
Thèse présentée pour obtenir le grade
de Docteur de l'université Louis Pasteur
STRASBOURG I

Discipline : Chimie-Physique

Par
Erell LE GUEN

**FILMS BIOACTIFS À BASE DE POLYMÈRES
DÉGRADABLES POUR LA MODULATION DE LA
RÉPONSE CELLULAIRE**

Directeur de Thèse : Mme JESSEL Nadia, Chargée de recherche à Strasbourg
Co-directeur de Thèse : M. LAVALLE Philippe, Chargé de recherche à Strasbourg

Soutenue publiquement le 07 Mars 2008

Membres du jury :

Rapporteur interne : M. LEGRAND Jean-François Professeur à Strasbourg

Rapporteurs externes : Mme GANGLOFF Sophie Professeur à Reims

Mme MULLER Sylvaine Chargée de recherche à Nancy

Examineur : M. DECHER Gero Professeur à Strasbourg

Membre invité : M. VOEGEL Jean-Claude Directeur de recherche à Strasbourg

À mon mari Yann

À ma sœur Solen

À mes parents Bernard et Jocelyne

Je leur dédie ce travail de 3 ans durant lequel leur soutien inexpugnable face à ma fatigue, à mon stress...

m'a permis de toujours aller de l'avant.

À ma Grand-Mère Marie Le Guen, partie trop tôt, mais qui aurait été fière de sa petite fille.

REMERCIEMENTS

*Dister eo an dra ma ne dalv ket goulenn anezhañ.
(La chose est insignifiante si elle ne mérite pas qu'on la demande.)*

Toujours une étape difficile d'écrire des remerciements car il est sûr que ce seront les seules pages lues intégralement par toutes les personnes ayant le manuscrit en main.

De plus, j'ai eu le plaisir de côtoyer beaucoup de personnes d'horizons différents pendant ces 3 ans de thèse grâce à la pluridisciplinarité qui prône au laboratoire de l'INSERM unité U595, Biomatériaux : processus biophysiques et biologiques aux interfaces, et je risque donc de ne pas toutes les citer même si chacune, à sa manière, m'a aidée à aboutir.

Tout d'abord, mes remerciements vont à Mr VOEGEL Jean-Claude, directeur du laboratoire INSERM U595, pour m'avoir accueillie dans son équipe de recherche. Je souhaiterais lui exprimer ma gratitude pour son professionnalisme ainsi que son soutien et sa grande compréhension. Il m'a apporté son appui et m'a appris énormément. Dans ces remerciements, je n'oublie pas Mr SCHAAF Pierre pour son intérêt porté sur mes sujets de recherche lors de nos réunions.

Je remercie Mme JESSEL Nadia et Mr LAVALLE Philippe d'avoir consenti à être mes directeurs de thèse avec les contraintes que cela sous-entend. Je conserverai l'image de personnes brillantes, avec toutes les aptitudes nécessaires afin d'être deux chercheurs hors-norme. J'espère réussir à suivre le même chemin professionnel par la suite.

Je suis flattée de l'honneur que me font :

Mr LEGRAND Jean-François d'avoir accepté d'être mon rapporteur interne avec la charge de travail conséquente qui en découle.

Mme GANGLOFF Sophie et Mme MULLER Sylvaine d'être mes rapporteurs externes.

Mr DECHER Gero d'être l'examineur de cette thèse.

Je les remercie tous vivement d'avoir apporté leurs corrections et idées à ce travail et leur assure ma profonde gratitude.

Remerciements spéciaux : À Mr VODOUHË Constant qui a cru en mes capacités en recherche et m'a permis d'avancer à un moment crucial où le cœur n'y était plus.

À Mr VAUTIER Dominique pour nos discussions scientifiques et sa disponibilité constante à chacune de mes questions. De plus sa gentillesse, sa patience, et son humour m'ont été hautement bénéfiques pendant ces 3 ans. Ne plus être sa voisine de bureau va me manquer énormément.

À Mr MENDEZ Juan qui est la zénitude incarnée et qui m'a managée au départ à en avoir mal à la tête en fin de journée.

À Mme KOENIG Géraldine qui m'a soutenue et conseillée. Sa bonne humeur communicative et son sourire étaient toujours de bon aloi en début de journée.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance en de plus brefs mots, car je risquerais d'écrire trop de pages (mais le cœur y est) :

À Mr SENGER Bernard (chocolat au lait) et Mr BALL Vincent (chocolat noir) : entre le druide et le rossignol du laboratoire, j'ai toujours trouvé une oreille attentive à mes soucis de manipulations. De plus, j'ai eu le plaisir de pouvoir profiter de l'aide précieuse de Bernard pour le paragraphe ℓ et d . Je lui en resterai toujours redevable.

À Mr ARNTZ Youri : La personne à part du laboratoire puisque plus qu'un collègue de travail. Il me suffit donc d'une seule chose pour qu'il comprenne toute ma gratitude. Je lui dis : " méga b.u. ".

A Eric Mathieu, Géraldine Koenig, Sabine Muller, Cosette Betscha, Armelle Chassepot, Hajare Mjahed, Jean-Jacques Fluck, Yves Cam, Sabine Bopp, Florian Bombard: mes amis du midi grâce auxquels j'avais un vrai moment de détente pendant mes repas.

À Laurent Jourdainne, Grégory Francius, Riadh Zouari, Nadia Ladhari, Damien Mertz, qui ont été mes compagnons de galères.

À Eléonore Gennuso, Constant Vodouhê, Eric Hübsch, Aurore Schneider, Géraldine Wacker, partis vers d'autres horizons, mais que j'aurais voulu garder à mes côtés.

Enfin, je remercie : Adnane Nait Lechguer pour ces séminaires de tooth engineering à midi, Eric Mathieu pour sa gentillesse et son appui, Hervé Guégou, Karim Benmlih, Pierre Blondel, Christian Ringwald, Christiane Bouthier (le CAC était tout bonnement lumineux), René Elkaim, Sandra Werner, Leyla Koçgözlü, Karen Baer, Joëlle Ogier, Christine Affolter (ma voisine de paillasse), Florent Meyer, Doriane Richard, Isabelle N'Guyen, Vesna Stanic, Maria Dimitrova (bonne humeur continue), Dmitry Volodkin, Joseph Hemmerlé, Catherine Picart, Hervé Lesot, Bing Hu, François Clauss, Alain Ackermann, Claudine Porcel, Nicolas Laugel, Fouzia Boulmedais, Ludovic Richert, Jan Gunther, Simon Rinckenbach, et Delphine Cortial qui faisaient l'ambiance chaleureuse de l'unité Inserm U595.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIÈRES	VI
ABRÉVIATIONS et SYMBOLES	IX
LISTE des PUBLICATIONS	XI
INTRODUCTION GÉNÉRALE	I
Chapitre I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I.1. Les biomatériaux	6
I.1.1. Définitions	6
I.1.2. Biomatériaux et ingénierie tissulaire	9
I.1.3. Modification des propriétés de surface et fonctionnalisation des biomatériaux	12
I.2. Les films multicouches de polyélectrolytes	14
I.2.1. Historique	14
I.2.2. Principes fondamentaux	15
I.2.2.1. La méthode de construction couche par couche	15
I.2.2.2. Les polyélectrolytes d'origine biologique	18
I.2.2.2.1. La poly(<i>l</i> -lysine)	19
I.2.2.2.2. Le poly(acide glutamique)	20
I.2.2.2.3. L'acide hyaluronique	20
I.2.2.2.4. Le chitosan	21
I.2.2.3. Interactions mises en jeu lors de la construction du film	22
I.2.2.4. Modes de croissance	23
I.2.2.4.1. Mode de croissance linéaire : le modèle des trois zones	23
I.2.2.4.2. Modes de croissance super-linéaire ou exponentielle	25
I.2.2.5. Les techniques de construction	28
I.2.2.6. Applications des films multicouches de polyélectrolytes	29
I.2.3. Les films multicouches de polyélectrolytes en biologie	31
I.2.3.1. Modulation des propriétés de surfaces	31
I.2.3.2. Fonctionnalisation par incorporation de molécules actives	32
I.2.3.3. Films multicouches multicompartimentés	35
I.2.3.4. Applications biologiques des films multicouches	37
I.3. Les polyesters biodégradables dans la formation de biomatériaux : exemple du poly(acide <i>l,d</i>-lactique-co-glycolique)	39
I.3.1. Dégradation par hydrolyse et érosion du PLGA	40
I.3.2. Dégradation enzymatique du PLGA	41
I.3.3. Application du PLGA au domaine des biomatériaux	42
Chapitre II : MATÉRIELS ET MÉTHODES	44
II.1. Matériels	45
II.1.1. Polyélectrolytes	45
II.1.2. Polyélectrolytes marqués par un fluorophore	48
II.1.3. Polymères	49
II.1.4. Molécules actives	50
II.1.5. La β -cyclodextrine	55
II.1.6. Réactifs pour la réticulation	55

II.1.7.	Nettoyage des supports.....	57
II.1.8.	Tableau des réactifs et composés utilisés.....	57
II.2.	Méthodes	58
II.2.1.	Système de dépôts automatisés des multicouches	58
II.2.2.	Construction des films de PLGA par " solvant casting "	60
II.2.3.	Nébuliseur	60
II.2.4.	Microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation	62
II.2.5.	Microscope à force atomique	70
II.2.6.	Fluorimètre	73
II.2.7.	Microscope à épifluorescence	75
II.2.8.	Microscope confocal à balayage laser	76
II.2.9.	Dichroïsme circulaire	79
II.2.10.	Test de viabilité cellulaire par mesure de l'activité de la phosphatase acide.....	83
II.2.11.	Dosages de la mélanine extracellulaire et intracellulaire synthétisée par les mélanocytes murins B16-F1.....	84
II.2.12.	Culture des adénocarcinomes humains de côlon (HT29)	85
II.2.13.	Mise en place de l'architecture multicouche-PLGA.....	86
II.2.13.1.	Le chloroforme comme solvant du PLGA.....	86
II.2.13.2.	Dépôt de PL ℓ en surface du PLGA.....	86
II.2.13.3.	Conditions de culture des cellules B16-F1	87
II.2.13.4.	Concentration en Taxol déposée.....	90
II.2.13.5.	Dépôt de PSS sur (PL ℓ -HA) ₃₀	90
II.2.14.	Techniques de coloration spécifiques du cartilage et de l'os.....	91
II.2.14.1.	Coloration du cartilage par le bleu Alcian	91
II.2.14.2.	Coloration de l'os par la méthode argentique de Von Kossa.....	91
II.2.14.3.	Technique d'immunofluorescence pour détecter l'expression d'ostéopontine	92
 <i>Chapitre III : Les films multicouches comme réservoirs de molécules actives : modulation des cinétiques de réponses cellulaires</i>		
		93
III.1.	Modulation de l'accès au Taxol par recouvrement du film (PLℓ-HA)₃₀ par un film PSS-PAH	94
III.1.1.	Contexte et intérêt	94
III.1.2.	Résultats principaux et discussion.....	95
III.1.3.	Article, (Vodouhê et al. 2006).....	99
III.1.4.	Conclusions et perspectives.....	106
III.2.	Modulation de l'accès à des principes actifs par réticulation des films multicouches	107
III.2.1.	Les films multicouches réticulés	107
III.2.2.	Résultats et discussion.....	108
III.2.3.	Article, (Schneider et al. 2007).....	114
III.2.4.	Conclusions et perspectives.....	120
III.3.	Mélanges de copolymères de PLGA et effet barrière pour des réservoirs de molécules actives.....	121
III.3.1.	Contexte initial	121
III.3.2.	Multicouches construites à partir de mélanges de polyélectrolytes ℓ et d comme système de libération contrôlée de molécules actives	122
III.3.2.1.	Introduction	122
III.3.2.2.	Evaluation du système de libération contrôlée du PGA- α -MSH	123
III.3.2.3.	Conclusions	126

III.3.3.	Choix du PLGA comme barrière à la diffusion de molécules actives intégrées dans des multicouches.....	127
III.3.4.	Mélanges de PLGA et modulation de la dégradation.....	129
III.3.5.	Détermination de l'épaisseur des films.....	132
III.3.6.	Etudes de la dégradation de différents mélanges de PLGA.....	133
III.3.6.1.	Diminution de masse des films de PLGA au cours de la dégradation.....	133
III.3.6.2.	Evolution des rugosités des films de PLGA au cours de la dégradation.....	135
III.3.6.3.	Visualisation des films de PLGA déposés comme barrière sur des films multicouches....	138
III.3.7.	Enfouissement de l' α -MSH dans l'édifice multicouches de polyélectrolytes/barrière de PLGA.....	139
III.3.7.1.	Modulation de la production de la mélanine par les cellules B16-F1 ensemencées sur différents films.....	139
III.3.7.2.	Le PGA- α -MSH en question.....	141
III.3.7.3.	Comportement des cellules B16-F1 ensemencées sur les constructions.....	144
III.3.7.4.	Conclusion des études avec le PGA- α -MSH.....	146
III.3.8.	Réservoirs fonctionnalisés par le Taxol.....	147
III.3.8.1.	Choix de la composition en polyélectrolytes du film réservoir.....	147
III.3.8.2.	Test par fluorimétrie de la libération du Tx ^{Green488} dans la structure (PL ℓ -HA) ₃₀ -Tx ^{Green488} -PSS-PLGA x/y -PL ℓ	151
III.3.8.3.	Observations en microscopie confocale des cellules HT29 sur le système (PL ℓ -HA) ₃₀ -Tx ^{Green488} -PSS-PLGA x/y -PL ℓ ^{Rho}	152
III.3.8.4.	Tests de viabilité sur le système (PL ℓ -HA) ₃₀ -Tx-PSS-PLGA x/y -PL ℓ	155
III.3.9.	Conclusions et perspectives.....	159
III.4.	Films multicouches PL-PGA construits à partir de mélanges d'énantiomères des polyélectrolytes PL et PGA : étude par dichroïsme circulaire.....	162
III.4.1.	Chiralité des molécules.....	162
III.4.2.	Résultats obtenus par QCM-D.....	164
III.4.3.	Mesures par dichroïsme circulaire.....	165
III.4.3.1.	Corrélation entre la composition en énantiomères des mélanges et la composition du film multicouche.....	165
III.4.3.2.	Mise en évidence de l'échange entre les énantiomères ℓ et d de PL et PGA.....	170
III.4.4.	Discussion et perspectives.....	174
	 <i>Chapitre IV : Les films multicouches comme biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire : induction du tissu osseux à partir de cellules souches et de facteurs de croissance incorporés dans des films multicouches.....</i>	 <i>176</i>
IV.1.	Résultats obtenus par les travaux précédents et objectifs.....	177
IV.2.	Résultats.....	182
IV.3.	Conclusions et perspectives.....	189
IV.4.	Article, (Dierich et al. 2007).....	190
	 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	 195
ANNEXES.....	199	
Article n°4 :.....	200	
RÉFÉRENCES.....	209	

ABRÉVIATIONS et SYMBOLES

Appareils et techniques

AFM : atomic force microscopy (microscopie à force atomique)

DC : dichroïsme circulaire

CLSM : confocal laser scanning microscopy (microscopie confocale à balayage laser)

QCM-D : quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation)

Milieux de culture

DMEM : Dulbecco's minimal essential medium

MEM : minimal essential medium

FBS : foetal bovine serum

PBS : phosphate-buffered saline

Polymères

β -CD : β -cyclodextrine

CHI : chitosan

HA : acide hyaluronique

PAH : poly(allylamine hydrochlorydrique)

PDADMA : poly(diallyldiméthylammonium)

PEI : poly(éthylène imine)

PGAd : poly(acide *d*-glutamique)

PGA ℓ : poly(acide ℓ -glutamique)

PLd : poly(*d*-lysine)

PL ℓ : poly(ℓ -lysine)

PLGA : poly(acide ℓ ,*d*-lactique-co-glycolique)

PLA : poly(acide ℓ ,*d*-lactique)

PSS : poly(styrène sulfonate)

Protéines et molécules thérapeutiques

α -MSH : α -melanocyte-stimulating hormone (Hormone mélanostimulante α)

BMP : bone morphogenetic protein (Protéine morphogénique osseuse)

MCR : melanocortin receptor (récepteur aux mélanocortines)

TGF : transforming growth factor (facteur de croissance de transformation)

Tx : paclitaxel (nom commercial : Taxol®)

Tx^{Green488} : Taxol Oregon Green® 488

Réactifs et solvants

cCD : β -cyclodextrine monocarboxylée

CD : cyclodextrine

CHCl₃ : chloroforme

DMSO : diméthyl sulfoxyde

EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylamino-propyl) carbodiimide

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

HCl : acide chlorhydrique

MRho : méthacryloxyéthyl thiocarbamoyl rhodamine B

Na₂CO₃ : carbonate de sodium

NaOH : hydroxyde de sodium

(NH₄)₂S₂O₈ : ammonium peroxodisulfate

Rho : rhodamine B

S-NHS : N-hydroxysulfosuccinimide

SDS : sodium dodécyl sulfate ou acide laurique

TMEDA : tétraméthylethylènediamine

TR : Rouge Texas

TRIS : 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol ou trishydroxyméthylaminométhane

LISTE des PUBLICATIONS

1. Biomaterials. 2006 Aug; 27(22):4149-56

Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films.

Vodouhê C., **E. Le Guen**, J. Mendez Garza, G. Francius, C. Déjugnat, J. Ogier, P. Schaaf, J.-C. Voegel, P. Lavalley.

2. Biomacromolecules. 2007 Jan; 8(1):139-145

Multifunctional polyelectrolyte multilayer films: combining mechanical resistance, biodegradability and bioactivity.

Schneider A., C. Vodouhê, L. Richert, G. Francius, **E. Le Guen**, P. Schaaf, J.-C. Voegel, B. Frisch, C. Picart.

3. Biomolecular Engineering 2007 Feb; 24(1):33-41

Bioactive coatings based on polyelectrolyte multilayer architectures functionalized by embedded proteins, peptides or drugs.

Le Guen E., A. Chassepot, G. Decher, P. Schaaf, J.-C. Voegel, N. Jessel.

4. Advanced Materials. 2007 Mar; 19(5):693-697.

Bone formation mediated by synergy-acting growth factors embedded in a polyelectrolyte multilayer film.

Dierich A., **E. Le Guen**, N. Messadecq, J.-F. Stoltz, P. Netter, P. Schaaf, J.-C. Voegel, N. Benkirane-Jessel.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

*Ar c'hask a zo frank
Ar c'havout n'eo ket stank.
(Chercher est courant, trouver n'est pas abondant.)*

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le domaine des biomatériaux est actuellement en plein essor en raison du vieillissement de la population et du désir d'amélioration de la qualité de vie. Le développement de nouveaux biomatériaux fait appel à différentes disciplines dont les biotechnologies, la science des matériaux et l'ingénierie.

Les interactions entre un biomatériau et l'organisme se localisent généralement à la surface du biomatériau et jouent un rôle capital dans son intégration. Selon les propriétés physico-chimiques et biologiques de cette interface, le biomatériau sera plus ou moins toléré par l'organisme. Par conséquent, il s'avère primordial de contrôler précisément les propriétés de surface afin d'éviter notamment des réactions inflammatoires aiguës et de favoriser une colonisation tissulaire adéquate.

Actuellement, des biomatériaux de nouvelles générations sont en cours de développement et consistent à réaliser des matériaux bioactifs. L'activité biologique peut être conférée au matériau en modifiant ses propriétés le plus souvent en surface. Ceci a conduit à la mise au point de nouveaux procédés de traitements des surfaces. Certains sont basés sur l'adsorption ou le couplage covalent de molécules actives sur les surfaces, d'autres sur les monocouches auto-assemblées, d'autres encore sur le traitement des surfaces par plasma. Ces méthodes sont, en général, difficiles à mettre en œuvre et ne peuvent être adaptées à tous les types de surfaces ou toutes les géométries. Une autre voie de fonctionnalisation des biomatériaux basée sur le concept de multicouches de polyélectrolytes a été introduite plus récemment. Il s'agit de recouvrir des matériaux en les exposant alternativement au contact de solutions de polyanions et de polycations. L'Unité 595 de l'INSERM à Strasbourg a focalisé ses efforts au développement et à l'application de ce concept pour la fonctionnalisation des biomatériaux. Ainsi, plusieurs travaux ont démontré le potentiel des films multicouches comme réservoirs de molécules, en particulier pour des principes actifs qui conservent leurs activités biologiques lors de leur adsorption à la surface ou de leur incorporation dans les films multicouches. Des fonctionnalisations de ces films multicouches ont déjà été réalisées au laboratoire par insertion de protéines, de peptides, de lipopolysaccharides, d'oligonucléotides ou encore de médicaments.

