulation of articular chondrocyte phenotype by bone morphogenetic protein 7, interleukin 1, and cellular context is dependent on the cytoskeleton. Experimental cell research 272(1):32-44.

Virag JA, Rolle ML, Reece J, Hardouin S, Feigl EO, Murry CE. 2007. Fibroblast growth factor-2 regulates myocardial infarct repair: effects on cell proliferation, scar contraction, and ventricular function. The American journal of pathology 171(5):1431-40.

Wada I, Lai WH, Posner BI, Bergeron JJ. 1992. Association of the tyrosine phosphorylated epidermal growth factor receptor with a 55-kD tyrosine phosphorylated protein at the cell surface and in endosomes. The Journal of cell biology 116(2):321-30.

Wang Q, Bohn PW. 2006. Surface composition gradients of immobilized cell signaling molecules. Epidermal growth factor on gold. Thin Solid Films 513(1-2):338-346.

Wang Z, Yang H, Zhang F, Pan Z, Capo-Aponte J, Reinach PS. 2009. Dependence of EGF-induced increases in corneal epithelial proliferation and migration on GSK-3 inactivation. Investigative ophthalmology & visual science 50(10):4828-35.

Warren CM, Landgraf R. 2006. Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. Cell Signal 18(7):923-33.

Watanabe T, Shintani A, Nakata M, Shing Y, Folkman J, Igarashi K, Sasada R. 1994. Recombinant human betacellulin. Molecular structure, biological activities, and receptor interaction. The Journal of biological chemistry 269(13):9966-73.

Wegner GJ, Lee HJ, Marriott G, Corn RM. 2003. Fabrication of histidine-tagged fusion protein arrays for surface plasmon resonance imaging studies of protein-protein and protein-DNA interactions. Analytical chemistry 75(18):4740-6.

Wettero J, Askendal A, Bengtsson T, Tengvall P. 2002. On the binding of complement to solid artificial surfaces in vitro. Biomaterials 23(4):981-991.

Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. 2001. Corneal blindness: a global perspective. Bulletin of the World Health Organization 79(3):214-21.

Wilchek M, Bayer EA, Livnah O. 2006. Essentials of biorecognition: the (strept)avidin-biotin system as a model for protein-protein and protein-ligand interaction. Immunology letters 103(1):27-32.

Willcox PJ, Reinhart-King CA, Lahr SJ, DeGrado WF, Hammer DA. 2005. Dynamic heterodimer-functionalized surfaces for endothelial cell adhesion. Biomaterials 26(23):4757-4766.

Williams DF. 2008. On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials 29(20):2941-53.

Williams DF. 2009. On the nature of biomaterials. Biomaterials 30(30):5897-909.

Wilson DS, Nock S. 2002. Functional protein microarrays. Current opinion in chemical biology 6(1):81-5.

Wilson KJ, Gilmore JL, Foley J, Lemmon MA, Riese DJ, 2nd. 2009. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. Pharmacol Ther 122(1):1-8.

Wolf E, Kim PS, Berger B. 1997. MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils. Protein science : a publication of the Protein Society 6(6):1179-89.

Wong CS, Sgarioto M, Owida AA, Yang W, Rosenfeldt FL, Morsi YS. 2006. Polyethyleneterephthalate provides superior retention of endothelial cells during shear stress compared to polytetrafluoroethylene and pericardium. Heart, lung & circulation 15(6):371-7.

Wu ZM, Zhang XG, Zheng C, Li CX, Zhang SM, Dong RN, Yu DM. 2009. Disulfide-crosslinked chitosan hydrogel for cell viability and controlled protein release. European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences 37(3-4):198-206.

Xu KP, Dartt DA, Yu FS. 2002. EGF-induced ERK phosphorylation independent of PKC isozymes in human corneal epithelial cells. Investigative ophthalmology & visual science 43(12):3673-9.

Xu YG, Xu YS, Huang C, Feng Y, Li Y, Wang W. 2008. Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate. Molecular vision 14:2180-9.

Yarden Y, Harari I, Schlessinger J. 1985. Purification of an active EGF receptor kinase with monoclonal antireceptor antibodies. The Journal of biological chemistry 260(1):315-9.

Yarden Y, Sliwkowski MX. 2001. Untangling the ErbB signalling network. Nat Rev Mol Cell Biol 2(2):127-37.