L'étape suivante consiste à contrôler la réponse biologique du film fonctionnalisé dans le temps. Par exemple, il s'agit d'augmenter la durée d'action d'une molécule intégrée dans un film ou de provoquer sa libération après un temps déterminé ou de façon prolongée dans le temps. Dernièrement, des études physico-chimiques menées au laboratoire ont visé à élaborer de nouveaux films multicouches stratifiés, comprenant des réservoirs de biomolécules recouverts de couches " barrières " de compositions variées, afin de contrôler notamment ces paramètres cinétiques. Mon travail de thèse s'est inscrit dans cette stratégie et a consisté à moduler l'accès des cellules aux molécules actives insérées dans les films multicouches. Plusieurs systèmes de films ont été testés et ont nécessité des mises au point de structures complexes et modulables.

Parallèlement à ce travail, je me suis également intéressée à la régénération tissulaire et plus particulièrement à la régénération osseuse en utilisant des architectures basées sur des films multicouches et incorporant des facteurs de croissance.

Afin de situer le contexte de ces études, une revue bibliographique sur les biomatériaux, les films multicouches de polyélectrolytes et les polyesters est présentée chapitre I. Le chapitre II détaille les techniques et méthodes permettant d'élaborer les différents types de films testés. L'ensemble des techniques de caractérisation et des méthodes de cultures cellulaires utilisées sont également décrites au sein de ce chapitre.

Ensuite, quatre stratégies de modification des surfaces permettant d'aboutir à des biomatériaux actifs seront exposées chapitre III. Elles se basent sur deux grandes familles de polymères, à savoir les polyélectrolytes et les polyesters aliphatiques.

La première méthode est le recouvrement de surface par des films multicouches de polyélectrolytes comportant des strates de différentes natures. Ce revêtement permet d'intégrer des molécules actives (médicaments, protéines...)   la surface du substrat et d'ensemencer des cellules qui internaliseront ces biomolécules. Les premiers travaux expérimentaux ont ainsi consisté à mettre en place un réservoir de paclitaxel, un médicament anticancéreux, sur la surface du matériau. Un film multicouche biodégradable intègre cet anticancéreux dans sa structure et agit en tant que " réservoir ". Un film multicouche composé de polyélectrolytes synthétiques recouvre cette structure et constitue alors une " barrière " permettant de moduler l'accès des cellules aux principes actifs sous-jacents.

Les films multicouches peuvent être réticulés par voie chimique. La réticulation favorise l'adhésion cellulaire, qui est limitée voire nulle sur la plupart des films non réticulés. Des principes actifs déposés par la suite sur ces films s'y adsorbent pour aboutir à un film réticulé

fonctionnalisés. De plus, certaines biomolécules adsorbées dans ce film sont progressivement libérées dans le temps par simple diffusion et maintiennent ainsi une activité sur des temps longs.

Une troisième stratégie utilise le réservoir de paclitaxel présenté précédemment. Il est recouvert par une couche barrière de copolymère biodégradable couramment employé pour la formation de biomatériaux, le poly(acide *d,l*-lactique-co-glycolique) (PLGA). Pour que les cellules mises en culture sur le film accèdent au paclitaxel, il faut que la couche de PLGA se dégrade. En jouant sur la longueur des chaînes de PLGA utilisées pour former la couche barrière, il sera possible de moduler les temps de dégradation de ces couches et les cinétiques d'accès des cellules aux principes actifs localisés dans le film sous-jacent.

La quatrième et dernière stratégie étudiée concerne l'utilisation d'énantiomères de polyélectrolytes dans la constitution des films multicouches. L'énantiomère *d* est non biodégradable par rapport à l'énantiomère *l*. Si les cellules sontensemencées sur une surface composée d'un certain taux de polyélectrolytes de forme *d*, elles ne dégraderont plus le film et n'internaliseront plus la molécule active adsorbée lors de la construction du film. Nous avons construit différents films et évalué le taux en polyélectrolytes de formes *d* contenus dans les films à l'aide d'un appareillage de dichroïsme circulaire.

Dans le chapitre IV, une stratégie concernant l'ingénierie tissulaire basée également sur les films de polyélectrolytes est présentée. Le but de cette étude est de différencier des cellules de corps embryonnaires en chondrocytes puis en ostéoblastes grâce à deux facteurs de croissance spécifiques intégrés dans un film multicouche selon une architecture précise.

Pour clore ce manuscrit, les principales conclusions des différentes études seront résumées et les perspectives qui en découlent seront évoquées.

Chapitre I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

*Neb a oar
A gavo desk.
(Quiconque sait trouvera à apprendre.)
On apprend toujours quelque chose, aussi savant que l'on soit.*

Chapitre I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Les biomatériaux

I.1.1. Définitions

Les biomatériaux ont été développés pour préserver l'intégrité et le confort de vie des personnes souffrant de déficiences fonctionnelles graves ou victimes de blessures ou de brûlures.

L'objectif de leur développement est de permettre la fabrication de dispositifs d'assistance corporelle capables de suppléer les fonctions des organes lésés. Les biomatériaux recouvrent une grande variété d'applications biomédicales puisqu'ils peuvent être à la fois des matériaux de réparation des lésions tissulaires, implantables et/ou constitutifs de systèmes d'assistance extracorporelle. Ils ne se définissent donc pas par une nature particulière mais par l'usage auquel ils sont destinés. Ils regroupent aussi bien des matériaux issus du génie de l'homme (métaux, alliages métalliques, céramiques, matières plastiques) que des matériaux d'origine naturelle (collagène et cellulose), mais aussi des matériaux d'un nouveau type associant un des matériaux précités à une matrice biologique.

Ce matériel doit présenter des propriétés de biocompatibilité et d'inertie lors de son intégration dans le corps humain afin d'éviter les rejets. A l'heure actuelle, les biomatériaux utilisés sont tolérés de façon satisfaisante par l'organisme, mais certains ne sont pas totalement bio-intégrés.

La chirurgie réparatrice et celle de la suppléance fonctionnelle constituent le domaine d'application le plus important des biomatériaux. D'autres spécialités médicales recourent également à des outils d'investigation ou d'intervention endoscopique impliquant l'emploi de matériaux appelés aussi à être confrontés au milieu biologique. Cette situation de travail sous contrainte biologique est le dénominateur commun à tous les biomatériaux.

Lors de l'implantation d'un biomatériau, un processus inflammatoire se met toujours en place face à ce corps étranger, appelé " foreign body reaction " ou FBR. L'inflammation est fondamentale pour la cicatrisation et la guérison. Les propriétés de surface du biomatériau et le lieu d'implantation déterminent la nature des cellules qui seront présentes suite à cette réaction (Anderson 2001). Le mécanisme complexe de la réaction à un corps étranger est synthétisé figure I.1.

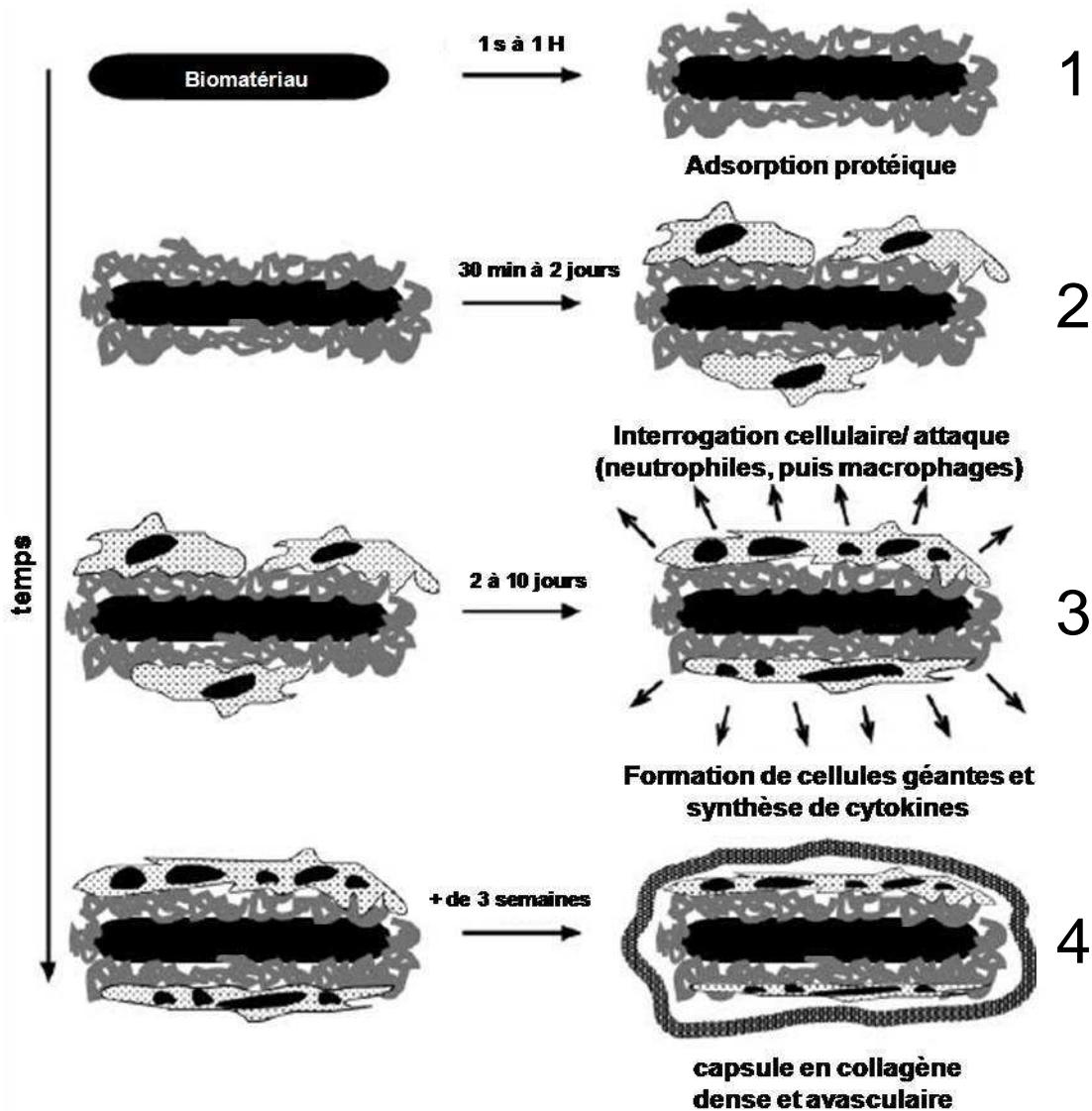


Figure I.1: Schéma de la réaction de l'organisme en réponse à l'implantation d'un corps étranger. Cette réaction physiologique se déroule lors de l'implantation d'un biomatériau dans l'organisme. La capsule en collagène résultante se maintient tant que le biomatériau est présent dans l'organisme (Ratner and Bryant 2004).

Dans un premier temps, le système immunitaire non spécifique est activé. Des protéines (albumine, fibrinogène, fibronectine...) recouvrent le biomatériau par simple adsorption (figure I.1, étape 1). Cette couche protéique semble être le facteur déclenchant de la réaction immunitaire FBR. Elle permet aux cellules du système immunitaire (monocytes, leucocytes, macrophages tissulaires...) de reconnaître l'implant comme faisant partie du non-soi. Des cellules inflammatoires sanguines et des plaquettes s'infiltrèrent alors par chimiotaxisme au travers des vaisseaux sanguins et des tissus pour arriver sur le site de l'inflammation aiguë et interagir avec l'implant (figure I.1, étape 2). Cependant, les macrophages tissulaires, ainsi que ceux dérivés des monocytes sanguins circulant, ne peuvent phagocyter l'implant généralement

trop volumineux. La résultante est un phénomène d'inflammation chronique. Cette étape apparaît avec la persistance du stimulus inflammatoire, comme par exemple un implant non dégradé ou lentement dégradé. L'interface est alors le lieu de sécrétion d'enzymes, d'intermédiaires de radicaux libres, de cytokines... Les macrophages " frustrés " fusionnent alors entre eux pour former des cellules géantes plurinucléées (figure I.1, étape 3). Il est intéressant de noter que ces cellules persistent tout au long de la vie de l'implant. Elles jouent un rôle primordial dans la dégradation des biomatériaux implantés dont les dispositifs médicaux polymériques.

La cascade de réactions se poursuit par l'arrivée de fibroblastes sur le site suite à la synthèse de cytokines par les macrophages. Les fibroblastes aident à la réparation tissulaire au site d'implantation. En effet, l'intérêt est de tenter une guérison du traumatisme provoqué aux tissus. Ces fibroblastes colonisent progressivement le site et synthétisent du collagène. Une poche cicatricielle de collagène est formée autour du biomatériau correspondant à un phénomène de fibrose. Le biomatériau se retrouve donc encapsulé dans une structure fibreuse collagénique non vascularisée de 50 à 200 μm d'épaisseur qui isole le biomatériau des tissus environnants et diminue alors les performances de l'implant (figure I.1, étape 4) (Anderson 2001; Ratner and Bryant 2004). Tout ce processus est encore le sujet de nombreuses recherches que nous n'exposerons pas plus en avant puisqu'elles ne représentent pas un intérêt majeur pour la compréhension du reste de cette thèse.

Lors de l'implantation d'un biomatériau, il est donc important de contrôler l'adhésion protéique et l'adhésion cellulaire afin de contrôler des événements néfastes tels que des réactions inflammatoires chroniques, des réactions allergiques, des infections bactériennes, ou encore des thromboses dans le cas des implants vasculaires. Une réaction inflammatoire chronique se traduit par une nécrose nécessitant la dépose de l'implant.

Les efforts de la recherche actuelle dans le domaine des biomatériaux consistent, dans un premier temps, à élaborer un composé ayant des propriétés mécaniques et structurales adaptées à sa future fonction. Ensuite, les biomatériaux développés doivent interagir de façon active avec le milieu vivant environnant tel que les tissus avoisinants le site d'implantation du matériau. On cherche ainsi à obtenir des réponses contrôlées à partir du biomatériau pour minimiser les réactions vis-à-vis de ce corps étranger, et moduler l'activation des cellules du système immunitaire (Ratner 1996; Ratner and Bryant 2004). Les nouveaux biomatériaux développés sont donc constitués de composés bioactifs capables d'induire une réponse spécifique des tissus environnant le site d'implantation et d'interagir avec les cellules environnantes.

Une autre évolution récente dans le domaine des biomatériaux consiste à élaborer des composés qui ne sont plus biostables (rester *ad vitam* dans le corps) mais pouvant être biodégradables. Ceci concerne spécialement des applications thérapeutiques temporaires comme les *stents* biorésorbables (Zilberman and Eberhart 2006), les fils de suture synthétiques résorbables tels que le Vicryl® rapide ou le Dexon®, les membranes biodégradables pour la cicatrisation des plaies (Jürgens et al. 2006), ou encore les éponges pour la régénération de l'os (Freed et al. 1993; Ishaug et al. 1997), et l'ingénierie tissulaire (Mikos et al. 1993).

Avec l'allongement de l'espérance de vie et l'amélioration des systèmes de soins, les matériaux à usage biomédical connaissent un développement important et la recherche dans ce domaine doit répondre à un besoin croissant. Les applications de ces matériaux sont très diverses : matériaux de réparation des lésions tissulaires, matériaux implantables, systèmes d'assistance extra-corporelle, outils d'investigation ou d'intervention endoscopique. Bien que l'on maîtrise aujourd'hui la confection de matériaux biocompatibles (non-toxiques et bien acceptés par les receveurs), il demeure des corps étrangers dont les performances fonctionnelles se trouvent progressivement réduites à cause de leur incapacité à s'intégrer parfaitement aux tissus vivants. La biocompatibilité des biomatériaux est donc un pré-requis, mais n'est pas suffisante pour optimiser leur fonctionnalité. C'est pourquoi un effort considérable est consacré depuis une dizaine d'années à la mise au point de matériaux bioactifs, capables de stimuler leur environnement biologique de façon ciblée (Hubbell 1999; Sakiyama-Elbert and Hubbell 2001).

I.1.2. Biomatériaux et ingénierie tissulaire

La description des biomatériaux de nouvelle génération amène à aborder le vaste domaine de l'ingénierie tissulaire. L'ingénierie tissulaire se définit comme l'ensemble des méthodes et des technologies se basant sur l'ingénierie et les sciences de la vie pour développer des substituts biologiques et palier les déficiences d'un tissu (osseux, vasculaire, oculaire, nerveux). L'objectif majeur de l'ingénierie tissulaire est de synthétiser un tissu supplétif à partir de matrices contenant l'ensemble des éléments nécessaires. Les connaissances de domaines variés comme la culture de cellules, les polymères, et la pharmacologie sont nécessaires dans ce cadre. Les composés sélectionnés pour constituer les biomatériaux doivent répondre à des critères stricts à citer : l'absence de réaction immunitaire et inflammatoire, la libération de

molécules non toxiques lors de leur dégradation, et le contrôle des propriétés mécaniques. De plus, les cellules cultivées sur ces structures seront à choisir parmi des cellules quiescentes (adultes), prolifératives (jeunes), ou embryonnaires (indifférenciées).

L'ingénierie tissulaire a pour but de remplacer, maintenir, voire améliorer la fonction des tissus lésés, via l'association de cellules autologues, de matrices et de facteurs bio-inducteurs. Cette approche thérapeutique est actuellement considérée comme innovante en médecine régénérative à côté des deux principales thérapies que sont la transplantation d'organes et la chirurgie prothétique. En outre, la voie de l'ingénierie tissulaire présente l'avantage de s'affranchir de problèmes comme le manque de donneurs et le risque de transmission virale. Elle offre ainsi de nouvelles voies en orthopédie en particulier dans les domaines de la réparation cartilagineuse.

Le cartilage articulaire est un tissu qui se répare mal spontanément, et le tissu cicatriciel, quand il est présent, est souvent de mauvaise qualité. Une des voies thérapeutiques d'avenir, l'ingénierie tissulaire, se propose de promouvoir la régénération *in situ* d'un néo-tissu proche du cartilage natif en apportant à la fois un contingent cellulaire susceptible de synthèse de composants matriciels, et des matrices collagéniques et/ou polysaccharidiques aux capacités structurantes et bio-inductrices au sein de la lésion. Si les travaux initiaux d'ingénierie du cartilage se sont centrés sur la contribution des cellules résidentes, les chondrocytes, pour une cicatrisation guidée des lésions chondrales, les données les plus récentes soulignent les potentialités chondro-inductrices des cellules souches mésenchymateuses adultes (Wakitani et al. 2004; Oshima et al. 2005).

De nouvelles stratégies consistent donc à utiliser un biomatériau comme support de régénération de tissus. Les cellules constituant le tissu peuvent soit être mises en culture sur le biomatériau *ex vivo* avant l'implantation, soit coloniser directement le biomatériau nouvellement implanté en migrant depuis les tissus voisins. Ces biomatériaux peuvent être constitués de composés dégradables afin de laisser en place uniquement le tissu physiologique à long terme (Langer and Vacanti 1993; Alsberg et al. 2003; Boontheekul et al. 2007).

Dans ce cadre, les " *scaffolds* ", littéralement échafaudage en anglais, sont des architectures sophistiquées à trois dimensions qui forment des motifs précis. Ils vont servir à mimer les structures biologiques en reproduisant une structure 3-D complexe avec des rôles mécaniques et fonctionnels. Les *scaffolds* vont servir à la formation de supports hautement spécialisés et fonctionnalisés, modifiables en porosité (taille des pores, interconnectivité) et en épaisseur.

Les hydrogels représentent une première catégorie de *scaffolds* qui possèdent de nombreux avantages pour l'ingénierie tissulaire et pour la libération de principes actifs. Ils peuvent être

placés localement dans le corps humain par simple injection ce qui évite le traumatisme de l'implantation chirurgicale et diminue les risques infectieux. La préparation d'hydrogels est généralement aisée puisqu'elle consiste à faire interagir des polymères naturels avec des agents de réticulation, le plus souvent des ions multivalents. L'exemple le plus connu est l'hydrogel d'alginate qui gélifie en présence d'ions Ca^{2+} , Ba^{2+} ou Sr^{2+} et se dégrade après implantation (LeRoux et al. 1999). En utilisant certains polymères synthétiques, un stimulus extérieur d'une autre nature que l'addition d'un réactif peut aboutir à la formation d'un gel. Des groupements photosensibles (acryliques ou méthacryliques) peuvent se réticuler par éclairage avec une source lumineuse émettant dans le domaine spectral approprié (Cruise et al. 1998). L'auto-assemblage de peptides est aussi possible pour former des hydrogels (Holmes et al. 2000). Enfin des hydrogels thermosensibles peuvent être directement injectés sous forme liquide et prendre en masse à la température du corps (Loh and Li 2007).

Les hydrogels sont généralement de nature biorésorbable et se dégradent selon plusieurs voies suivant leur composition propre et les modifications chimiques apportées (Lee and Mooney 2001; Lee et al. 2004). Ces hydrogels offrent un environnement ressemblant fortement aux tissus naturels par leur fort taux d'hydratation. Un gel peut alors constituer une matrice de croissance contenant des peptides adhésifs en surface (Park et al. 2005c) ou mimer des structures biologiques comme la matrice extracellulaire (Gobin and West 2002) ou l'os (Chung et al. 2006). Les hydrogels peuvent contenir des médicaments tels des anticancéreux (Bouhadir et al. 2001), des antibiotiques (Norris et al. 2005), des facteurs de croissance (Peattie et al. 2006), ou de l'ADN (Chun et al. 2005). Ils peuvent également encapsuler des cellules (Weber et al. 2007). Il est aussi possible d'intégrer des facteurs protéiques angiogéniques pour induire une vascularisation au travers du gel s'il est trop épais (Lee and Mooney 2001).

En termes d'ingénierie tissulaire, les hydrogels sont utilisés à des fins de régénération du cartilage. Lorsque ce tissu est endommagé, il n'a pas la capacité de se régénérer spontanément (Stoltz et al. 2006). Une étude récente décrit l'utilisation de cellules souchesensemencées dans l'hydrogel composé d'oligo(poly(éthylène glycol) fumarate) (OPF) et fonctionnalisé par le facteur de croissance TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1). Cet hydrogel permet non seulement la différenciation des cellules souches en chondrocytes mais aussi le maintien de leur viabilité avec une synthèse de leur propre matrice après 14 jours (Park et al. 2007a).

Les biomatériaux peuvent aussi former des microcapsules qui entourent des cellules transplantées, plus précisément des îlots de Langerhans dans le cas du diabète

insulinodépendant. La microencapsulation permet d'éviter alors le rejet et l'utilisation d'immunosuppresseurs, sans gêner la synthèse d'insuline (Orive et al. 2006).

En plus des hydrogels, les polymères (silicone, polyuréthane...) peuvent aussi servir de *scaffolds*. Nous développerons dans le chapitre I.3 le cas du PLGA (poly(acide *l,d*-lactique-co-glycolique)) qui permet de créer des éponges ainsi que des dispositifs de libération de médicaments. Un autre exemple type est le poly(ϵ -caprolactone), un polyester aliphatique biocompatible. Il est utilisé dans l'ingénierie tissulaire de l'os par exemple (Park et al. 2007b) mais aussi en tant que fils de suture (Surucryl™), ou pour former des sachets d'emballage hydrophobes biodégradables (Mater-Bi® de Novamont) (Olabarrieta et al. 2001). Enfin il est testé comme vecteur de médicaments en intraoculaire (Peyman et al. 1996).

I.1.3. Modification des propriétés de surface et fonctionnalisation des biomatériaux

Afin de guider la réponse des tissus environnant les biomatériaux, la fonctionnalisation de leur surface est une stratégie en plein essor. La modification de surface permettra ainsi de contrôler les interactions avec les protéines du milieu mais aussi de favoriser l'adhérence cellulaire spécifique ou, à l'inverse, de créer des surfaces antiadhésives.

Le biomatériau peut être modifié par réactions chimiques de ses composants en surface. Un exemple ici est le traitement en plasma de décharge. L'action d'un plasma modifie la structure de surface et les liaisons chimiques, favorisant la mouillabilité, voire crée de nouvelles liaisons chimiques par scission des chaînes moléculaires. Ainsi une surface peut devenir biocompatible (Favia and d'Agostino 1998; Chu 2004).

La fonctionnalisation des surfaces par l'oligopeptide RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) favorise l'adhésion cellulaire via les intégrines (Ruoslahti 2003; Durrieu 2005).

D'un autre côté, le PEG (poly(éthylène glycol)) est la molécule la plus utilisée pour créer des surfaces antiadhésives, résistantes aux cellules et aux protéines. Les chaînes de PEG peuvent être immobilisées sur la surface par couplage covalent (Sharma et al. 2004) ou par adsorption (voir p.34). D'autres études utilisent le PEG modifié par couplage d'une chaîne fortement adhésive qui se fixe sur la surface du biomatériau et laisse la molécule PEG libre en surface. La chaîne adhésive peut être constituée soit de 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA), un composant important des protéines adhésives de mollusque (Dalsin et al. 2003), soit du polyélectrolyte poly(*l*-lysine), PL*l*. Dans ce dernier cas, le recouvrement de la structure

métallique se fait par un film multicouche constitué de polyélectrolytes et construit par la technique dite couche par couche. Une couche terminale de PLL-PEG empêche l'adhésion protéique et donc diminue les poussées inflammatoires causées par l'implant (Kenausis et al. 2000). Ces films multicouches de polyélectrolytes offrent une perspective considérable pour recouvrir n'importe quel type de matériaux.

Le progrès médical nécessite très souvent une approche pluridisciplinaire, au confluent de la biologie, de la chimie et de la physique. Mon sujet de thèse décrit une possible alliance de ces disciplines au profit d'un secteur auquel les recherches actuelles promettent d'importantes innovations : les biomatériaux dont les domaines d'application peuvent inclure des stratégies thérapeutiques.

La bioactivité d'un matériau est principalement fondée sur des principes de reconnaissance moléculaire. On peut rendre un matériau bioactif en lui associant divers sites de reconnaissance tels que des facteurs d'adhésion ou de croissance, ou en lui faisant subir certaines modifications chimiques et physicochimiques (Jo and Park 2000). Bien qu'il soit possible d'incorporer des molécules actives au sein même de la structure des matériaux, la stratégie la plus répandue consiste à les immobiliser à la surface. Ces molécules sont alors généralement liées de façon covalente ou simplement adsorbées, ce qui provoque souvent une perte de fonctionnalité due à des dénaturations ou à des empêchements stériques. Afin de contourner ces problèmes, des techniques de modification de surface fondées sur la construction d'architectures " multicouches " fonctionnalisables chimisorbées ont été envisagées. Ces films biocompatibles peuvent être fonctionnalisés avec des médicaments qui sont libérés localement et de façon prolongée dans les tissus avoisinant l'implant ou qui sont mis en réserve dans les films sur lesquels les cellules vont adhérer. Cette technique permet aussi de réduire fortement les doses administrées donc d'éviter les effets secondaires associés à la drogue considérée. D'autre part, la composition de la surface va être modulable selon l'action future du biomatériau dans le corps et va ainsi potentialiser le biomatériau. Nous allons donc nous arrêter sur cette nouvelle technologie.

I.2. Les films multicouches de polyelectrolytes

I.2.1. Historique

Une première méthode de modification de surfaces a consisté à utiliser des lipides. Ainsi au début du XX^{ème} siècle, Langmuir et Blodgett ont déposés des monocouches de lipides amphiphiles sur des surfaces en verre. Après avoir formé un film lipidique au niveau d'une interface air-eau grâce au caractère amphiphile des lipides (Langmuir 1917), le film monocouche est transféré par adsorption sur un matériel solide par immersion dans la cuve contenant le film lipidique (figure I.2) (Blodgett and Langmuir 1937). Des molécules tensioactives sont également utilisables à la place des lipides pour former d'autres types de monocouches.

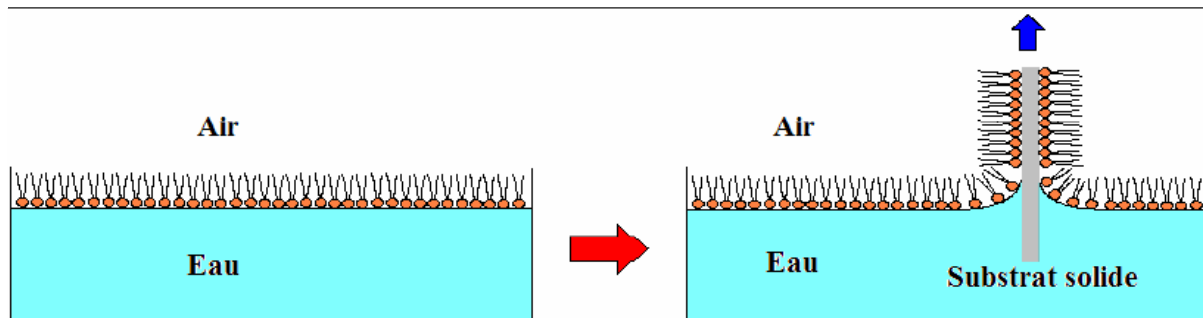


Figure I.2: Méthode de Langmuir-Blodgett: Adsorption d'une monocouche lipidique sur une surface solide par passage du matériau au travers d'une monocouche lipidique créée à une interface air-eau.

Cependant, cette méthode de recouvrement de surfaces par des films structurés présente de nombreux inconvénients, notamment l'instabilité mécanique des films, les restrictions de topographie liées au substrat, et la restriction des composants (seulement des tensio-actifs). Ainsi, après le dépôt de seulement quelques couches de tensio-actifs, la désorption devient plus favorable que l'adsorption d'un point de vue énergétique.

Les limites de cette technique ont incité à chercher d'autres alternatives pour former des films organiques structurés. Ainsi des méthodes d'auto-assemblage par voies de chimie de coordination des systèmes métal/phosphonate (Netzer and Sagiv 1983) ou de chimie covalente (Cao et al. 1992) ont permis de former des structures organisées.

D'autre part, des monocouches auto-assemblées (SAMs) peuvent être obtenues par formation de liaisons covalentes entre une surface et une molécule avec un groupement terminal réactif (thiol, disulphide, amine...) (Chaki and Vijayamohan 2002). Ces liaisons covalentes entre, par exemple, le soufre du groupement thiol et une surface en or, additionnées aux interactions

latérales entre les chaînes, conduisent à la formation de monocouches avec une régularité quasi parfaite au niveau moléculaire (Yan et al. 1997).

La conception de tous ces films reste cependant limitée par le petit nombre de molécules spécifiques disponibles. Un autre élément à prendre en compte est la présence de liaisons covalentes entre les différentes couches du film. Ceci limite les possibilités de fonctionnalisation avec des principes actifs en raison d'une possible dénaturation de ces molécules et donc d'une perte d'activité. De plus, il est difficile d'obtenir des réactions chimiques avec 100 % de rendements donc de conserver les mêmes densités de groupes fonctionnels d'une couche à l'autre. Un problème de reproductibilité dans les caractéristiques des films se pose alors.

Une alternative a consisté à utiliser les interactions électrostatiques afin d'élaborer des films nanostructurés. Ainsi, dès 1966, Iler utilisa des particules colloïdales chargées négativement ou positivement pour créer des films avec plusieurs couches et d'épaisseurs contrôlées (Iler 1966).

En 1980, Fromherz *et al.* élaborent des films multicouches à base de protéines et de polymères chargés, les polyélectrolytes, en utilisant un dépôt dit "couche par couche" (Fromherz 1980). Cette stratégie est développée en associant en multicouches l'héparine et des particules colloïdales cationiques, mais un problème de floculation des protéines à la surface apparaît après avoir atteint six paires de couches (Golander et al. 1982).

Au début des années 90, Decher *et al.* utilisent uniquement les polyélectrolytes pour réaliser des films en multicouches (Decher et al. 1992). La technique "couche par couche" (LbL, layer-by-layer) appliquée aux polyélectrolytes est simple d'utilisation. Facilement modulable, elle permet d'obtenir des films nanostructurés en se dégageant des problèmes de forme, de taille ou de composition du substrat de départ.

I.2.2.Principes fondamentaux

I.2.2.1. La méthode de construction couche par couche

Il est possible de recouvrir tout type de matériau par une couche de polyélectrolytes de charge opposée à celle de surface sachant qu'il existe des polyélectrolytes anioniques ou cationiques. Par exemple, si le matériau est une lamelle de silice, donc présentant des charges négatives à sa surface, on peut y adsorber une couche de polyélectrolytes en l'immergeant dans une solution de polycations.

Après ce dépôt, la surface n'est pas neutre mais chargée positivement à cause d'un phénomène de surcompensation. Cette surcompensation de charge a notamment été mise en évidence par Caruso (Caruso et al. 1998) et Ladam (Ladam et al. 2000) par détermination du potentiel zêta (ζ) de la surface. Cette expérience permet de mesurer les différences de charges après chaque adsorption. Ainsi, il est démontré qu'il n'existe pas une neutralité des charges lors de l'ajout de polyélectrolytes de charges opposées sur une couche de polyélectrolytes préexistante (figure I.3) (Hoogeveen et al. 1996; Caruso et al. 1998; Ladam et al. 2000; Burke and Barrett 2003).

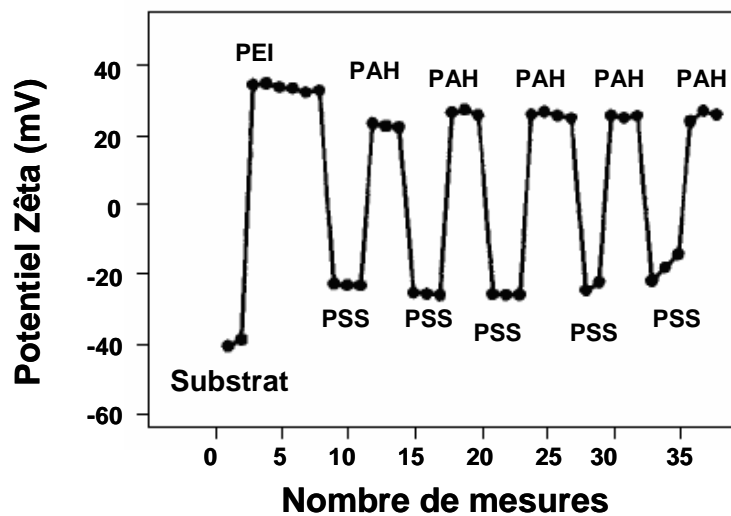


Figure I.3: Mesures de potentiel zêta (ζ). Evolution du potentiel ζ durant la construction d'un film multicouche PEI-(PSS-PAH)₅ avec des polyélectrolytes en solution à une concentration de 5 mg/mL. Une couche précurseur de PEI (poly(éthylène imine)), un polycation fortement chargé, est déposée en premier. Le potentiel ζ du verre passe d'une valeur négative à positive et illustre ainsi le recouvrement de la surface par le PEI et la surcompensation de charge. Il est alors possible de déposer un polyanion, le PSS (poly(styrène sulfonate)), pour continuer la construction du film multicouche. Le dépôt produit un potentiel ζ d'une valeur négative. Le polycation PAH (poly(allylamine hydrochlorydrique)) est ensuite déposé, et ainsi de suite. Après chaque dépôt de polyélectrolytes, plusieurs points de mesure sont réalisés (Ladam et al. 2000).

Cette surcompensation de charges représente la condition *sine qua non* pour pouvoir construire les multicouches de polyélectrolytes.

Grâce à cette première couche positive nouvellement formée, la surface de silice peut alors être immergée dans une solution de polyanions qui interagiront avec la première couche de polycations adsorbés préalablement à la surface. L'excédent de polyélectrolytes qui apparaît est enlevé par rinçage avec une solution tampon qui est le plus souvent l'éluant du polyélectrolyte. Il faudra toujours intercaler une étape de rinçage entre les étapes de dépôt de

polyélectrolytes pour permettre une désorption de complexes de polyélectrolytes faiblement adsorbés. Des hétérogénéités à la surface du film sont ainsi évitées grâce aux rinçages (Hoogeveen et al. 1996; Lvov et al. 1999).

Le dépôt de cette deuxième couche de polyélectrolytes induit une nouvelle inversion de charge en surface du film. La surface peut alors être immergée dans une solution de polycations, en suivant ce cycle un nombre n de fois jusqu'à l'obtention du nombre de couches total désiré. Un film multicouche de polyélectrolytes, noté (polycation-polyanion) $_n$, où n indique le nombre de paires de couches, est obtenu au final (figure I.4).

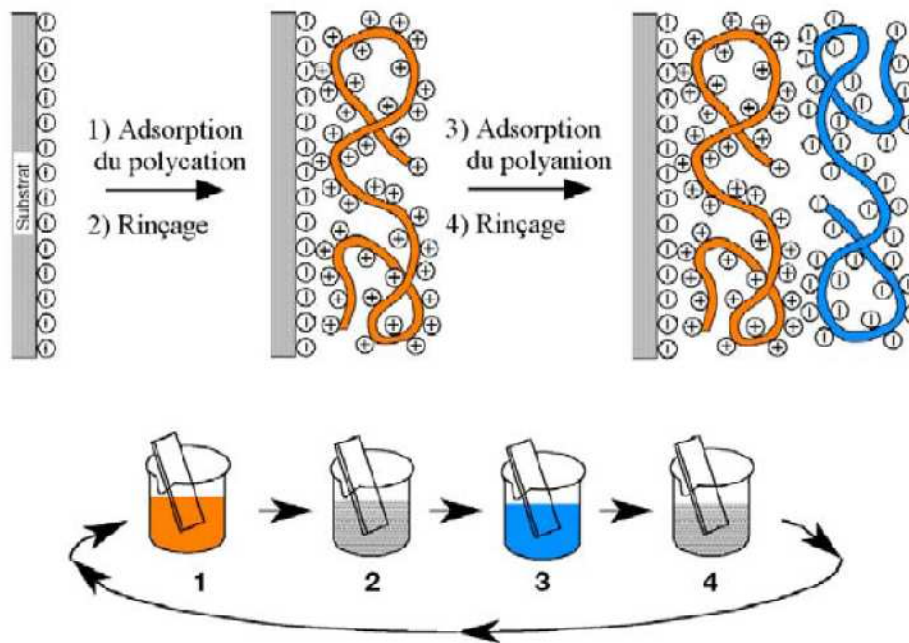


Figure I.4: Méthode couche par couche (layer-by-layer) pour la formation de films multicouches. Le substrat initial présente une charge de surface négative. Le substrat est immergé dans une solution de polycations (rouge) pour recouvrir la surface d'une première couche de polycations. Après une étape de rinçage (solution grise), la construction peut se poursuivre en trempant le biomatériau dans une solution de polyanions (bleue). Ensuite le cycle d'adsorption peut être répété à l'infini (Decher 1997).

La construction d'un film multicouche sur une surface peut être suivie par l'augmentation de son épaisseur au cours du processus de dépôts successifs. La technique de spectroscopie UV/visible est appropriée pour suivre l'évolution de la construction d'un film contenant du poly(styrène sulfonate) (PSS). En effet, les groupements styrènes propres au PSS ont un maximum d'absorption à une longueur d'onde de 225 nm. Lors des dépôts, une croissance linéaire de l'absorbance, qui est directement proportionnelle à la concentration en PSS (loi de Beer-Lambert), est observée (figure I.5). Elle est aussi directement proportionnelle au nombre

de couches déposées et prouve que les différents polyélectrolytes se déposent en alternance sur la surface.