Yeh LK, Chen YH, Chiu CS, Hu FR, Young TH, Wang IJ. 2009. The phenotype of bovine corneal epithelial cells on chitosan membrane. Journal of biomedical materials research. Part A 90(1):18-26.

Yoon MY, Fisher JP. 2006. Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering Application. In: Francis CT, editor. The Biomedical engineering handbook : Tissue engineering and artificial organs. 3rd ed ed. Boca Raton, FL.

Zakrzewska M, Marcinkowska E, Wiedlocha A. 2008. FGF-1: from biology through engineering to potential medical applications. Critical reviews in clinical laboratory sciences 45(1):91-135.

Zdrahala RJ, Zdrahala IJ. 1999. Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future. Journal of biomaterials applications 14(1):67-90.

Zeng Y, Pinard M, Jaime J, Bourget L, Uyen Le P, O'Connor-McCourt MD, Gilbert R, Massie B. 2008. A ligand-pseudoreceptor system based on de novo designed peptides for the generation of adenoviral vectors with altered tropism. The journal of gene medicine 10(4):355-67.

Zhang K, Diehl MR, Tirrell DA. 2005. Artificial polypeptide scaffold for protein immobilization. Journal of the American Chemical Society 127(29):10136-10137.

Zhang SQ, Tsiaras WG, Araki T, Wen G, Minichiello L, Klein R, Neel BG. 2002. Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. Molecular and Cellular Biology 22(12):4062-72.

Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J. 2006. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. Cell 125(6):1137-49.

Zhen G, Eggli V, Voros J, Zammaretti P, Textor M, Glockshuber R, Kuennemann E. 2004. Immobilization of the enzyme beta-lactamase on biotin-derivatized poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol)-coated sensor chips: a study on oriented attachment and surface activity by enzyme kinetics and in situ optical sensing. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids 20(24):10464-73.

Zhou Z, Liu X, Liu Q, Liu L. 2009. Evaluation of the potential cytotoxicity of metals associated with implanted biomaterials (I). Preparative biochemistry & biotechnology 39(1):81-91.

Zhu AP, Zhao F, Fang N. 2008. Regulation of vascular smooth muscle cells on poly(ethylene terephthalate) film by O-carboxymethylchitosan surface immobilization. Journal of biomedical materials research. Part A 86(2):467-76.

Zieske JD, Takahashi H, Hutcheon AE, Dalbone AC. 2000. Activation of epidermal growth factor receptor during corneal epithelial migration. Investigative ophthalmology & visual science 41(6):1346-55.

Zittermann SI, Issekutz AC. 2006. Basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) potentiates leukocyte recruitment to inflammation by enhancing endothelial adhesion molecule expression. The American journal of pathology 168(3):835-46.

ANNEXE 1 – DETECTION DE PROTEINES PAR WESTERN BLOT VIA L'INTERACTION COILED-COIL

Présentation de l'article

Cette section reprend l'article intitulé "**Protein detection by western blot via coiled-coil interactions"** qui a été publié en 2010 dans la revue *Analytical Biochemistry* (Vol. 399, No. 1, p.138-140).

La détection de protéines par Western blot s'effectue généralement par des anticorps reconnaissant la protéine ou une étiquette qui lui est adjointe. Dans cet article, une nouvelle méthode de détection de protéines basée sur l'utilisation du système Ecoil-Kcoil est proposée. La détection de la protéine EGF étiquetée par le K coil, utilisée comme système modèle, a été effectuée par une alcaline phosphatase sécrétée étiquetée par le E coil (SeAP-Ecoil) ou le E coil biotinylé (Ecoil-biotin). Après avoir produit et purifié la SeAP-Ecoil, il a été démontré par résonance plasmonique de surface que cette protéine interagissait de manière stable avec le K coil. Il a ensuite pu être mis en évidence que le Ecoil-biotin est plus spécifique que la SeAP-Ecoil. Finalement, il a été démontré que notre approche était aussi sensible que d'autres systèmes actuellement utilisés dans la littérature (Ni-NTA-HRP, anti-his-HRP ou anti-EGF). Par conséquent, nos résultats indiquent que le système Ecoil-Kcoil est une bonne alternative aux stratégies existantes pour détecter des protéines par Western blot.

Protein detection by Western blot via coiled-coil interactions

Cyril Boucher[1,2], Gilles St-Laurent[1], Mario Jolicoeur[2], Gregory De Crescenzo[2], Yves Durocher[1*]*

[1]Animal Cell Technology Group, Bioprocess Center, Biotechnology Research Institute, National Research Council Canada, 6100 avenue Royalmount, Montréal (Qc) Canada H4P 2R2

[2]Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB), Bio-P[2] Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (Qc), Canada H3C 3A7

*Corresponding authors at equal contribution:

Yves Durocher, PhD

Tel. :001 514 496-6192

Fax. 001 514 496-6785

yves.durocher@cnrc-nrc.gc.ca

Gregory De Crescenzo, PhD

Tel. : 001 514 340-4711 (#7428)

Fax : 001 514 340-2990

gregory.decrescenzo@polymtl.ca

Abstract

We propose an approach for the detection of proteins by Western blot, which takes advantage of the high affinity interaction occurring between two *de novo*-designed peptides, the E and K coils. As a model system, K coil-tagged epidermal growth factor (EGF) was revealed with secreted alkaline phosphatase (SeAP) tagged with E coil as well as with biotinylated E coil. In that respect, we first produced, purified SeAP-Ecoil and verified its ability to interact with K coil peptides by surface plasmon resonance biosensing. We demonstrated that protein detection with Ecoil-biotin was more specific than with SeAP-Ecoil. We then showed that our approach is as sensitive as conventional detection strategies relying on Ni-NTA-HRP, anti-his-HRP or anti-EGF. Altogether, our results indicate that the E/K coiled-coil system is a good alternative for protein detection by Western blot.

Keywords

Western blot, E/K coiled-coil system, affinity tag, chemiluminescence

Introduction

E and K coils are two peptides that have been *de novo* designed to form a parallel heterodimeric coiled-coil complex (De Crescenzo et al. 2003a; Tripet et al. 1996). Each peptide is composed of a seven amino-acid motif that is repeated 5 times (E: $[EVSALEK]_5$; K: $[KVSALKE]_5$) that comprises both hydrophobic (V and L) and charged residues (E or K) at precise positions to stabilize the coiled-coil structure (Figure A.1a) while increasing specificity (De Crescenzo et al. 2003a).

This coiled-coil system has already been demonstrated to be an excellent capture/dimerization tool for various applications. These include the stable capture of fully bioactive proteins on biosensor (Le et al. 2009; Pham et al. 2005) and cell culture-compatible surfaces (Nakaji-Hirabayashi et al. 2009) or virus pili (Le et al. 2009), artificial dimerization of growth factors (Nakaji-Hirabayashi et al. 2009) or receptor ectodomains (Chao et al. 1998) for improved activity. Based on the high specificity of the E/K interaction and the possibility to vary E/K stability by varying the length of one of the coil peptides, the E/K dimer has also been proposed as a good alternative for coil-tagged proteins purification (Chao et al. 1998; Tripet et al. 1996).

In this note, we report another potential application for the E/K system, i.e., the revelation of coil-tagged proteins by Western blotting via E/K interactions. The feasibility of this approach was assessed by chemiluminescence detection using two E coil entities: SeAP-Ecoil and Ecoil-biotin. In that respect, we have demonstrated that detection with biotinylated E coil was more

specific and sensitive than with E coil-tagged SeAP, and as sensitive as antibody-mediated detection. This approach thus represents a good alternative for Western blot applications.

Material and Methods

Chemicals and Reagents

Coil peptides were chemically synthesized (De Crescenzo et al. 2003a). Surface plasmon resonance (SPR) experiments were performed with a Biacore T100, CM5 sensorchips, thiol coupling kit, all from GE Healthcare (Baie d'Urfe, Qc).

Plasmids

The pTT5-Kcoil-EGF vector was previously described (Boucher et al. 2008). pTTSH8Q1-Ecoil vector, coding for SeAP-Ecoil, was constructed by in-frame ligation of an E coil DNA sequence at the *XbaI* and *AgeI* sites of pTTSH8Q1 (Cass et al. 2005) (Figure A.1b).