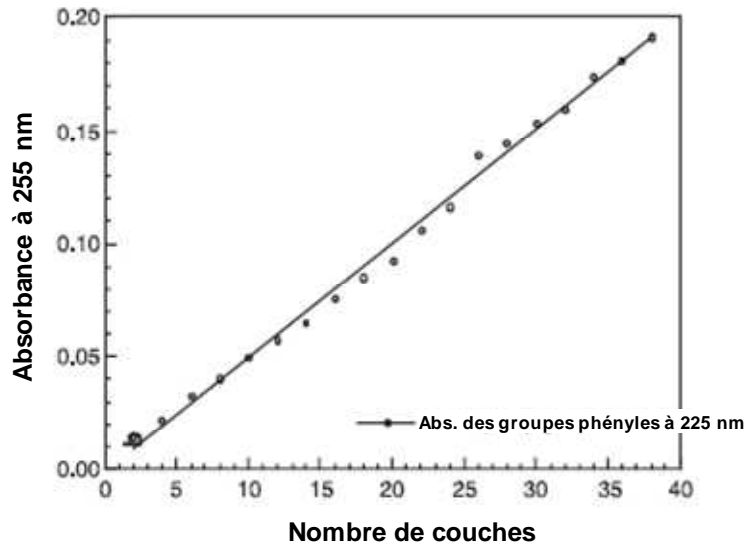


Figure I.5: Absorbance du PSS à 225 nm en fonction du nombre de couches déposées pour le système (PAH-PSS)₄₀. La droite correspond à l'ajustement linéaire des valeurs mesurées (Decher and Schlenoff 2003).

I.2.2.2. Les polyélectrolytes d'origine biologique

Les polyélectrolytes sont des macromolécules dont la majorité des unités constitutives possèdent des groupements ioniques, ionisables ou les deux.

Selon la constitution chimique des polyélectrolytes, des polyélectrolytes forts et faibles peuvent être définis. Les polyélectrolytes forts conserveront leur charge quelles que soient les conditions de pH et de force ionique, alors que les polyélectrolytes faibles auront une charge variable selon le pH de la solution. Ils sont alors définis par une constante d'acidité notée pK_A qui correspond au pH où les polyélectrolytes sont globalement neutres.

Les polyélectrolytes constituant les multicouches utilisées dans le but avéré d'applications dans le domaine biomédical sont généralement sélectionnés parmi les polyélectrolytes biologiques dont voici quelques exemples.

I.2.2.2.1. La poly(*l*-lysine)

Le polypeptide poly(*l*-lysine) (PL ℓ) utilisé dans la plupart de nos constructions est un polymère de *l*-lysine, un des 20 acides aminés constituant les protéines. Cette molécule est biodégradable et biocompatible (Ren et al. 2006). Elle est largement employée en biologie, notamment pour améliorer le transport protéique au travers des cellules (Shen and Ryser 1978) ou le transport de méthotrexate, un agent anti-métabolique (Ryser and Shen 1978). En raison de sa charge globale positive, ce polypeptide est aussi couplé à l'ADN dans le cadre du transfert de gènes (Wagner et al. 1990; Pouton et al. 1998; Farrell et al. 2007).

De plus, il a été prouvé que la PL ℓ ainsi que la PL d (poly(*d*-lysine)), déposées sur des surfaces, améliorent fortement l'attachement de nombreux types cellulaires (Yavin and Yavin 1974; Mazia et al. 1975) et ce même dans le cas de conditions de culture drastique : pauvre en sérum (McKeehan and Ham 1976), voire déplétée en sérum (Koper et al. 1984). La PL ℓ est une molécule adhésive pour les cellules de façon non spécifique et " récepteur indépendante " (Ryser et al. 1982). Ce polymère linéaire à longue chaîne sert donc à recouvrir le plastique des boîtes de culture cellulaire pour améliorer l'adhésion cellulaire par des interactions électrostatiques non spécifiques (Jacobson and Branton 1977). Ce recouvrement par de la PL ℓ de boîtes de culture en polystyrène permet de modifier la charge de surface initialement négative (La Rocca and Barker 1996; Dewez et al. 1999; Debatosh et al. 2001). Les interactions électrostatiques ainsi créées amorcent l'attachement cellulaire puisque la membrane plasmique négative¹ va interagir avec la surface rendue positive.

Au sein du laboratoire, des mesures de force de détachement de cellules par micropipette ont confirmé ces résultats. Les cellulesensemencées sur une multicouche terminant par une couche de PL ℓ nécessitent une force plus importante pour être détachées que cellesensemencées sur une multicouche terminant par le poly(acide *l*-glutamique) (PGA ℓ) (Richert et al. 2004a).

¹ Le gradient électrochimique d'une cellule vivante de -210 mV et la constitution de la membrane cellulaire asymétrique avec une préférence des phospholipides chargés positivement (phosphatidylcholine, sphingomyéline) pour l'extérieur expliquent la charge nette positive en surface de la membrane plasmique. Cependant, la cellule est entourée d'une enveloppe cellulaire ou glycocalyx constituée entre autres de résidus d'acide N-acétylneuraminique (sialique) dans les gangliosides (un glycolipide) ou dans les glycoprotéines qui confèrent une charge distinctement négative à sa surface (Darnell, Lodish et al. 1989; Alberts, Bray et al. 1998; Voet and Voet 1998).

I.2.2.2.2. Le poly(acide glutamique)

Polymère non saccharidique, le PGA est composé de monomères d'acide glutamique, un des 20 acides aminés constituant les protéines humaines (comme la lysine précédemment citée), ce qui lui confère ses caractères biocompatible et biodégradable.

La biocompatibilité du PGA a ainsi été mise en évidence avec des ostéoblastes humains (SaOS-2) et des fibroblastes primaires du ligament périodontal (PDL) (Tryoen-Toth et al. 2002). L'adhérence des chondrosarcomes (HCS-2/8) a également été testée sur des multicouches ayant pour couche terminale le PGA. Les cellules sont plus étalées et présentent des points focaux d'adhésion préférentielle sur les films terminés par PGA (Vautier et al. 2002).

Enfin les macrophages ont la capacité de dégrader des films PL ℓ -PGA pour accéder à la protéine A préalablement enfouie lors de la construction du film. Ces cellules produisent probablement les protéases spécifiques permettant la dégradation de ces poly(acides aminés) (Jessel et al. 2003).

I.2.2.2.3. L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (HA) est un polysaccharide polyanionique composé de N-acétyl-*d*-glucosamine et d'acide β -glucuronique. Il appartient à la famille des glycosaminoglycanes. Ce composé se trouve dans la synovie, dans la matrice extracellulaire et dans le corps vitré de l'œil (Grigorij et al. 2007). Il joue un rôle structural et mécanique primordial dans les tissus en raison de ses propriétés rhéologiques et viscoélastiques (Laurent 1998; Garg and Hales 2004) et intervient au cours de nombreux processus, comme la formation de métastases dans certains types de tumeurs (Sophia et al. 2005), l'inflammation, et l'embryogénèse (Girish and Kemparaju 2007).

Ce composé a déjà trouvé de nombreuses applications biologiques dont nous ne citerons ici que les plus cliniques. Le HA est, entre autres, utilisé en cosmétologie et en chirurgie réparatrice car il participe à l'hydratation des tissus et au transport de l'eau. Il peut également être injecté dans les zones cibles dans le cas d'arthrose (Hyalgan®, Expanscience, France) ou de blessures à l'œil (Vitrax®, Allergan France). Il est alors utilisé sous forme d'hydrogel afin d'éviter la diffusion hors de la zone à traiter. Il est aussi envisagé comme vecteur pour l'administration de médicaments (Lapcik et al. 1998; Luo et al. 2000; Yong-Hong et al. 2005).

Il a été démontré qu'un tissu lésé est riche en HA lors des premiers jours suivant la blessure. Le HA aurait donc une action pro-inflammatoire. Ainsi la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- α (tumor necrosis factor- α) et IL-1 β (interleukin-1 β) dépend directement de la concentration tissulaire en HA (Chen and Abatangelo 1999; Pajulo et al. 2001). Cependant, le HA peut être modifié par réticulation ou composé sous une forme à haut poids moléculaire : il a alors des effets antiprolifératifs (Heublein et al. 2002) ou anti-inflammatoires (Wang et al. 2006) non négligeables.

Sans plus rentrer dans les détails, le HA est un biomatériau idéal pour les multicouches de polyélectrolytes puisque déjà couramment utilisé en médecine.

Dans le cadre particulier des multicouches, il a été précisément étudié dans des films en association avec le polycation PL ℓ (Picart et al. 2001; Picart et al. 2002; Lavallo et al. 2004a). Entre autres applications, les films PL ℓ -HA peuvent être chimiquement réticulés pour améliorer l'adhésion cellulaire tout en évitant une dégradation par des enzymes spécifiques telles les hyaluronidases (Richert et al. 2004b). Ces films très hydratés ont également la capacité d'être chargés en fortes concentrations avec différents types de protéines (Ladam et al. 2001) et des médicaments (Thierry et al. 2003a; Thierry et al. 2003b).

I.2.2.2.4. Le chitosan

Ce polysaccharide chargé positivement est obtenu par déacétylation de la chitine, un des composants principaux de l'exosquelette d'insectes ou d'arthropodes et de l'endosquelette des céphalopodes. Il est couramment retrouvé en médecine en raison de sa nature biocompatible et biodégradable (Kumar et al. 2004).

Le chitosan (CHI) a déjà été utilisé sous forme de gel pour injecter de la chlorhexidine, un antiseptique, au niveau parodontal (Ikinici et al. 2002), ou encore pour le relargage de médicaments hydrosolubles encapsulés (Hyung Park et al. 2006). De plus, il a été testé en ingénierie tissulaire, démontrant alors une intégration aisée dans le corps (Francis Suh and Matthew 2000).

Le CHI couplé au dextran sulfate a permis de former un film multicouche avec des propriétés pro ou anticoagulantes selon le taux de sel utilisé lors de la construction (Serizawa et al. 2002). Une autre étude récente démontre que le film multicouche CHI-HA possède des propriétés antimicrobiennes permettant d'obtenir des surfaces antiadhérentes aux bactéries (Richert et al. 2004c).

I.2.2.3. Interactions mises en jeu lors de la construction du film

La première interaction envisagée lors de la construction du film est logiquement l'interaction électrostatique puisque le postulat de base pour la formation de films multicouches est la présence de molécules chargées (Lvov et al. 1995).

L'adsorption physique ou physisorption des chaînes polymériques sur le biomatériau peut être divisée en deux étapes : une étape initiale rapide où les chaînes s'ancrent à la surface de charge opposée et une deuxième étape plus lente de relaxation où les chaînes se compactent entre elles (Dubas and Schlenoff 1999; Lee et al. 2001). Les interactions électrostatiques influencent fortement la conformation et les cinétiques d'adsorption des polyélectrolytes, la distribution des segments chargés et le taux de polymères chargés adsorbés. Beaucoup de paramètres peuvent modifier cette adsorption dont le caractère électrochimique propre des polyélectrolytes, la densité de charges de la surface, le pH et la force ionique de la solution (Dubas and Schlenoff 1999; Schwarz et al. 1999).

L'importance des interactions électrostatiques apparaît lors de la modification des forces ioniques (Lvov et al. 1993), du pH (Shiratori and Rubner 2000) ou de la température (Salomäki et al. 2005). Le fait d'augmenter la force ionique lors de la construction, de diminuer la densité de charges du polyélectrolyte (en se plaçant à un pH proche de son pKa), ou d'augmenter la température conduit à un gonflement du film. Ainsi, à faible concentration saline, le polyélectrolyte présente une grande longueur de persistance en raison des répulsions entre ses propres charges, alors qu'à forte concentration saline, l'écrantage de ses charges lui confère une conformation plus compacte et dite " en pelote ".

L'utilisation d'ions chaotropiques (sels sodiques de perchlorate ClO_4^- , thiocyanate SCN^- , iodure I^- , nitrate NO_3^- , bromure Br^- , chlorate ClO_3^- , chlorure Cl^- , bromate BrO_3^- , méthanoate HCOO^- , et fluorure F^-) comme contre-ions des polyélectrolytes permet aussi ce gonflement. En raison de la présence de ces ions, les polyélectrolytes en solution sont moins ordonnés, plus compactés, ce qui conduit à la formation de films plus épais (Salomaki et al. 2004).

Toutefois, les interactions électrostatiques ne sont généralement pas les seules forces mises en jeu lors de la construction de multicouches. Les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes sont également des interactions permettant le dépôt couche par couche pour certains types de polyélectrolytes.

Ainsi, en utilisant des polyélectrolytes très peu chargés, des films multicouches de poly(acrylamide) et de poly(acide acrylique) à pH 3,0 ont été formés en impliquant des liaisons hydrogènes entre les chaînes (Yang and Rubner 2002).

D'autre part, Kotov a présenté une étude tendant à prouver que, sans la participation d'interactions hydrophobes, il n'y aurait pas de construction de film multicouche. Les interactions hydrophobes peuvent donc être considérées comme une force contribuant à l'adsorption couche par couche (Kotov 1999). Ceci explique pourquoi un film multicouche stable peut être formé sur des substrats constitués de polymères hydrophobes (Delcorte et al. 1997).

I.2.2.4. Modes de croissance

Lors du dépôt des polyélectrolytes, les cinétiques de croissances de l'épaisseur et de la masse du film peuvent être suivies à l'aide de différentes techniques : réflectométrie, microbalance à cristal de quartz (QCM-D = Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring), ellipsométrie, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, spectroscopie optique par guide d'onde (OWLS = optical waveguide lightmode spectroscopy)... A partir de mesures réalisées avec ces différents appareillages, deux modes de croissance ont été mis en évidence : un mode linéaire et un mode exponentiel. Cela signifie que la masse ou l'épaisseur du film évoluent en suivant un régime de croissance linéaire ou exponentiel avec le nombre de couches déposées.

I.2.2.4.1. Mode de croissance linéaire : le modèle des trois zones

Pendant la construction d'un film multicouche, les différentes couches déposées vont interagir au moyen de différents types d'interactions (électrostatiques, hydrophobes...). La croissance de la multicouche en masse et en épaisseur peut être directement proportionnelle au nombre de couches adsorbées. Elle est alors qualifiée de linéaire.

Ce type de construction va conduire à la constitution d'une structure en trois zones comme schématisée sur la figure I.6. En effet, des zones différentes vont apparaître lors de la formation du film. Selon son environnement proche, chaque polyélectrolyte va déterminer ces zones. Ainsi les polyélectrolytes déposés dans les premières paires de couche, à proximité du substrat de départ, vont interagir avec ce substrat et former la zone I, zone précurseur. Les polyélectrolytes déposés dans les dernières paires de couche en fin de construction du film, à l'interface film/air ou film/solution, forment la zone III, zone externe. Ces deux zones I et III conservent la même épaisseur tout au long du processus de construction. Entre les deux se trouve la zone II, un " noyau ", où les polyélectrolytes interagissent entre eux seulement. La

zone II va croître selon le nombre de multicouches déposées. Il est à noter que les frontières entre ces différentes zones sont diffuses (Ladam et al. 2000).

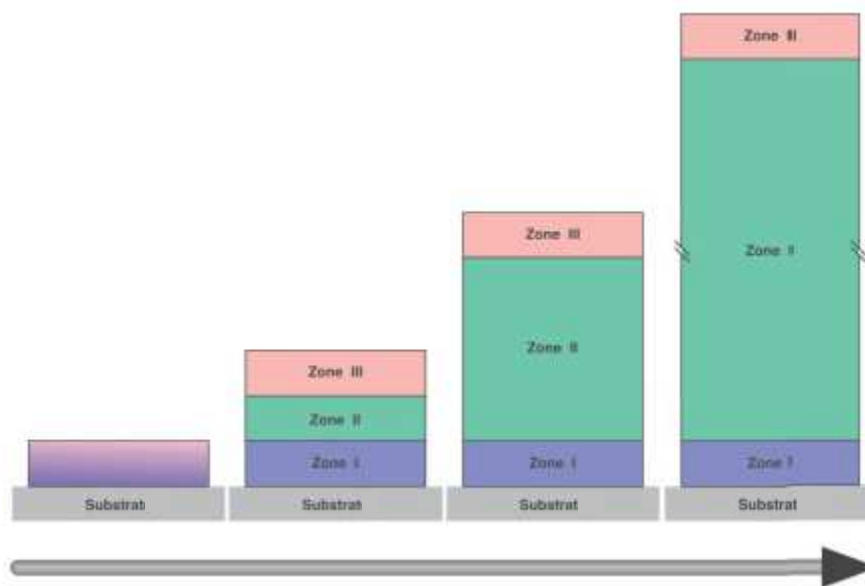


Figure I.6: Modèle des trois zones. La flèche suit le cheminement de la formation des multicouches. Au départ, peu de couches sont déposées et elles interagissent avec le substrat et la solution. Ensuite les zones formées sont la zone I : zone précurseur, la zone II : zone noyau, et la zone III : zone externe. Les frontières réelles entre ces différentes zones sont diffuses a contrario du schéma (Decher and Schlenoff 2003).

Plus précisément, lors du dépôt des premières couches sur le substrat nu, les polyélectrolytes interagissent avec le substrat et la solution, ou le substrat et l'air, ce qui correspond à une étape intermédiaire avec la formation de la zone I. Une étude récente permet de comprendre les événements transitoires lors des premières étapes de dépôt et démontre que le film suit une croissance exponentielle avant de suivre un mode linéaire (Wang 2006).

Après quelques dépôts, les différentes zones apparaissent. A partir du moment où la zone I et III ont atteint leur épaisseur, la zone II sera la seule à s'agrandir. Lors du dépôt d'une couche de polyélectrolytes, des polyélectrolytes jusqu'alors en zone III, en contact avec la solution, vont se retrouver enfouis dans la structure et ainsi appartenir à la zone II. La zone II verra alors sa taille augmenter alors que la zone III restera identique. C'est dans la zone III que se situe le phénomène de surcompensation vu en potentiel ζ . En zone II, les polyélectrolytes sont au ratio 1/1 et forment une sorte de polyzwitterion neutre puisque les charges se compensent exactement. Enfin, il est difficile de préciser le nombre de couches constituant chaque zone, celui-ci variant selon la nature des polyélectrolytes, du substrat, de la solution, et des interactions en place (Decher and Schlenoff 2003).

Decher a prouvé que ces films à croissance linéaire étaient partiellement stratifiés. Des expériences de réflectivité des neutrons utilisant des polyélectrolytes deutérés décrivent la présence de pics de Bragg (Decher 1996; Decher 1997). Ce phénomène signifie que les polyélectrolytes ne diffusent pas après dépôt et restent positionnés au niveau de la couche où ils ont été déposés. Il n'y a pas d'échange entre les couches même si elles s'interpénètrent entre elles. Les couches sont donc décrites comme des strates qui seraient causées par la forte densité de ces films auto-assemblés.

I.2.2.4.2. Modes de croissance super-linéaire ou exponentielle

En augmentant la force ionique des solutions utilisées pour dissoudre les polyélectrolytes constituant les films multicouches PSS-PAH ou PDADMA²-PSS, l'apparition d'un mode de croissance super-linéaire a pu être décrite (Ruths et al. 2000; McAloney et al. 2001). Cette croissance du film avec le nombre de couches suit un régime plus important qu'un régime linéaire et semble due à l'augmentation de la rugosité de surface. Cette rugosité entraîne alors une augmentation du taux d'adsorption.

L'incrémentation d'épaisseur et de masse de certains films multicouches peut également suivre un régime de croissance obéissant à une loi exponentielle. Ceci est le cas avec des polyélectrolytes faibles comme la PL ℓ (pKa = 9) et l'alginate (pKa = 4) où l'épaisseur atteint 150 nm après le dépôt de 15 paires de couches (mesure réalisée par ellipsométrie après séchage de l'échantillon) (Elbert et al. 1999). D'autres études, l'une avec le film poly(ℓ -lysine)-poly(acide glutamique) PL ℓ -PGA (Lavalle et al. 2002), l'autre avec le film de poly(ℓ -lysine)-acide hyaluronique PL ℓ -HA (Picart et al. 2001; Picart et al. 2002), décrivent également un régime de croissance exponentielle. Les épaisseurs sont de l'ordre du micromètre après le dépôt de 10 paires de couches (mesure en phase liquide) en comparaison à l'épaisseur de 120 nm pour un film (PAH-PSS)₁₅ (mesure effectuée en phase liquide au laboratoire). Ces films semblent moins structurés que les films de type " linéaire " et sont très hydratés.

Nous nous arrêterons sur le cas précis du film PL ℓ -HA, celui-ci correspondant à l'un des films sélectionnés pour insérer les principes actifs dans nos travaux. Grâce aux importantes épaisseurs obtenues pour des nombres de couches faibles (4 μ m d'épaisseur pour un film de

² PDADMA = poly(diallyldiméthylammonium)

(PL ℓ -HA)₂₀), la microscopie confocale peut être utilisée pour visualiser les sections de ces films (résolution selon l'axe z de l'ordre de 300 nm). L'imagerie confocale permet ainsi de visualiser la structuration le long de la section du film après marquage fluorescent des polyélectrolytes. Des chaînes de PL ℓ marquées avec le fluorophore vert fluorescéine isothiocyanate (PL ℓ^{FITC}) et des chaînes de HA marquées avec le fluorophore rouge Texas Red (HA^{TR}) sont utilisées pour créer des architectures telles (PL ℓ -HA)₂₅ avec la 19^{ème} paire de couches composées des deux fluorophores. La section du film visualisée en microscopie confocale apparaît entièrement verte avec un trait rouge au milieu du film (figure I.7).

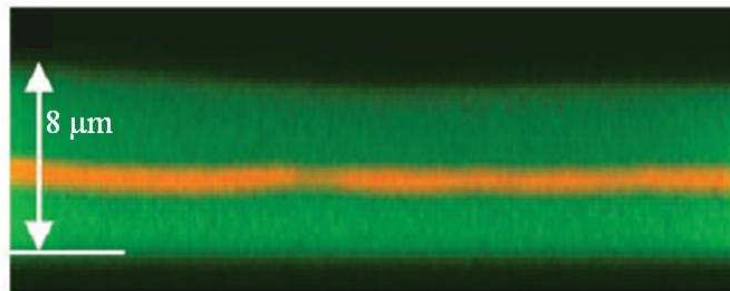


Figure I.7: Observation par microscopie confocale du film (PL ℓ -HA)₂₅ avec la 19^{ème} paire de couche marquée PL ℓ^{FITC} -HA^{TR}. L'épaisseur du film est de 8 μm . Le trait blanc figure l'emplacement de la surface de dépôt. La taille de l'image est de 36,6 x 14,8 μm^2 (Picart et al. 2002).

Il y aurait donc diffusion de la PL ℓ^{FITC} dans toute l'épaisseur du film alors que le HA^{TR} reste localisé à l'endroit de son dépôt, au niveau de la paire de couches 19 dans ce cas de figure. Ces comportements semblent être généralisables aux polyélectrolytes non greffés avec des fluorophores (Picart et al. 2002).

D'autre part, la technique par spectroscopie optique par guide d'onde permet de suivre la construction d'un film multicouche dans la limite d'une épaisseur inférieure à environ 800 nm. Or, cette technique détecte une variation du signal optique lors du dépôt de PL ℓ sur un film (PL ℓ -HA)₁₅ d'une épaisseur totale supérieure à 1 μm . Ces résultats suggèrent que la composition des couches inférieures est modifiée lors du dépôt des couches suivantes. Les premières observations en microscopie confocale décrites préalablement, où la diffusion de PL ℓ à travers toute la section du film été mise en évidence, sont ainsi confirmées (Picart et al. 2001; Picart et al. 2002).

Le mécanisme de construction des films PL ℓ -HA peut être subdivisé en 6 étapes (figure I.8).

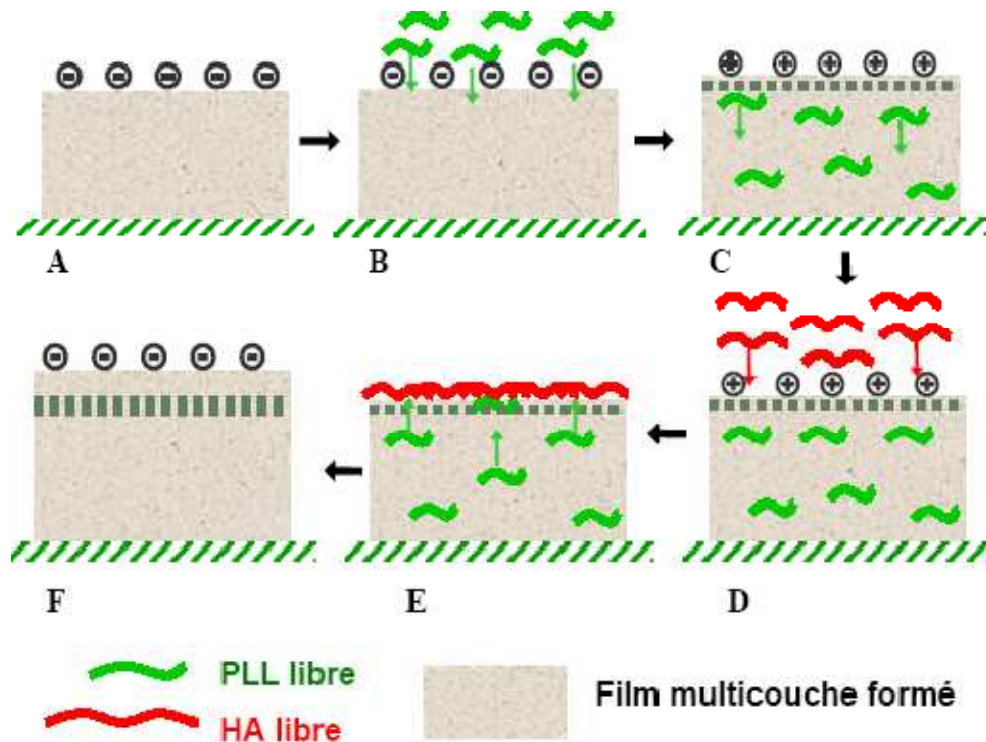


Figure I.8: Modèle de croissance exponentielle. La lecture du schéma se fait dans le sens des flèches. (A) Film multicouche en formation après dépôt de HA et rinçage (B) Etape de dépôt de la PLL (C) Lors du dépôt de PLL et du rinçage, la PLL libre diffuse verticalement dans toute l'épaisseur du film. Elle est donc mise en réserve. La surface devient alors positive en raison du phénomène de surcompensation. (D) Dépôt de HA (E) Lors du dépôt de HA et du rinçage, des interactions ont lieu entre le HA libre et la PLL en surface mais aussi dans le volume de la multicouche, qui agit ici comme un réservoir de polycations. (F) Film multicouche A avec une paire de couches supplémentaire. (Richert et al. 2004c)

Tout d'abord, le dépôt de PLL sur une multicouche en cours de construction et chargée négativement aboutit à une surface chargée positivement à cause de la surcompensation des charges, comme vu précédemment. Or ces chaînes de polyelectrolytes ont la capacité de diffuser dans toute l'épaisseur du film ("diffusion in"). Un réservoir de PLL est ainsi créé, qui persiste après l'étape de rinçage. En effet, il existe une barrière de potentiel du fait de la surcompensation qui empêche la libération de la PLL hors du film (Lavalle et al. 2004a).

Le polyanion HA, déposé ensuite, va s'adsorber exclusivement à la surface du film déjà formé en interagissant avec la PLL en surface, le HA n'étant pas une espèce diffusive. Cependant, les chaînes libres de HA vont aussi attirer les polycations jusqu'alors enfouis dans les couches profondes de la multicouche ("diffusion out"). Ceci aboutit à la formation d'une nouvelle couche d'épaisseur plus importante que la couche résultante du simple dépôt de HA sur la PLL préalablement adsorbée en surface. Ainsi, plus on dépose de paires de couches, plus

l'épaisseur du film augmente, plus la concentration en " espèces libres " dans le réservoir est élevée, plus les chaînes de HA en solution ont de polycations libres avec lesquels interagir ; d'où une croissance de type exponentiel. A la fin du cycle, les espèces libres se sont en grande partie complexées avec les chaînes de HA pour former la couche extérieure.

La diffusion d'un ou des deux polyélectrolytes représente le point décisif pour le basculement d'un mode linéaire à un mode exponentiel. Lavallo *et al.* ont précisément défini le mode d'assemblage du film PLL-PGA à croissance exponentielle. Dans ce cas, les deux polyélectrolytes semblent diffuser, mais le mécanisme de formation du film ne change pas (Lavallo et al. 2004b).

Cependant un film à croissance exponentielle peut subir une transition d'un mode de croissance exponentielle à un mode linéaire après un grand nombre de couches déposées (Hübsch et al. 2004). Cette croissance linéaire après une phase exponentielle montre des incréments d'épaisseurs beaucoup plus importants (centaines de nanomètres) que lors de la construction de films à croissance linéaire simple (quelques nanomètres). La transition s'établirait quand les polyélectrolytes libres ne diffusent plus dans la totalité de la section du film en raison d'une probable densification du film au cours des étapes de dépôts. Il y aurait une restructuration graduelle de la multicouche qui bloquerait la diffusion des polyélectrolytes. Après le dépôt d'un grand nombre de couches, une structure comportant les 3 zones du modèle linéaire serait obtenue. La zone II représenterait alors une zone de restructuration où les molécules libres ne diffuseraient plus et la zone III correspondrait à la zone de diffusion (Salomaki et al. 2005).

En première approximation, la transition entre une croissance exponentielle et linéaire semble se situer au moment où le film dépasse une épaisseur de 150 à 250 nm à l'état sec. Cette transition est atteinte par un nombre différent de couches déposées, selon la nature des polyélectrolytes utilisés (Porcel et al. 2007).

I.2.2.5. Les techniques de construction

Différentes techniques sont disponibles pour construire les films multicouches.

On peut manuellement réaliser toutes les étapes décrites sur la figure I.4 ce qui correspond au " dip-coating " ou " dipping ", soit une méthode d'adsorption par immersion du substrat dans les différentes solutions.

D'autre part, il existe une technique utilisant un bras automatisé. Il permet d'immerger le matériau dans différents récipients contenant les solutions en suivant une séquence

programmée. Cette méthode constitue le " dipping robot ". Grâce à l'automatisation, des films sont aisément obtenus comportant des nombres de paires de couches supérieurs à 30 et surtout avec une bonne reproductibilité.

Il est aussi possible de nébuliser les solutions, c'est-à-dire de projeter les solutions sous forme de gouttelettes très fines. En réalisant la construction par sprays alternatifs, les films obtenus sont identiques aux films construits par " dip-coating " d'un point de vue épaisseur, topologie de surface, composition chimique et sont hautement reproductibles (Schlenoff et al. 2000). D'autre part, il a été démontré récemment que les solutions peuvent être nébulisées de façon simultanée pour un film PAH-PGA pour obtenir au final un film homogène. Ces films, qui ne sont pas à strictement parler des films multicouches, présentent un régime de croissance linéaire au lieu du régime exponentiel obtenu habituellement lors du dépôt couche par couche (Porcel et al. 2005). La technique du nébuliseur permet un gain des temps en accélérant les cinétiques de dépôts.

Le " spin coating ", ou dépôt par centrifugation, se base sur l'utilisation d'un plateau rotatif supportant le substrat. La solution de polyélectrolytes est déposée sur le substrat en rotation. Le liquide va s'étaler sur la surface de manière homogène par la force centrifuge. Cette technique permet de diminuer fortement le temps d'assemblage car l'étape de rinçage n'est plus nécessaire et les temps de " dépôt " sont réduits à seulement quelques secondes (Lee et al. 2001). On obtient un film très structuré multistrat grâce à ce procédé (Cho et al. 2001).

I.2.2.6. Applications des films multicouches de polyélectrolytes

Outre de nombreuses applications biomédicales basées sur les films multicouches, il existe diverses applications dans les domaines de l'industrie et de la chimie (Tang et al. 2006).

Le développement de matériaux super-hydrophobes est à l'étude pour des applications dans le domaine de surfaces auto-nettoyantes et anti-buées. Elles sont produites par assemblage de PEI (poly(éthylène imine)), PAH (polyallylamine hydrochloride) et de nanoparticules anioniques de polystyrène suivi par immersion dans du nafion (polymère hydrophobe composé d'un squelette formé de groupements CF_n sur lequel sont branchés des groupements d'acides sulfoniques) (Sangri et al. 2005). L'assemblage de multicouches à partir de nanotubes en argile avec des polyélectrolytes perfluorinés aboutit également à une surface hydrophobe (Jisr et al. 2005).

Des capteurs biologiques³ (" biosensors " en anglais) représentent une autre application potentielle des multicouches. Grâce à ces biocapteurs, il est possible de détecter un grand nombre de molécules diverses contenues dans une solution : des sucres (Zhang et al. 2004), des agents toxiques (Sultana et al. 2005), le cholestérol (Ram et al. 2001) ou encore des anticorps (Caruso et al. 1997). Les multicouches sont alors généralement utilisées pour optimiser la détection à la surface.

L'acide *l*-ascorbique a pu être différencié de l'acide *d*-ascorbique par passage ou non au travers un film multicouche (Rmaile and Schlenoff 2003). De nombreuses autres molécules peuvent être séparées par cette méthode, notamment des gaz (Stroeve et al. 1996).

Le champ d'application des films fins auto-assemblés multicouches s'étend encore au domaine de l'optique non linéaire (Heflin et al. 1999), à des dispositifs électroluminescents contenant des nanocristaux (" quantum dots " en anglais) (Rogach et al. 2000), aux recouvrements avec des polymères conducteurs (Cheng et al. 1994), ou à l'industrie du papier (Eriksson et al. 2006).

³ Une électrode, le cristal d'une microbalance à cristal de quartz (QCM), un microlevier d'un microscope à force atomique (AFM), etc., sont recouverts de films multicouches constitués d'un élément présentant une affinité spécifique pour le substrat à détecter et à quantifier en solution. Par exemple, une électrode peut être recouverte par une famille d'enzymes, les oxydo-reductases, grâce à un film multicouche. On dépose sur l'ensemble une solution avec des substrats spécifiques à ses enzymes ainsi que des médiateurs électriques du système, s'ils n'ont pas déjà été intégrés au film. Le substrat est converti en sa forme réduite ou oxydée alors que l'enzyme qui a permis la catalyse, est oxydée ou réduite respectivement. Les médiateurs électriques, des couples redox, jouent alors leur rôle pour que l'enzyme revienne à sa forme initiale. Les changements de forme de ses médiateurs sont détectés par l'électrode sous-jacente et vont correspondre directement à la quantité de substrats en solution. Pour la QCM, le fait que le substrat se lie au film va être directement détecté étant donné qu'il y aura une variation de la masse du cristal. La détection peut être aussi basée sur une coloration particulière du surnageant (Stanecki, McShane et al. 2003).

I.2.3. Les films multicouches de polyélectrolytes en biologie

I.2.3.1. Modulation des propriétés de surfaces

De nombreuses méthodes permettent l'obtention de multicouches sur n'importe quelle surface, de manière automatisée voire même stérile. Il est donc possible de recouvrir des particules colloïdales (Caruso and Möhwald 1999), des prothèses de hanche (Pavoor et al. 2006), ou encore la face interne d'une prothèse vasculaire par perfusion intraluminale des solutions (Jordan et al. 2006).

En modifiant la composition des films de polyélectrolytes et ainsi en modulant leur hydrophobicité, il a été mis en évidence que des cellules musculaires lisses vasculaires colonisaient préférentiellement des surfaces hydrophobes (Salloum et al. 2005).

Les multicouches de polyélectrolytes, une fois construites, peuvent être modifiées par une réticulation chimique ; des liaisons covalentes sont alors formées entre les chaînes de polyélectrolytes. Suite à cette modification de surface, des chondrosarcomes ont été ensemencés avec succès sur un film multicouche PL ℓ -HA. Ce film est antiadhésif avant réticulation à cause de sa forte hydrophilicité et son comportement d'hydrogel. La charge de surface du film multicouche n'est pas modifiée après réticulation (Richert et al. 2004b). La réticulation rigidifie la structure ce qui favorise l'adhésion des cellules sur ces surfaces rendues plus "dures". En effet, il a été prouvé que des cellules épithéliales ou fibroblastiques proliféraient sur des surfaces rigides plutôt que molles (Pelham and Wang 1997). Les films réticulés PL ℓ -HA sont donc plus rigides que les films natifs (Collin et al. 2004) mais leur module d'Young demeure cependant faible par rapport au verre (400 kPa comparé à 70 GPa). Cet effet de l'élasticité sur l'adhésion cellulaire a été analysé précisément. En résumé, le fait de réticuler les films permet d'augmenter le module d'Young, d'augmenter la rigidité du film, ce qui a une action positive sur l'adhésion, la prolifération et l'étalement des cellules ensemencées sur ce biomatériau. La topographie déterminée par microscopie à force atomique (AFM) montre que la surface d'un film réticulé est plus rugueuse qu'un film natif (Schneider et al. 2006). De plus, des films CHI-HA réticulés sont biocompatibles et biodégradables et persistent plus longtemps *in vivo* (Etienne et al. 2005; Picart et al. 2005b).

Tous les moyens pour rigidifier un film natif sont donc à tester pour améliorer l'adhésion cellulaire. La modification du pH lors de la formation du film entre 2,5 et 6,5 permet une augmentation de 7,5 fois le module d'Young (Thompson et al. 2005).

Une rigidification des films multicouches peut être aussi obtenue par insertion de nanoparticules (Koktysh et al. 2002), de nanotubes (Mamedov et al. 2002), ou encore d'argile pour mimer la structure " briques et mortier " de la nacre ou de l'os (Tang et al. 2003).

Les réticulations thermiques sont également envisageables (Ferreira et al. 1994; Fou et al. 1996) mais elles peuvent engendrer une dénaturation des polypeptides ou des polysaccharides constitutifs du film ou des biomolécules éventuellement intégrées dans le film. Cette voie est donc rarement choisie pour rigidifier les multicouches.

La photoréticulation des films multicouches est également réalisable grâce à un agent de couplage photosensible libre ou lié aux polyélectrolytes qui sera irradié à une longueur d'onde donnée (Chen and Abatangelo 1999). Le procédé a été amélioré en contrôlant l'intensité de la lumière UV par des masques plus ou moins opaques. Ainsi la surface est microstructurée par photolithographie avec des zones plus ou moins réticulées donc plus ou moins adhérentes aux cellules (Wong et al. 2003) ou adhérentes à des billes de polystyrène (Shi et al. 2005).

Il est aussi possible de se débarrasser de toute surface grâce à la nanotechnologie. Des " hollow capsules ", en traduction littérale des sphères creuses, sont obtenues en créant autour d'une nanoparticule solide un film multicouche. Le noyau est ensuite dissout grâce à une solution qui ne perturbera pas la multicouche (Sukhorukov et al. 1998). L'intégration de principes actifs se fait alors par modification du pH (Balabushevich et al. 2003; Dejugnat et al. 2005) ou par changement du surnageant (Lvov et al. 2001).

Par exemple, des " hollow capsules " sont créées avec du chitosan et de l'alginate pour libérer la doxorubicin, un anticancéreux, avec une augmentation de l'efficacité de la doxorubicin par rapport au médicament libre (Zhao et al. 2007).

Enfin il émerge un nouveau type de films autosupportés (" freestanding "). Ils sont construits soit sur des surfaces sacrificielles par la suite comme pour les hollow capsules (Lavalle et al. 2005), soit directement sur une grille de microscopie électronique (Mallwitz and Laschewsky 2005).