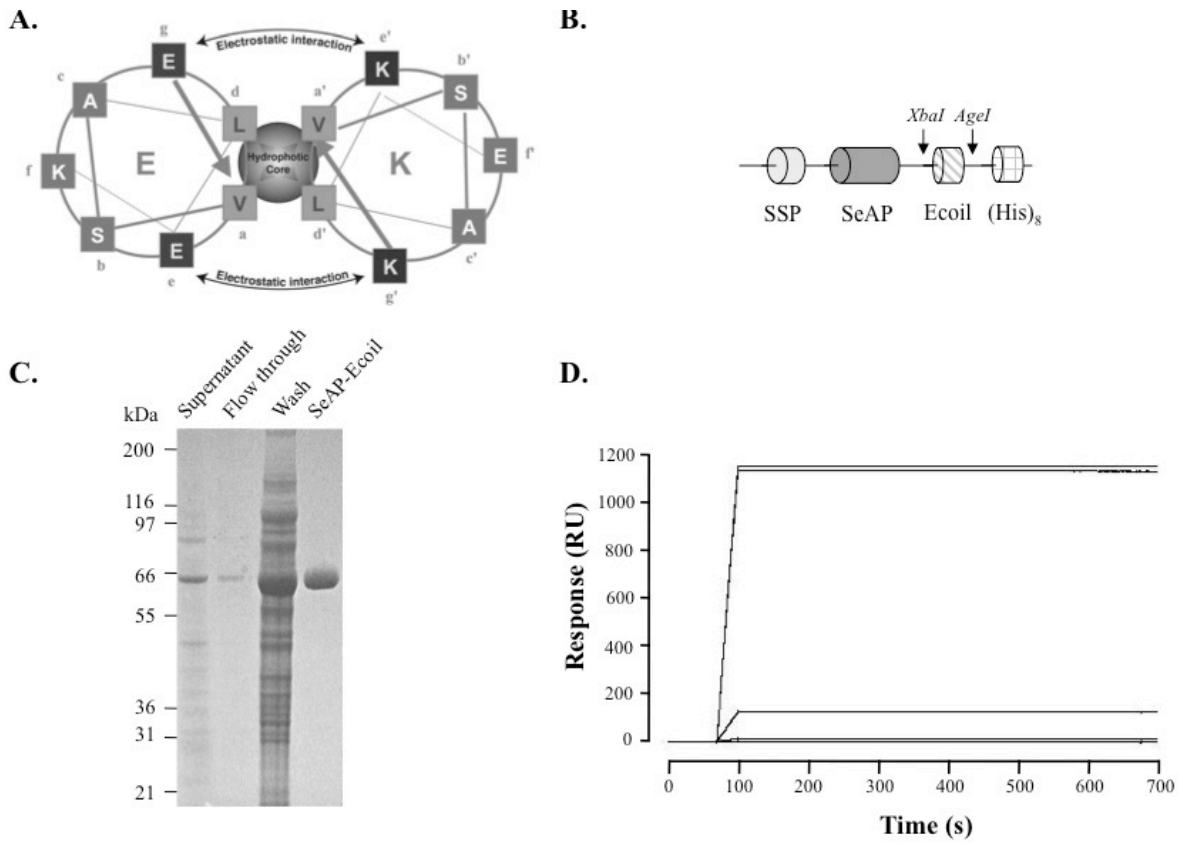

Figure A.1 : Representation, purification and capture of SeAP-Ecoil via coiled-coil interactions.

A: Helical wheel representation of the E/K interactions; B: Schematic of the SeAP construct with an in-frame E coil peptide and poly-histidine tag on its C-terminus; C: SDS-PAGE analysis (Coomassie-blue-stained) of SeAP-Ecoil purified by IMAC; D: Control-corrected sensorgrams corresponding to SeAP-Ecoil capture via E/K coiled-coil interactions.