I.2.3.2. Fonctionnalisation par incorporation de molécules actives

De nombreuses molécules sont susceptibles d'entrer dans la composition des films. En outre, une grande variété de principes actifs peut être intégrée dans ces films multicouches afin de les fonctionnaliser et d'obtenir un matériau bioactif. Une des caractéristiques majeures de cette fonctionnalisation est l'intégration des biomolécules avec le maintien de leur activité. Une protéine conserve son activité même si sa structure secondaire est modifiée dans le film

selon des études par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée (ATR-FTIR) (Schwinté et al. 2002). Ainsi, par exemple, l'enzyme glucose oxydase conserve 80 % de son activité suite à l'enfouissement. De plus, elle tolère mieux les différences de conditions externes appliquées, comme une augmentation du pH ou de la température (Onda et al. 1999).

Des protéines diverses (Ladam et al. 2001) dont la protéine A (Jessel et al. 2003), des médicaments tels le piroxicam (Benkirane-Jessel et al. 2004b), ou l'héparine (Thierry et al. 2003b), du lipopolysaccharide (LPS) (Jessel et al. 2004; Le Guen et al. 2007), des virus (Lvov et al. 1994), ou de l'ADN (Vazquez et al. 2002; Jessel et al. 2006), ont ainsi pu être insérés dans les multicouches. Le terme de réservoir est adapté à ce système puisque la molécule, une fois insérée, se maintient dans la multicouche malgré les multiples rinçages et l'ajout de multicouches en surface du film (Vodouhê et al. 2006). Ensuite les principes peuvent diffuser passivement dans le surnageant. Le phénomène est alors dépendant de stimulus comme le pH (Wood et al. 2005), la température (Serpe et al. 2005), la force ionique (Antipov et al. 2003), ou encore la liaison spécifique d'une molécule de biotine à l'avidine (Inoue et al. 2005). Lors de l'ensemencement de cellules en surface du film, les cellules seront donc directement en contact avec les molécules dans le surnageant. Dans d'autres cas, les cellules accèdent aux biomolécules insérées après avoir dégradé le film ou formé des pseudopodes au travers des porosités (Chluba et al. 2001; Benkirane-Jessel et al. 2004a).

Les facteurs de croissance constituent la classe la plus courante de molécules insérées. L'intérêt est d'améliorer la croissance cellulaire et/ou de différencier le type cellulaire ensemencé. Il est ainsi possible d'insérer un facteur de croissance neurotrophique comme le BDNF (brain-derived growth factor), ou une protéine, la sémaphorine 3A (Sema3A), dans des films PSS-PAH ou PL ℓ -PGA afin de favoriser la formation et la croissance d'axones. Ces deux principes actifs conservent leur activité dans les films multicouches (Vodouhê et al. 2005).

Un autre exemple est l'intégration de bFGF (basic fibroblastic growth factor) et d'IPM (interphotoreceptor matrix) dans des films formés de PL ℓ et de chondroïtine sulfate. Les photorécepteurs ensemencés sur cette surface fonctionnalisée sont en plus grand nombre et conservent leur phénotype en cônes ou bâtonnets alors qu'ils perdent leur différenciation sur des surfaces non fonctionnalisées (Tezcaner et al. 2006).

Sur un film PL ℓ -PGA, la couche terminale de PGA peut être remplacée par une couche de PGA couplé de façon covalente au peptide RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique). Ce

peptide est connu pour favoriser l'adhésion cellulaire via les intégrines. Lors de l'ensemencement d'ostéoblastes primaires sur ces films, il apparaît que le dépôt d'une couche PGA-RGD en surface du film multicouche améliore significativement leur adhésion (Picart et al. 2005a). Le peptide RGD couplé au polyélectrolyte PAH et déposé sur un film multicouche de (poly(acide acrylique)-poly(acrylamide)) présente le même effet (Berg et al. 2004).

Le PGA a aussi été couplé de façon covalente avec le poly(éthylène glycol) (PEG) (PL ℓ -g-PEG). Des surfaces recouvertes de films multicouches PL ℓ -PGA et terminant par une ou plusieurs couches de PL ℓ -g-PEG deviennent ainsi antiadhérentes aux bactéries et aux protéines (Boulmedais et al. 2004).

Après implantation de biomatériaux dans l'organisme, il faut éviter le déclenchement d'une réponse inflammatoire massive. De nouvelles stratégies ont pour but de développer des recouvrements de surfaces contenant un anti-inflammatoire local. Une première étude a consisté à utiliser la PL ℓ couplée de façon covalente au peptide anti-inflammatoire α -MSH (α -Melanocyte Stimulating Hormone).

L'activité de stimulation de la synthèse de mélanine par l' α -MSH a tout d'abord été testée. Ainsi, des mélanocytes murins (B16-F1), cultivés sur des films PL ℓ -PGA fonctionnalisés par une couche terminale de PL ℓ - α -MSH, synthétisent puis sécrètent de la mélanine de la même manière qu'en présence d' α -MSH libre dans le milieu de culture. Le délai de la réponse cellulaire peut être modulé par insertion au sein du film PL ℓ -PGA d'une couche de PL ℓ - α -MSH plutôt qu'au niveau de la couche terminale (Chluba et al. 2001).

Par la suite, l'activité anti-inflammatoire de l' α -MSH couplée au PGA et utilisée pour construire un film multicouche (PL ℓ - α -MSH-PGA) $_n$ a été testé sur des monocytes humains (THP-1). Comme modèle d'étude *in vitro* de l'inflammation, une réponse inflammatoire est induite par la mise en contact des monocytes avec du LPS, une endotoxine bactérienne. En réponse au stimulus inflammatoire, les monocytes synthétisent du TNF- α (Tumoral Growth Factor- α), une cytokine pro-inflammatoire. Lorsque le film est fonctionnalisé avec l' α -MSH, une diminution de la production de TNF- α est observée ainsi que la sécrétion d'une cytokine anti-inflammatoire, l'IL-10 (Interleukine 10). En comparaison avec le comportement cellulaire en présence d' α -MSH libre en solution, le fait d'insérer la molécule active dans le film aboutit à une action prolongée dans le temps de l'effet anti-inflammatoire. De plus, l'action anti-inflammatoire est anticipée puisque les monocytes synthétisent l'IL-10 au bout de 6 heures en présence de la molécule libre alors qu'ils réagissent à 4 heures si la molécule est insérée dans un film (Benkirane-Jessel et al. 2004a).

A des fins de modulation de la réponse inflammatoire, un anti-inflammatoire non stéroïdien, le piroxicam, a aussi été intégré dans un film multicouche avec succès. Pour cela, il est tout d'abord mis sous forme de complexe avec une molécule de β -cyclodextrine pour réussir à le solubiliser. En effet, le piroxicam est une molécule hydrophobe. Il est difficile d'immobiliser des molécules hydrophobes à des interfaces surtout si le recouvrement se fait par voie aqueuse. Le piroxicam est donc encapsulé à l'intérieur de la cavité hydrophobe de la β -cyclodextrine pour former un complexe médicament-cage soluble. Grâce à cette molécule-cage, il est mis en réserve dans le film PGA-PL ℓ où il conserve sa structure, donc sa fonction. Ce complexe est alors déposé au sein du film multicouche. Le délai de réponse cellulaire au piroxicam dépend de la profondeur d'enfouissement du complexe β -cyclodextrine-piroxicam dans le volume du film (Benkirane-Jessel et al. 2004b).

Par conséquent, les films multicouches de polyélectrolytes donnent la possibilité d'immobiliser des biomolécules, de les conserver sous forme active et en quantités modulables en jouant sur différentes stratégies.

I.2.3.3. Films multicouches multicompartimentés

Des films multicouches multicompartimentés ont été développés. Ils se composent de multicouches à croissance exponentielle PL ℓ -HA déposées en alternance avec des multicouches à croissance linéaire PSS-PAH (Garza et al. 2004). L'intérêt est de former des films à strates c'est-à-dire avec des compartiments constituant des réservoirs de principes actifs. Le film exponentiel sert ici de réservoir pour des principes actifs alors que le film linéaire représente une barrière à la diffusion des polyélectrolytes entre deux compartiments successifs de même nature. Il a été constaté par microscopie confocale que la poly(ℓ -lysine) couplée à la fluorescéine (notée PL ℓ^{FITC}) et insérée dans un compartiment réservoir ne diffusait pas au travers de la couche barrière. Grâce à ces films, des cascades de réponses cellulaires pourraient être contrôlées dans le temps.

Cette étude a été poursuivie en testant l'étirement d'une structure compartiment/barrière déposée sur du silicone (Mertz et al. 2007). Il a été démontré que les multicouches barrière composées de poly(diallyldiméthylammonium) et de PSS (PDADMA-PSS) pouvaient agir comme des nanovalves à réponse mécanique. Sous l'action d'un étirement mécanique, ces barrières s'ouvrent de manière réversible via la formation de nanopores. La diffusion de la PL ℓ d'un réservoir PL ℓ -HA à l'autre devient alors possible.

L'équipe du Professeur P. Hammond a développé des films constitués de compartiments d'héparine et de sulfate de dextran (Wood et al. 2006). Des barrières constituées de polymères dégradables par hydrolyse ou non dégradables ont été placées dans ces architectures. Grâce à ce procédé, une libération prolongée et contrôlée des molécules dans le milieu est possible selon la zone d'intégration. Ainsi ces films multicompartiments permettent l'arrangement spatial de biomolécules dans un film et le contrôle de leur cinétique de libération.

Les films multistrates peuvent aussi se composer de deux films multicouches exponentiels déposés l'un sur l'autre. Le deuxième film conserve un comportement exponentiel même s'il est construit sur un film préexistant composé de polyélectrolytes de nature différente. De plus, les polyélectrolytes du film supérieur pénètrent dans le film sous-jacent et le densifient. Cette densification bloque alors la diffusion des nouvelles chaînes de polyélectrolytes déposées et aboutit à une véritable barrière (Jourdainne et al. 2007).

Les films multicouches ont aussi été séparés du milieu aqueux externe grâce à une barrière constituée d'une couche de paraffine. Des particules de paraffine sont déposées sur un film multicouche puis fondues par chauffage à 60 °C pendant 2 heures. Une barrière hydrophobe est ainsi obtenue et empêche les molécules d'eau du milieu extérieur de diffuser dans le film. Ce procédé améliore la stabilité du film et permet le stockage de molécules hydrophiles labiles dans le film (Glinel et al. 2004).

Un dernier type de barrière est constitué d'une couche de polymère synthétique hydrophobe, le poly(acide *l,d*-lactique-co-glycolique) noté PLGA. Le recouvrement d'un film multicouche PL ℓ -HA par le PLGA permet de créer des films multicompartiments biodégradables en comparaison aux films linéaires PSS-PAH non dégradables. La PL ℓ^{FITC} libre contenue dans un premier réservoir ne diffuse pas vers le réservoir supérieur grâce à la présence de la barrière de PLGA.

D'autre part, des cellules de moelle osseuse sont capables de dégrader cette couche de PLGA pour accéder au film multicouche (PL ℓ -HA)₃₀ sous-jacent. Lors de leur ensemencement sur un film comprenant deux réservoirs séparés par une barrière de PLGA, les cellules internalisent rapidement tout d'abord les chaînes de PL ℓ^{Rho} contenues dans le réservoir (PL ℓ -HA)₃₀ supérieur. Les chaînes de PL ℓ^{FITC} contenues dans le réservoir (PL ℓ -HA)₃₀ inférieur sont internalisées avec un délai de cinq jours après l'ensemencement en raison de la présence de la couche de PLGA qui ne se dégrade que progressivement (Garza et al. 2005).

I.2.3.4. Applications biologiques des films multicouches

Par rapport aux autres techniques de recouvrement de surface, les films multicouches de polyélectrolytes sont simples à construire, disposent d'une large gamme de composés utilisables et permettent de conserver l'activité biologique de molécules insérées. Ceci laisse entrevoir de larges applications médicales notamment dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. La fonctionnalisation des multicouches décrite au paragraphe I.2.3.2. représente déjà une grande partie des applications biomédicales potentielles.

Nous répertorierons ici quelques études appliquées et cliniques récentes de ces recouvrements de surface.

Un film multicouche a été assemblé avec des polyélectrolytes et de l'argile mimant ainsi la structure de la nacre et surtout ayant la même rigidité que l'os lamellaire. Ce matériau composite représente un fort potentiel pour l'ingénierie tissulaire de l'os (Tang et al. 2003).

L'enfouissement de liposomes au sein de multicouches permet d'élaborer un réservoir de molécules ou un nanoréacteur enzymatique. Les biomolécules sont encapsulées au sein des liposomes dans leur environnement aqueux natif, sans contact direct avec la multicouche ou les contraintes extérieures, et conservent donc leur activité (Michel et al. 2004).

Les nanoparticules composées de multicouches sont aussi largement utilisées comme container de médicaments tels la dexaméthasone, un anti-inflammatoire et un immunosuppresseur hydrophobe. Le film multicouche module la libération de la molécule dans le surnageant et diminuerait ainsi les effets secondaires néfastes causées par des concentrations libérées trop importantes (Pargaonkar et al. 2005).

D'autre part, des îlots pancréatiques ont pu être recouverts de multicouches tout en conservant leur fonction de synthèse de l'insuline. Ils présentent alors une forte biocompatibilité et un maintien *in vivo*. Cette stratégie semble prometteuse pour permettre la transplantation d'îlots pancréatiques sans l'utilisation d'immunosuppresseurs (Schneider et al. 2001).

Des plaquettes sanguines ont aussi été entourées d'une " nanocoquille " composée de multicouches et qui présente à sa surface des anticorps anti-Immunoglobuline G (IgG). Ceci permet de cibler précisément l'ancrage de ces plaquettes sur des surfaces préalablement recouvertes d'IgG (Ai et al. 2002) pour une cicatrisation rapide. Les propriétés de cette cellule ont donc été modifiées par ce recouvrement spécifique. L'intérêt de cette étude réside surtout dans les applications à d'autres types cellulaires et/ou d'autres anticorps.

Enfin, l'obtention de surfaces antibactériennes et antiadhésives grâce, par exemple, à l'application de chitosan et d'héparine en multicouches, est envisageable comme nouveaux

revêtements en chirurgie cardio-vasculaire afin d'éviter la resténose, c'est-à-dire la reformation du rétrécissement d'un vaisseau après angioplastie (Fu et al. 2005). En effet, dans le cas d'angioplastie avec mise en place d'un ressort métallique (" *stent* "), du tissu cicatriciel peut proliférer anormalement et aboutir à une resténose. Lors de la resténose, des cellules musculaires lisses vasculaires différenciées non-contractiles vont migrer de la media vers l'intima suite à la chirurgie. Elles couvrent le *stent* implanté par couches successives jusqu'à occlusion du vaisseau (Indolfi et al. 2003). Une recherche en plein essor est donc la création de *stents* à libération de principes actifs afin d'inhiber la resténose. Ainsi des *stents* coronariens recouverts seulement avec de l'héparine présentent des propriétés antithrombotiques (DeScheerder et al. 1997), et des *stents* recouverts de rapamycine, un agent immunosuppresseur et antiprolifératif (Hehrlein et al. 2002), ou encore avec du paclitaxel (Taxol®), un agent anticancéreux (Dzau et al. 2002), permettent de réduire fortement la resténose après implantation.

Une étude récente décrit le recouvrement de *stents* endovasculaires avec des multicouches d'acide hyaluronique et de chitosan fonctionnalisées avec le nitroprusside sodique. Ce donneur de monoxyde d'azote (NO) a un effet vasodilatateur et baisse la tension artérielle. Dans cette étude, les auteurs constatent une baisse de 63 % d'adhésion plaquettaire grâce à l'utilisation de la surface multicouche antiadhérente fonctionnalisée avec ce vasodilatateur (Thierry et al. 2003a). Le paclitaxel (Taxol®), un anticancéreux, a aussi été intégré dans des films multicouches. Le Taxol est couplé à l'HA (système dit de " prodrug ") puis utilisé dans la construction même du film multicouche avec comme contre-polyélectrolyte le chitosan (Thierry et al. 2005). Ce type de films prometteur reste à tester dans le cadre du recouvrement d'implants endovasculaires.

Pour terminer, des études *in vivo* ont été menées récemment chez le rat. Des films multicouches de PLL, PGA et PGA- α -MSH ont été déposés sur des prothèses trachéales constituées de billes de titanes (figure I.9).

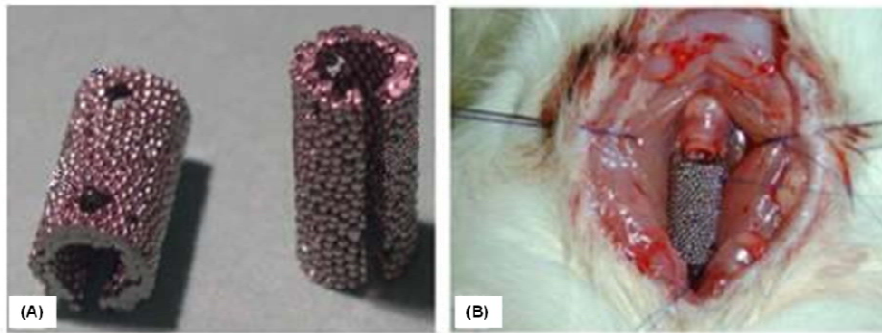


Figure I.9: (A) Prothèse de trachée poreuse constituée d'assemblages de billes de titane. (B) Etape d'implantation de la prothèse au niveau de la trachée sectionnée d'un rat (Schultz et al. 2005).

Le but était de limiter l'inflammation au niveau de la prothèse et d'améliorer la recolonisation cellulaire. Les expérimentations ont donc consisté à vérifier si un effet anti-inflammatoire dû à la présence en surface des billes d'un film multicouche fonctionnalisé avec l' α -MSH était détectable. Il a été démontré que l' α -MSH conservait son activité même couplée au PGA puis insérée dans le film. De plus, le fait d'avoir en couche terminale le PGA plutôt que la PL ℓ permet l'obtention d'un épithélium de type respiratoire dans la lumière de la trachée moins épais, se rapprochant de l'épithélium physiologique (Schultz et al. 2005).

I.3. Les polyesters biodégradables dans la formation de biomatériaux : exemple du poly(acide *l,d*-lactique-co-glycolique)

Le poly(acide *l,d*-lactique-co-glycolique) noté PLGA est un polymère synthétique hydrophobe biocompatible, et biodégradable. Il s'agit donc d'un composé peu immunogène, non toxique et hydrolysable dans des conditions physiologiques (Lu et al. 2001).

Il est synthétisé par la technique dite de polymérisation par ouverture de cycle (ou "ring opening polymerization") à partir de lactate et de glycolide, les dimères cycliques de l'acide lactique et de l'acide glycolique respectivement (figure I.10). La réaction est catalysée par de l'octanoate d'étain, Sn(Oct) $_2$, ou du Zinc (Dechy-Cabaret et al. 2004).

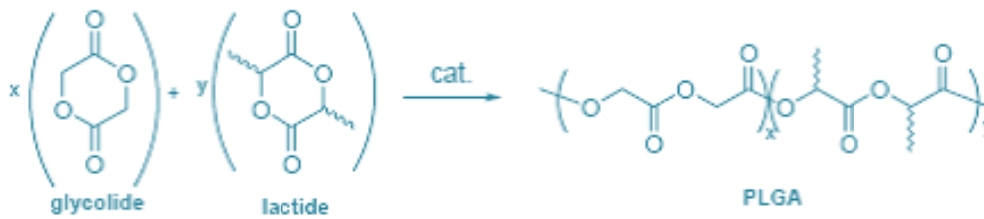


Figure I.10: Synthèse du PLGA par la technique de polymérisation par ouverture de cycle. x et y représentent le rapport massique de monomères choisis. Dans notre cas, $x = y = 1$.

Les propriétés intrinsèques des matériaux en polyesters, dont le PLGA, varient en fonction de plusieurs facteurs : la masse molaire, le rapport massique de monomères, le taux de cristallinité, l'hydrophobicité, la configuration des chaînes, la taille, la forme... Dans cette thèse, la masse molaire du PLGA sera le seul paramètre à être modulé. Le rapport massique 50/50 de monomères d'acide lactique et d'acide glycolique sera toujours conservé.