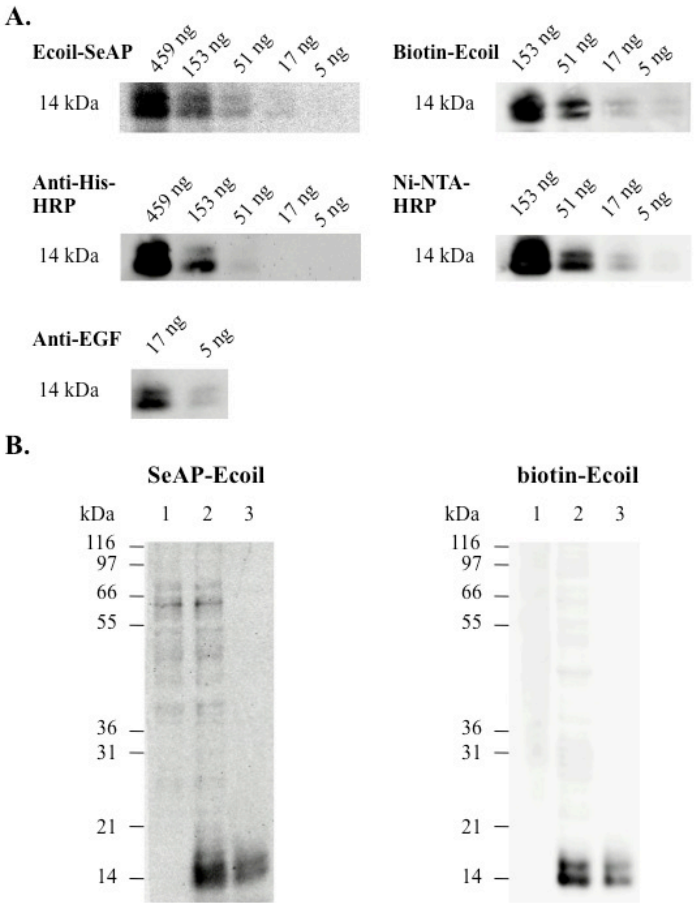

Figure A.2 : Sensitivity and specificity of protein detection via coiled-coil interactions.

A. Decreasing amounts of Kcoil-EGF (14 kDa) ranging from 459 ng to 5 ng were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and detected by chemiluminescence following incubation with various probes: SeAP-Ecoil (620 ng/mL); Ecoil-biotin (200 ng/mL); anti-His-HRP (2 mg/ml); Ni-NTA-HRP (1/5000) and anti-EGF (1 mg/ml). The signal-to-noise ratio for the 17 ng deposit, as calculated from the integrated luminescent signal, was of: 1,7 (SeAP-Ecoil); 2,4 (Ecoil-biotin); 1,2 (anti-His-HRP); 4,1 (Ni-NTA-HRP); 8,9 (anti-EGF). Detection of Kcoil-EGF diluted in cell lysate and detected with SeAP-Ecoil (F) or Ecoil-biotin (G). Lanes 1), cell lysate alone; lanes 2), cell lysate containing 153 ng Kcoil-EGF; lanes 3), 153 ng Kcoil-EGF alone.

Surface Plasmon Resonance assay

SPR experiments were conducted at 25°C using HBS-T (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.05% Tween 20) for sample dilution and as running buffer. Cysteine-labelled K coil peptides were covalently immobilized (1000 RUs) onto CM5 sensor chip surfaces as previously described (De Crescenzo et al. 2003b). SeAP-Ecoil was injected twice at 1 nM, 10 nM and 100 nM for 30 s at a flow rate of 50 µL/min. Regeneration of the sensorchip (i.e. removal of SeAP-Ecoil) was performed by 2 pulses of guanidium hydrochloride (5 M, 50 µL, 100 µl/min).

SDS-PAGE and Western blot analyses

Cellular lysate was obtained from 293-6E after extraction using 300 µl lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Thesit, 0.5% sodium deoxycholate) per 2 X 10^6 cells and elimination of insoluble material by centrifugation. Samples (Kcoil-EGF with/without cellular lysate) were mixed 3:1 (v:v) with 4X NuPage sample buffer (Invitrogen) containing 50 mM DTT and heated to 70°C for 10 min. Electrophoresis was performed using 4–12% Bis-Tris NuPage gels (Invitrogen) at 200 volts in MES buffer. For Western blots, proteins were transferred to a 0.2 µm Protran nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell) using Tris–glycine buffer for 1 h at 300 mA. The membranes were incubated for 30 min in blocking reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), and then probed either with SeAP-Ecoil and revealed with CDP-Star kit

(Roche Diagnostics), with C-terminally biotinylated E coil (Ecoil-biotin) followed by streptavidin-HRP (Sigma–Aldrich), with anti-his-HRP (Sigma–Aldrich), Ni-NTA-HRP (Clontech, Mountain View, CA) or anti-EGF (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) followed by anti-mouse-HRP antibody, all for 1 h at room temperature. HRP-based detection was done using BM Chemiluminescence Blotting Substrate (Roche Diagnostics) and luminescence was captured with a Kodak Digital Science Image Station 440cf (Eastman Kodak, NY).

Results

Production of SeAP-Ecoil (Figure A.1b) was performed by transient transfection of 293-6E cells cultured in serum free medium (500 mL). Thanks to a $(His)_8$ tag at its C-terminus, the secreted protein was purified by IMAC. Its purity is shown in Figure A.1c.

In order to verify that SeAP-Ecoil can be used for Western blot analysis, SeAP-Ecoil binding to K coil peptide was first studied by surface plasmon resonance (SPR). K coil peptide harbouring a cysteine residue at its N-terminus was covalently immobilized on a CM5 biosensor surface (1000 RUs, Resonance Units). SeAP-Ecoil was then injected at 3 different concentrations (1 nM, 10 nM and 100 nM) on K coil-functionalized and mock surfaces, resulting in the net accumulation of 13, 130 and 1170 RUs of SeAP-Ecoil, respectively (Figure A.1d). Almost no dissociation was observed during the dissociation phase within each sensorgram, indicating that the interaction was highly stable.

To verify if the E/K coil system is sensitive enough to be used for detection by Western blot, decreasing amounts of Kcoil-EGF ranging from 459 ng to 5 ng were resolved by SDS-PAGE and transferred on a nitrocellulose membrane. The blot was then revealed by incubation with SeAP-Ecoil or Ecoil-biotin (Figure A.2a), and the signal was compared to those related to the use of an anti-His-HRP monoclonal antibody, a Ni-NTA-HRP or an anti-EGF monoclonal antibody (Figure A.2a). SeAP-Ecoil and Ni-NTA-HRP allowed for the detection of 17 ng of Kcoil-EGF whereas Ecoil-biotin (followed by Streptavidin-HRP) and anti-EGF (followed by anti-mouse IgG-HRP) were 3 times more sensitive, allowing for the detection of 5 ng Kcoil-EGF. The anti-His-HRP antibody was the least sensitive since at least 51 ng of Kcoil-EGF were needed to get a signal. These results thus show that protein detection via coiled-coil interaction is comparable to other antibody- or Ni-NTA-based detection systems recognizing natural (EGF) or artificial (poly-His) epitopes.

In addition to sensitivity, another critical aspect for Western blot application is the specificity. To assess it, SeAP-Ecoil and Ecoil-biotin were used to detect Kcoil-EGF that had been diluted in 293-6E cellular extracts (Figure A.2b). While a 14 kDa band corresponding to Kcoil-EGF was observed following incubation with SeAP-Ecoil, the signal ratio between Kcoil-EGF and other non-specific bands was weak (Figure A.2b, SeAP-Ecoil, lane 1). Consequently, SeAP-Ecoil is not practical for detecting Kcoil-tagged proteins in complex mixtures by Western blot. In contrast, the signal-to-noise ratio obtained with Ecoil-biotin was much higher (Figure A.2b, Ecoil-biotin) as the 14 kDa Kcoil-EGF band was predominant when resolved in the presence of a cellular protein background (Figure A.2b, Ecoil-biotin, lane 2). Altogether, these results demonstrate that Ecoil-biotin is a useful, sensitive and specific probe for protein detection via coiled-coil interactions by Western blot analyses.

Discussion

Because of the high stability of the coiled-coil interaction, E and K coil peptides can be used as fusion partners for the oriented immobilization of proteins on biosensor surfaces for kinetic studies (Chao et al. 1996; De Crescenzo et al. 2004) or onto biomaterials for tissue engineering applications (Boucher et al. 2009; Demolliens et al. 2008). The E/K coiled-coil system has also been proposed as an interesting tool for protein purification (Tripet et al. 1996). We have here demonstrated its potential for the detection of coil-tagged proteins by Western blot. Two E coil probes were tested for this purpose. The first one is based on the use of a coil-tagged SeAP, an alkaline phosphatase that can be used in conjunction with a chemiluminescent substrate (CDP-star), for a one-step detection of K coil proteins. We have first produced and purified SeAP-Ecoil and demonstrated that it bound stably to K coil peptides (Figure A.1d). Kcoil-EGF detection by Western blot using SeAP-Ecoil or Ecoil-biotin was then compared to conventional detection using antibodies (anti-his-HRP, anti-EGF); or Ni-NTA-HRP. The His tag was selected as it is the most commonly used for purification and, in many cases, for subsequent detection. Furthermore, in almost all the studies taking advantage of the coiled-coil dimerizing technology, proteins had been coil-tagged only or coil- and His-tagged.