Lors du choix d'un biomatériau, il est également primordial de connaître son taux de dégradation et le devenir des composés issus de cette dégradation. La dégradation du PLGA, très largement étudiée, peut se faire suivant deux mécanismes : dégradation par hydrolyse ou dégradation enzymatique (Gopferich 1996; Anderson and Shive 1997; Alexis 2005).

I.3.1. Dégradation par hydrolyse et érosion du PLGA

Le PLGA se dégrade par hydrolyse en bloc (" bulk hydrolysis ") des liaisons esters dans la chaîne polymère (" polymer backbone ") par attaque hydrolytique des molécules d'eau, un processus qui est catalysé par l'acidité ou la basicité du milieu (Sykes 1975). Elle se décompose au final en ses monomères constitutifs, l'acide lactique et l'acide glycolique (figure I.11).



Figure I.11: Hydrolyse d'une fonction ester en un acide carboxylique et un alcool. Lorsque l'hydrolyse est complète, il restera uniquement des monomères d'acide lactique et glycolique.

Ces deux composés de dégradation peuvent être toxiques à forte dose. Cependant, l'acide lactique est oxydé par la lactico-déshydrogénase (LDH) en acide pyruvique, élément de base du cycle de Krebs. L'acide glycolique est transformé par la LDH en acide glyoxilique, lui-même métabolisé en d'autres molécules dont de l'eau et du dioxyde de carbone (Reed and

Gilding 1981; Talja et al. 1997) mais aussi en oxalomate qui bloque le cycle de Krebs (Parry and Wallach 1974).

La réaction d'hydrolyse en elle-même est particulière. Les groupements carboxyles en fin de chaîne résultant de l'hydrolyse causent une diminution locale du pH. En effet, lors de la dégradation d'un matériau composé de PLGA, les résidus de dégradation se localisent uniformément dans la structure. Ceux localisés en profondeur ne pourront diffuser à la surface que si leur masse moléculaire est inférieure à 7000 Da (Wake et al. 1998). Le nombre de groupements R-COOH et donc l'acidité au cœur du matériau, s'accroît au fur et à mesure de la dégradation de la structure en PLGA. La scission aléatoire des groupements esters est alors accélérée par ce phénomène d'autocatalyse. Le matériel se dégradera donc beaucoup plus rapidement dans le volume qu'en surface (Park 1995; Li 1999). On obtient ainsi des structures inchangées du point de vue du poids total du matériau et de sa morphologie jusqu'à atteindre 90 % de la dégradation totale (Park et al. 2005b). L'étape suivante de dégradation correspond à l'érosion c'est-à-dire au départ des monomères et des oligomères du volume vers le milieu extérieur. Les monomères d'acide glycolique diffusent vers le milieu extérieur deux fois plus rapidement que les monomères d'acide lactique en raison de leur plus faible encombrement stérique (Gopferich 1996).

I.3.2. Dégradation enzymatique du PLGA

Lorsqu'un matériau composé de PLGA est intégré dans l'organisme, des enzymes vont éventuellement intervenir dans le processus de dégradation (Williams and Mort 1977). La liaison ester est hydrolysée par des hydrolases spécifiques, les estérases E.C.3.1. (nucléases, phospholipases...). Les produits de dégradation sont équivalents à ceux obtenus lors de la dégradation par hydrolyse du PLGA. Cependant, le rôle des enzymes dans la dégradation reste très controversé.

Certains auteurs ont démontré que des radicaux libres synthétisés par des cellules phagocytaires comme les macrophages ou les neutrophiles accélèrent l'hydrolyse des chaînes (Ali et al. 1993; Lee and Chu 2000) et que les enzymes n'intervenaient donc pas dans ce processus.

D'un autre côté, dans le cas de la dégradation enzymatique, et contrairement à la dégradation par hydrolyse, la réaction aurait lieu en surface du matériau en raison de l'encombrement des enzymes et de leur hydrophilicité. Ce mécanisme de dégradation enzymatique aboutirait

finalement à la diminution du poids total du matériau alors que la masse molaire moyenne des chaînes de PLGA localisées dans le volume ne changerait pas.

Zaikov a constaté que la présence de défauts (craquelures ou excroissances) en surface d'un implant en PLGA était nécessaire pour initier la réaction enzymatique de dégradation (Zaikov 1985). Dans les premières étapes de dégradation d'un matériau lisse, les enzymes participeraient peu. Une fois que l'érosion par hydrolyse du matériau a débuté, les enzymes contribueraient alors à la dégradation (Gilbert et al. 1982).

I.3.3. Application du PLGA au domaine des biomatériaux

Ce polymère synthétique thermoplastique est largement présent dans le domaine des biomatériaux en raison de sa bonne biocompatibilité, et des possibilités de contrôle de sa dégradation. Il est aussi possible de réaliser des structures 2D ou 3D en PLGA sur lesquelles des cellules peuvent êtreensemencées dans le cadre de l'ingénierie tissulaire. Les termes anglais de "*scaffold*" (littéralement échafaudage) ou "*foam*" (mousse) sont utilisés pour définir ces architectures (Tateishi et al. 2002). Les *scaffolds* ont été testés notamment dans l'ingénierie des tissus osseux (Thomson et al. 1999; Guan and Davies 2004), hépatiques (Li et al. 2006), cartilagineux, vasculaires, nerveux (Levenberg et al. 2003), ou rétiens (Lu et al. 2001)...

Le PLGA est également largement utilisé dans des systèmes de libération contrôlée de principes actifs sous forme de nanocapsules ou microcapsules. Ainsi des protéines (Sinha and Trehan 2003), des peptides (Woo et al. 2001) ou des médicaments (Bala et al. 2004; Freiberg and Zhu 2004; Park et al. 2005b) peuvent être libérés par ces systèmes. Le PLGA est formulé dans des systèmes de libération contrôlée de vaccins (Andrianov and Payne 1998), d'héparine (Jiao et al. 2002) ou d'insuline (Cui et al. 2006) administrés par voie orale. Il rentre aussi dans la composition de fils de suture couramment utilisés tels le Vicryl® rapide.

L'équipe de R. Langer développe depuis 15 ans des biomatériaux utilisant le PLGA sous différentes formes : des microsphères (Cohen et al. 1991), des nanoparticules (Farokhzad et al. 2006) ou des mousses (Lu et al. 2000). Son équipe a aussi créé des plateformes en poly(acide lactique) permettant d'insérer différents médicaments sur un même support puis de les libérer suivant une chronologie et des cinétiques contrôlées (" multi-pulsatile ") (Grayson et al. 2003).

Approuvé par la *Food and Drug Administration*, le PLGA est déjà utilisé dans de nombreuses formulations pharmacologiques commercialisées. Par exemple, l'Atrigel® (Atrix Laboratories) est une formulation composée de 34 % de PLGA et de 66 % de solvant biocompatible, la N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP). Il permet d'obtenir un système de libération retard pour des médicaments auquel il est associé. L'Atrigel® est présent dans l'Eligard®, suspension injectable d'acétate de leuprolide à 10 %, pour le traitement de cancers de la prostate hormono-dépendants avancés. Cet analogue de l'hormone de libération de la lutéinostimuline (LH-RH) inhibe la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires et supprime la stéroïdogénèse testiculaire ou ovarienne, d'où son effet antinéoplasique. L'Eligard® a pour avantage une action thérapeutique d'une durée de 6 mois grâce à l'association avec le PLGA.

Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

*Dibaot ar c'halvez
A labour hep danvez.
(Rare le charpentier qui travaille sans matière.)*

*An tu zo an hanter eus al labour.
(Le savoir-faire est la moitié du travail.)*

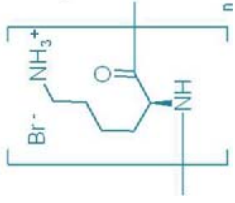
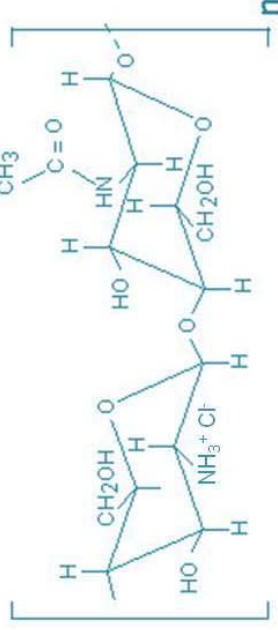
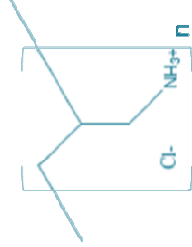
Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

II.1. Matériels

II.1.1. Polyélectrolytes

Le récapitulatif des principaux polyélectrolytes utilisés pour les travaux de cette thèse est présenté dans le tableau n°1.

Les polyélectrolytes sont dissouts à une concentration de 1 mg/mL dans une solution de chlorure de sodium NaCl à 0,15 M, sauf indication contraire. Cette solution de NaCl est toujours préparée à partir d'eau ultra-pure (18,2 M Ω de résistivité, filtration Milli-Q-plus, Millipore, St Quentin en Yvelines, France). Le pH des solutions peut être ajusté avec des solutions de soude (NaOH) ou d'acide chlorhydrique (HCl).

Nom du polyélectrolyte	pKa	Formule développée	Fournisseur	Masse molaire moyenne (en Da)	Origine et dégradabilité	Notation (Charge à pH physiologique)
Poly(<i>l</i> -lysine) Poly(<i>d</i> -lysine)	10,5		Sigma (St. Quentin Fallavier, France)	PL : 58900 PLd : 44100	Polypeptide naturel. Dégradable	PL PLd (+)
Chitosan	6,5-7,4	<p>D-glucosamine N-acétyl-D-glucosamine</p> 	Medipol (Lausanne, Suisse)	4500	Polysaccharide naturel. Dégradable	CHI (+)
Poly (allylamine hydrochloridrique)	9		Aldrich (St. Quentin Fallavier, France)	70000	Synthétique. Non dégradable	PAH (+)

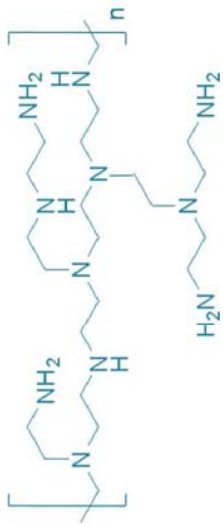
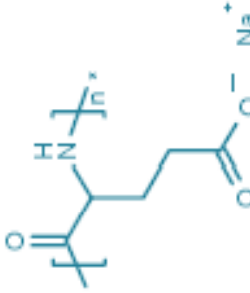
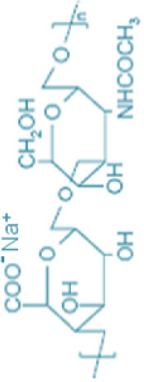
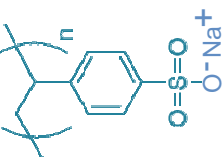
Nom du polyelectrolyte	pKa	Formule développée	Fournisseur	Masse molaire moyenne (en Da)	Origine et dégradabilité	Notation (Charge à pH physiologique)
Poly(éthylèneimine)	Polybase forte		Sigma (St. Quentin Fallavier, France)	750000	Synthétique Dégradable toxique	PEI (+)
Poly(<i>l</i> -acide glutamique) Poly(<i>d</i> -acide glutamique)	4,3		Sigma (St. Quentin Fallavier, France)	PGAl : 97800 ou 41400 PGAd : 38000	Polypeptide Synthétique. Dégradable	PGAl PGAd (-)
Acide hyaluronique	2,9		Bioiberica (Barcelone, Espagne)	595000	Polysaccharide naturel. Dégradable	HA (-)
Poly(styrène sulfonate)	2		Aldrich (St. Quentin Fallavier, France)	70000	Synthétique. Non dégradable	PSS (-)

Tableau II.1 : Listes des principaux polyelectrolytes utilisés pour les expérimentations.

II.1.2. Polyélectrolytes marqués par un fluorophore

Pour les manipulations en microscopie confocale, des molécules fluorescentes comme l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, adsorption à 488 nm / émission à 520 nm) ou la rhodamine B, (Rho, adsorption à 510 nm / émission à 575 nm) doivent être couplées aux polyélectrolytes afin de pouvoir les observer.

Le couplage de la FITC à la PL ℓ s'effectue de la manière suivante. La fonction thiocyanate, hautement réactive, va réagir avec les fonctions amines propres à la PL ℓ . Plus précisément, le carbone électrophile du thiocyanate attaque une fonction amine de la PL ℓ pour former une liaison covalente isothiourée entre les deux molécules comme le montre la figure II.1.

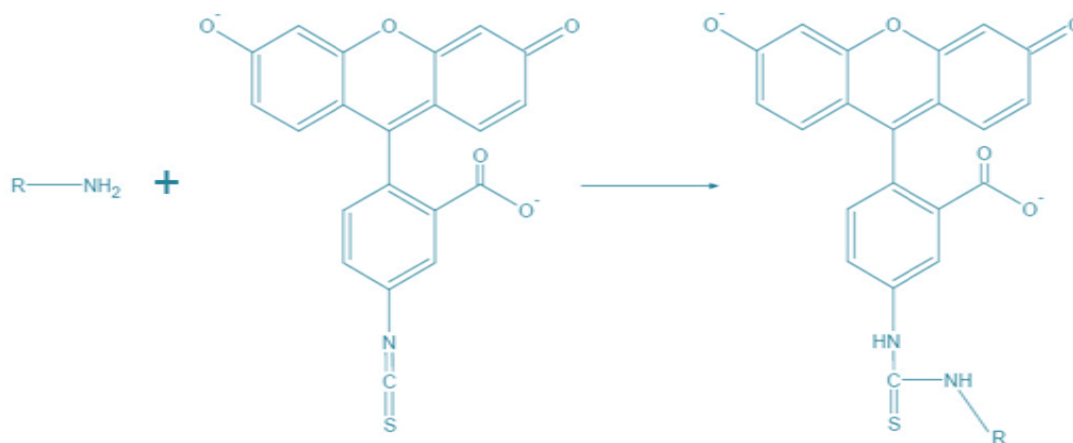


Figure II.1: Couplage de la FITC (isothiocyanate de fluorescéine) avec une fonction amine (Hermanson 1996).

Pour les polyélectrolytes marqués à la rhodamine B (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) (PL ℓ^{Rho} et PAH Rho), le couplage a été réalisé au laboratoire en suivant le protocole décrit par Hermanson (Hermanson 1996). Les polyélectrolytes sont dissouts dans une solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ (0,1 M, pH 8,5) à 1 mg/mL et la rhodamine B est dissoute dans du diméthyle sulfoxyde (DMSO) à 2 mg/mL. Les solutions sont mélangées avec un ratio de 1 mg de Rho pour 50 mg de polyélectrolytes à température ambiante pendant 2 heures. Les solutions contenant les chaînes de PL ℓ^{Rho} ou de PAH Rho sont ensuite purifiées par dialyse contre de l'eau pendant 3 jours. L'absence de rhodamine libre dans le dialysat est vérifiée par spectroscopie en excitant la sonde à 510 nm et en regardant son émission dans le rouge (575 nm).

Les chaînes de PSS marquées avec du méthacryloxyéthyl thiocarbamoyl rhodamine B (MRho, Polysciences, Eppelheim, Allemagne) sont directement polymérisées (Dähne et al.

2001). 2,5 mmol de 4-styrène sulfonate de sodium (SS, Sigma,) sont dissouts dans 7,5 mL d'eau Milli-Q. Parallèlement, une solution de méthacryloxyéthyl thiocarbamoyl rhodamine B à 0,0125 mmol dans 2 mL de méthanol est préparée et ensuite ajoutée à la solution précédente de SS, obtenant un rapport molaire MRho/SS de 0,5 %. Ce mélange est maintenu sous agitation pendant une heure sous atmosphère d'azote. 250 μ L de tétraméthyléthylènediamine (TMEDA, Sigma) à 0,1 M (1 % mol) dilué dans l'eau et 250 μ L d'ammonium peroxodisulfate ((NH₄)₂S₂O₈, Sigma) à 0,05 M (0,5 % mol) dilué dans l'eau sont ajoutés au milieu réactionnel sous atmosphère d'azote afin d'initialiser la réaction de polymérisation. La solution, maintenue sous atmosphère d'azote, est chauffée à 40 °C pendant 4 heures puis refroidit à température ambiante pendant 12 heures sous agitation. La solution finale est dialysée pendant une semaine contre de l'eau et finalement lyophilisée pour obtenir un solide rouge sombre.

II.1.3. Polymères

Le but de ce travail de thèse est de mettre en place des méthodes pour moduler l'accès des cellules à des molécules actives contenues dans des films de polymères. Une stratégie a consisté à développer une barrière de polymère hydrophobe biodégradable : le poly(acide *l,d*-lactique-co-glycolique) (PLGA) dont la structure est représentée figure II.2.

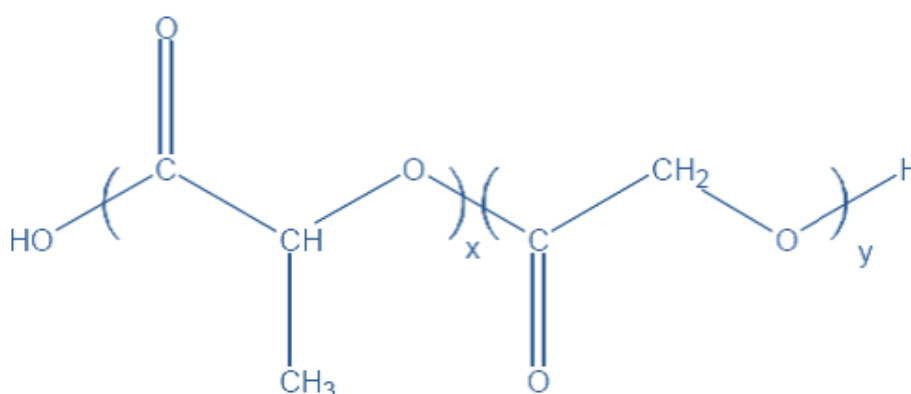


Figure II.2: Structure du poly(acide *l,d*-lactique-co-glycolique). $x = y = 50$ % (taux de monomères). Le taux d'énantiomères *l* ou *d* d'acide lactique est de 50/50.

Deux poids moléculaires de PLGA ont été utilisés :

- un premier lot de poids moléculaire 40000/75000 g/mol (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France);
- un second lot de poids moléculaire 4265 g/mol (Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

II.1.4. Molécules actives

II.1.4.1. Le Taxol

Le paclitaxel (ou Taxol®) a été fourni par les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg qui s'approvisionnent chez Bristol-Myers Squibb Company (Princeton, USA). Le flacon de "Taxol® Injection" utilisé sous forme diluée en perfusion contient 30 mg de paclitaxel conditionné à 6 mg/mL dans du crémosphor purifié (Cremophor® EL), c'est-à-dire de l'huile de ricin polyoxyéthylénée, et 49,7 % (v/v) d'alcool déshydraté United States Pharmacopeia (USP). Sa masse molaire est de 853,91 Da. La figure II.3 présente la structure chimique de cette molécule.

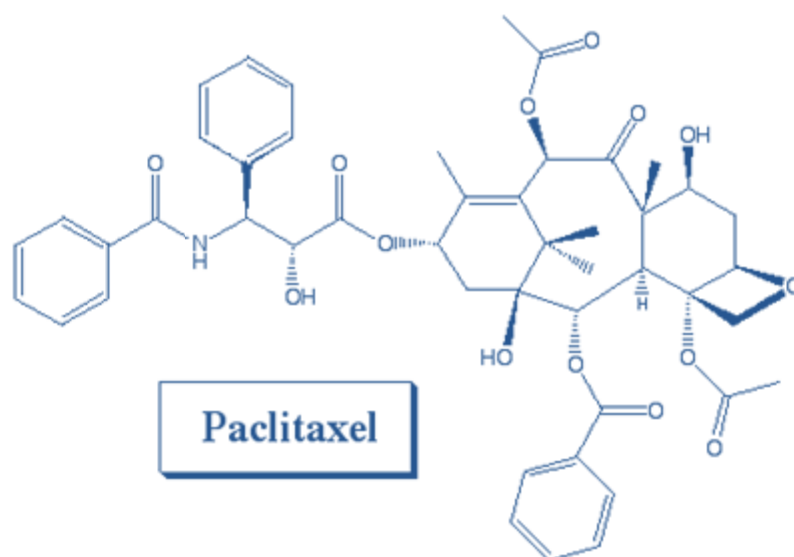


Figure II.3: Structure chimique de la molécule de paclitaxel (Taxol).