While SeAP-Ecoil allowed for the detection of Kcoil-EGF with high sensitivity, we were not able to reduce non-specific interactions with cellular proteins. This non-specificity likely resulted from the SeAP moiety since, in contrast, Ecoil-biotin was shown to be significantly more specific. Altogether, we have demonstrated that our coiled-coil system is a good alternative to detect proteins by Western blot. Since our original approach relied on the use of Ecoil-biotin followed by Streptavidin-HRP, the development of an Ecoil-HRP probe could lead to further

improvement of our strategy, i.e., by revealing Western blot membranes in a single incubation step.

Acknowledgement

This work was supported by the Canada Research Chairs on Protein-enhanced Biomaterials (GDC), in Applied Metabolic Engineering (MJ), by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (GDC, MJ). This is an NRC publication number 52736.

References

Boucher C, Liberelle B, Jolicoeur M, Durocher Y, De Crescenzo G. 2009. Epidermal Growth Factor Tethered through Coiled-Coil Interactions Induces Cell Surface Receptor Phosphorylation. Bioconjugate chemistry 20(8):1569-1577.

Boucher C, St-Laurent G, Loignon M, Jolicoeur M, Crescenzo GD, Durocher Y. 2008. The Bioactivity and Receptor Affinity of Recombinant Tagged EGF Designed for Tissue Engineering Applications Is Defined by the Nature and Position of the Tags. Tissue engineering. Part A 14(12):2069-2077.

Cass B, Pham PL, Kamen A, Durocher Y. 2005. Purification of recombinant proteins from mammalian cell culture using a generic double-affinity chromatography scheme. Protein expression and purification 40(1):77-85.

Chao H, Bautista DL, Litowski J, Irvin RT, Hodges RS. 1998. Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification. J chromatogr B 715(1):307-329.

Chao H, Houston ME, Jr., Grothe S, Kay CM, O'Connor-McCourt M, Irvin RT, Hodges RS. 1996. Kinetic study on the formation of a de novo designed heterodimeric coiled-coil: use of surface plasmon resonance to monitor the association and dissociation of polypeptide chains. Biochemistry 35(37):12175-12185.

De Crescenzo G, Litowski JR, Hodges RS, O'Connor-McCourt MD. 2003a. Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. Biochemistry 42(6):1754-1763.

De Crescenzo G, Pham PL, Durocher Y, Chao H, O'Connor-McCourt MD. 2004. Enhancement of the antagonistic potency of transforming growth factor-beta receptor extracellular domains by coiled coil-induced homo- and heterodimerization. J Biol Chem 279(25):26013-26018.

De Crescenzo G, Pham PL, Durocher Y, O'Connor-McCourt MD. 2003b. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding to the extracellular domain of the type II TGF-beta receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding. Journal of Molecular Biology 328(5):1173-1183.

Demolliens A, Boucher C, Durocher Y, Jolicoeur M, Buschmann MD, De Crescenzo G. 2008. Tyrosinase-catalyzed synthesis of a universal coil-chitosan bioconjugate for protein immobilization. Bioconjugate chemistry 19(9):1849-54.

Durocher Y, Perret S, Kamen A. 2002. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. Nucleic Acids Research 30(2):E9/1-E9/9.

Le PU, Lenferink AEG, Pinard M, Baardsnes J, Massie B, O'Connor-McCourt MD. 2009. Escherichia coli expression and refolding of E/K-coil-tagged EGF generates fully bioactive EGF for diverse applications. Protein expression and purification 64(2):108-117.

Nakaji-Hirabayashi T, Kato K, Iwata H. 2009. Surface-anchoring of spontaneously dimerized epidermal growth factor for highly selective expansion of neural stem cells. Bioconjugate chemistry 20(1):102-10.

Pham PL, Perret S, Cass B, Carpentier E, St-Laurent G, Bisson L, Kamen A, Durocher Y. 2005. Transient gene expression in HEK293 cells: peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis. Biotechnology and Bioengineering 90(3):332-344.

Tom R, Bisson L, Durocher Y. 2008a. Culture of HEK293-EBNA1 Cells for Production of Recombinant Proteins. Cold Spring Harbor Protocols 2008(4):pdb.prot4976.

Tom R, Bisson L, Durocher Y. 2008b. Purification of His-Tagged Proteins Using Fractogel-Cobalt. Cold Spring Harbor Protocols 2008(4):pdb.prot4980-.

Tripet B, Yu L, Bautista DL, Wong WY, Irvin RT, Hodges RS. 1996. Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain off the rapid detection, purification and

characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. Protein engineering 9(11):1029-42.