Mécanisme d'action du Taxol

Il existe deux types d'antinéoplasiques agissant sur le cytosquelette : ceux qui inhibent la polymérisation de la tubuline en microtubules, comme les alcaloïdes de la pervenche (vinblastine), et ceux qui empêchent la dépolymérisation des microtubules, comme les taxoïdes. Les taxoïdes sont des inhibiteurs de désassemblage des microtubules en tubuline ou encore appelés des poisons de fuseaux. D'un côté, ils stimulent l'assemblage des dimères de tubuline en microtubules ; de l'autre, ils stabilisent les microtubules en empêchant leur dépolymérisation comme présenté figure II.4 Il n'y a plus de réorganisation dynamique normale du réseau de microtubules, ce qui bloque l'interphase et surtout la mitose. Ces

molécules interrompent aussi la prolifération, la migration et la transduction de signal en stabilisant les microtubules.

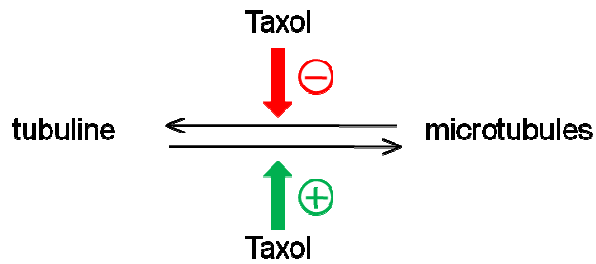


Figure II.4: Action double du Taxol sur le cytosquelette : l'assemblage de la tubuline en microtubules est favorisé et les microtubules sont stabilisés avec impossibilité de désassemblage.

Les taxoïdes sont issus de l'écorce d'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*) ou de l'if commun (*Taxus baccata*), espèce la plus communément rencontrée en Europe. Actuellement, les taxoïdes sont obtenus par hémisynthèse à partir de produits naturels ou par synthèse. Les dérivés ont une action plus spécifique et sont moins toxiques que les molécules naturelles. Les deux principaux taxoïdes sont le paclitaxel (Taxol®) et le docétaxel. Ils agissent sur les cellules à division rapide au niveau de la moelle, du tube digestif et des gonades. Le Taxol (Tx) que nous utiliserons dans nos études est indiqué dans le traitement du cancer de l'ovaire à un stade avancé ou métastatique, le cancer du sein métastatique et le cancer bronchique non à petites cellules.

Les principaux effets indésirables dose-dépendants des taxoïdes sont des réactions allergiques d'hypersensibilité pouvant aller jusqu'au choc anaphylactique, la myélosuppression, en particulier la neutropénie, l'alopecie, les neuropathies... Leur utilisation est contre-indiquée chez la femme enceinte ou allaitante.

En plus de son action avérée sur les microtubules, le Tx stimulerait les macrophages et induirait la libération de cytokines telles que les interleukines IL-1, IL-2 et le TNF (Tumor Necrosis Factor). En intracellulaire, il antagoniserait l'activité anti-apoptotique de la protéine Bcl-2⁴ en provoquant la phosphorylation de Bcl-2 par des kinases. Il favoriserait ainsi la mort des cellules par apoptose (Srivastava et al. 1999). En effet, il est difficile de faire le lien entre l'induction de la mort cellulaire par apoptose et l'arrêt de la mitose du à l'action double sur les microtubules (Milross et al. 1996; Mollinedo and Gajate 2003).

⁴ La protéine Bcl-2 inhibe l'apoptose, en empêchant la fixation de Bax dans la membrane externe mitochondriale. Cette fixation induit la libération de cytochrome c, cette modification du potentiel transmembranaire mitochondriale conduisant à l'éclatement de la mitochondrie.

II.1.4.2. Le Taxol Oregon Green® 488

Le Taxol Oregon Green® 488 noté Tx^{Green 488} (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) est utilisé dans le cadre des expériences de fluorimétrie et de microscopie confocale (figure II.5).

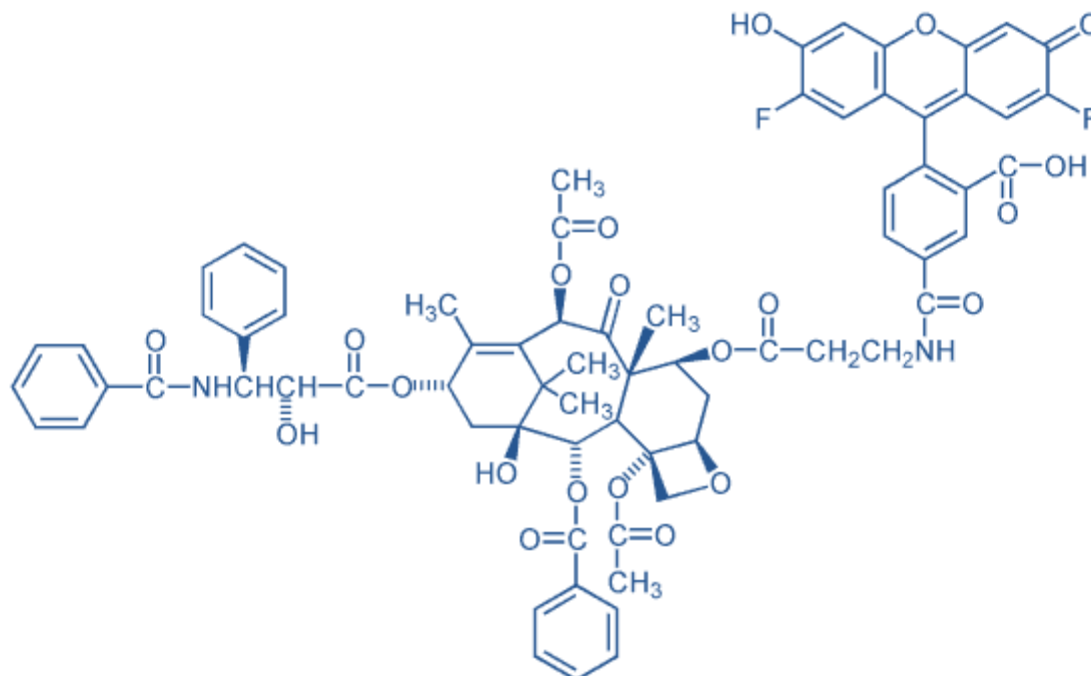


Figure II.5: Structure chimique du Taxol Oregon Green® 488

Sa masse molaire est de 1319,28 Da. L'Oregon Green® 488 (2',7'-difluorofluorescéine) est un analogue fluoré de la fluorescéine avec une longueur d'onde d'adsorption à 488 nm et une longueur d'onde d'émission à 514 nm, équivalentes à la fluorescéine. Ce fluorophore présente des avantages notables :

- ✓ il est plus photostable, ce qui permet un temps d'acquisition plus long avant d'avoir une destruction de la fluorescence.

- ✓ son pKa est de 4,7 alors que la fluorescéine possède un pKa de 6,4. La fluorescence de l'Oregon Green® 488 est donc insensible au pH dans des conditions proches du pH physiologique alors que la fluorescéine doit être manipulée dans des solutions tamponnées pour éviter une extinction de la fluorescence dès que la molécule est proche de son pKa ou en dessous (donc globalement neutre puis chargée positivement).

Le Tx^{Green488} est préparé à partir d'une poudre. 100 µg de Tx^{Green488} sont dissouts dans un mélange de 100µl de crémosphor EL et 100 µl d'éthanol (solution mère à 500 µg/mL). Le Cremophor® EL (Fluka, St Quentin Fallavier, France), de l'huile de ricin polyoxyéthylénée, est utilisé comme excipient dans la formulation du Tx et du Tx^{Green488} préparé au laboratoire.

Une sonication de 15 minutes répétée deux fois permet d'homogénéiser la solution mère qui sera ensuite diluée dans du NaCl 0,15 M pour les expériences.

II.1.4.3. Le PGA- α -MSH

L' α -MSH (α -melanocortin stimulating hormone) appartient au groupe des mélanocortines. Cette hormone, synthétisée par l'hypothalamus, permet la synthèse de mélanine par les mélanocytes au niveau de la peau. Cependant elle joue de nombreux autres rôles.

Tout d'abord, elle a une action anorexigène au niveau du cerveau. Ainsi, il a été prouvé qu'un problème au niveau des récepteurs cérébraux à l' α -MSH, ou de la molécule α -MSH en elle-même, aboutissait à une obésité acquise (Dhillon and Bloom 2001).

D'autre part, ce tridécapéptide est un modulateur naturel des réponses inflammatoires et immunitaires qui agit dans toutes les parties du corps dont le cerveau (Lipton and Catania 1997). Il régule la synthèse de TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), une cytokine pro-inflammatoire, par les monocytes/macrophages lors d'une réaction inflammatoire (Taherzadeh et al. 1999).

L' α -MSH a donc des fonctions pléiotrophiques incluant une action anorexigène. Elle module de nombreux stimuli inflammatoires comme les cytokines proinflammatoires, les molécules d'adhésion, et les facteurs de transcription inflammatoires. Cette hormone a aussi un rôle cytoprotectif ciblé au niveau de la peau contre les agressions comme l'exposition aux UV ou à des agents induisant une inflammation ou un stress oxydant (Eves et al. 2006).

Dans notre étude, nous allons utiliser un analogue de l' α -MSH couplé au polyélectrolyte PGA. Cet analogue de l' α -MSH a pour séquence :

HS-CH₂-CH₂-CO-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂.

Il est purifié par HPLC (high-performance liquid chromatography), et est synthétisé chez Neosystem (Strasbourg, France). Cet analogue a une activité plus forte que l' α -MSH grâce à la substitution de la *l*-Phénylalanine en *d*-Phénylalanine et de la Méthionine en Norleucine (Sawyer et al. 1980).

La fonction thiol située au bout de la chaîne N-terminale, à la place de l'acétate, va permettre le couplage avec des molécules dont le PGA activé avec le groupement maléimide. La séquence active (Lys¹¹-Pro¹²-Val¹³) en C-terminale, responsable de l'effet anti-inflammatoire, est ainsi laissée libre et accessible après l'attachement au polyélectrolyte. De plus, la substitution de l'acide aminé Méthionine en Norleucine permet d'éviter des couplages

aléatoires du peptide. En effet, la Norleucine est obtenue par désamination de la Lysine. La Norleucine a donc un groupement éthyl à la place du méthyl-sulfure de la Méthionine.

Pour l'étude *in vitro* sur les mélanocytes, le couplage du polyélectrolyte PGA avec la molécule active α -MSH a été réalisé en collaboration avec le Dr. Benoît Frisch à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg. Plus précisément, la réaction se place entre un groupement maléimide présent sur le PGA modifié et le groupement thiol de l'analogue d' α -MSH pour la formation d'une liaison thiourée covalente.

Tout d'abord, le PGA est activé par liaison covalente au groupement maléimide. Pour cela, 60 mg de PGA sont dissouts dans 3 mL de tampon Hepes 10 mM (pH = 6,7), 20 mg d'1-éthyl-3-(3-diméthylamino-propyl) carbodiimide (EDC) et 3 mg de N-hydroxysulfosuccinimide (S-NHS). Le mélange est placé sous agitation magnétique et sous atmosphère azotée. 24 mg d' amino-éthylmaléimide (NH₂EtMal) sont alors ajoutés. La réaction est maintenue sous agitation pendant 17 heures à température ambiante. Après élimination des coproduits par dialyse (membrane avec un cut-off de 10 000) contre deux fois 2 L d'eau, le solvant est éliminé par lyophilisation.

Pour le couplage des deux molécules, 5 mg de PGA-maléimide sont mélangés avec 5 mg de l'analogue de l' α -MSH, α -MSH-SH, dans 1,5 mL de tampon Hepes 10 mM (pH = 7,4) à température ambiante sous agitation magnétique (Smyth et al. 1960) (figure II.6).



Figure II.6: Réaction de couplage entre les groupements thiol et maléimide. R = PGA

A la fin de la réaction, les groupements maléimides encore libres sont neutralisés par un excès d'acide mercaptopropionique. La solution est alors dialysée contre de l'eau (membrane avec un cut-off de 10 000) pendant une nuit puis lyophilisée. Le taux de greffage est de 85 % selon l'intégration des pics caractéristiques des groupements CH de la liaison double en RMN (résonance magnétique nucléaire). La disparition du signal à 6,83 ppm indique que l' α -MSH est liée au PGA.

Pour tester cette prodrogue, des mélanocytes murins particuliers nommés B16-F1 sontensemencés sur différents types de film multicouche fonctionnalisé avec la molécule. Ces mélanocytes ont la capacité de sécréter la mélanine et ne la conservent pas dans le cytoplasme. Il est alors possible de détecter l'action cellulaire due au PGA- α -MSH inséré en prélevant simplement le surnageant. La mélanine absorbe à une longueur d'onde de 405 nm.

Un résultat rapide est obtenu par spectrophotométrie visible et de façon non invasive pour les cellules.

II.1.4.4. Le Diclofénac

Le Diclofénac D899 (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) employé dans les traitements de courte durée des rhumatismes inflammatoires et des arthroses, et pour les traitements à long terme des rhumatismes inflammatoires chroniques. Il est antipyrétique, antalgique, anti-inflammatoire et anticoagulant. L'ensemble de ces propriétés est lié à une inhibition de la synthèse des prostaglandines.

Il est déposé sur les films multicouches (CHI-HA)_n ($n = 12, 24$ ou 48) réticulés avec une solution, à une concentration de 2 mg/mL. L'intégration dans la multicouche est alors due à une diffusion passive de cette molécule.

II.1.5. La β -cyclodextrine

La β -cyclodextrine monocarboxylée cCD est gracieusement fournie par le Professeur R. Darcy (University College Dublin, Irlande). Les cyclodextrines sont des macrocycles oligosaccharidiques obtenus par acétylation du glucose à partir de l'amidon. Les 3 principales cyclodextrines : α , β , ou γ , sont composées de 6, 7, ou 8 unités de D-(+)-glucopyranose. Elles augmentent la solubilité de certains principes actifs hydrophobes en les incorporant dans leur cavité elle-même hydrophobe.

II.1.6. Réactifs pour la réticulation

Le 1-éthyl-3-(3-diméthylamino-propyl) carbodiimide (EDC) et le N-hydroxysulfosuccinimide (S-NHS) sont les réactifs utilisés pour la réticulation des films multicouches (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) et permettent la formation de liaisons amides entre les groupements amines de polycations (poly(*l*-lysine), PL l) et acides carboxyliques de polyanions (dans notre cas, chitosan CHI ou acide hyaluronique HA) (Richert et al. 2004b). La réaction de réticulation se fait par ajout d'EDC, l'agent de couplage, et de S-NHS, le catalyseur, comme le montre la figure II.7 :

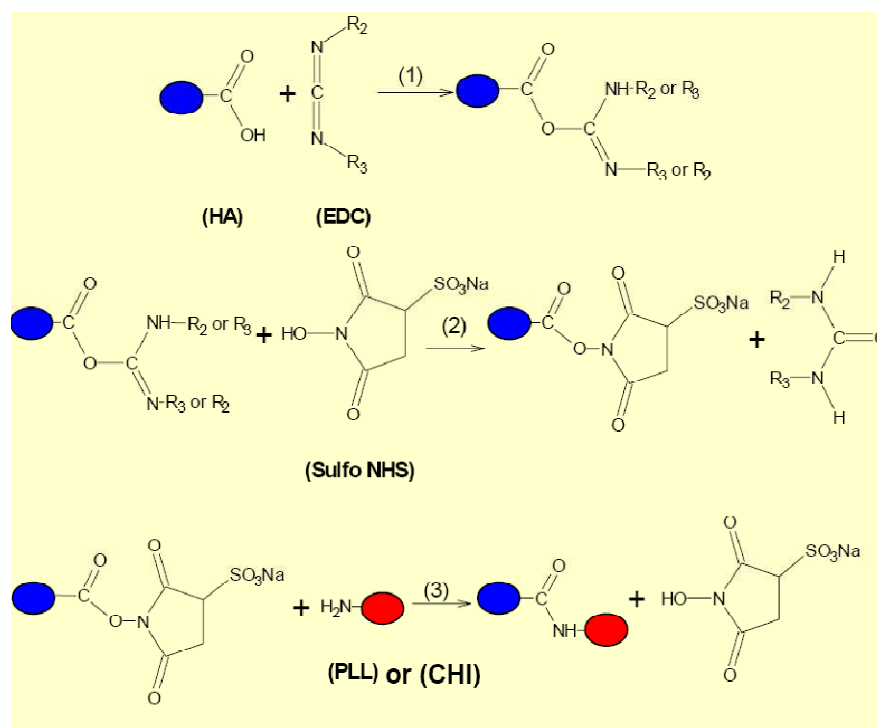


Figure II.7: Réaction chimique de réticulation d'un film (PLl-HA) ou (CHI-HA) par EDC et S-NHS.

En premier lieu, le groupement carboxylique de HA va réagir avec l'1-éthyl-3-(3-diméthylamino-propyl) carbodiimide (EDC) (1). La molécule HA-EDC réagit alors avec le N-hydroxyl sulfosuccinimide (S-NHS) pour conduire à une fonction ester activée alors que le carbodiimide est transformé en urée (2). Au cours d'une dernière étape, la fonction amine primaire de la PLl (ou de CHI) va réagir avec l'ester activé pour former une liaison amide entre le HA et la PLl (ou le CHI) et libérer le catalyseur S-NHS (3).

La manipulation se déroule de la manière suivante. Les deux réactifs sont déposés simultanément sur les films multicouches et laissés pendant un temps défini. Une solution d'EDC à 400 mM (préparée dans NaCl 0,15M pH = 4,5) est mélangée volume à volume à une solution de S-NHS à 100 mM (préparée dans NaCl 0,15M pH = 4,5). 1 mL de cette solution de réticulation est déposé dans chaque puits contenant les films (PLl-HA)₂₄ pendant 12 heures à 4 °C. 3 rinçages de 20 minutes avec un tampon NaCl 0,15 M, Tris 20 mM, pH = 7,4, supprimeront les traces de réactifs.

II.1.7. Nettoyage des supports

Les supports utilisés sont à base de silice. Plus précisément, il s'agit de lamelles de verre de diamètre 12 ou 14 mm (VWR, Strasbourg, France). Les lamelles de verre utilisées ont les caractéristiques suivantes :

- ✓ Elles sont chargées négativement pour des pH inférieurs à 9.
- ✓ Elles ont une faible rugosité (0,3 nm).
- ✓ Elles sont transparentes, ce qui facilite les observations en microscopie optique et confocale.

Avant de construire des films multicouches, les lamelles sont toujours nettoyées selon le protocole suivant :

Les lamelles sont d'abord rincées à l'éthanol (70 %) puis à l'eau. Elles sont ensuite trempées 15 minutes dans une solution de SDS 10 mM chauffée à 60 °C. Après rinçage à l'eau, les lamelles sont trempées dans une solution de HCl à 0,12N à 60 °C pendant 15 minutes. Le procédé se termine par rinçage à l'eau. Les lamelles peuvent être ensuite conservées dans de l'eau à 4 °C.

II.1.8. Tableau des réactifs et composés utilisés.

Nom du Produit	Notation ou formule chimique	Fournisseur	Masse molaire moyenne (en g/mol)
2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol ou trishydroxyméthylaminométhane	Tris	Sigma (St Quentin Fallavier, France)	121,14
Acide chlorhydrique à 37 %	HCl	Prolabo (VWR)	36,5
Bone morphogenic protein-2	BMP-2	R&D system (Lille, France)	26000
Chloroforme Normapur	CHCl ₃	VWR International S.A.S. (Strasbourg, France)	119,38
Chlorure de sodium	NaCl	Sigma	58,44
<i>d</i> (+)-Glucose monohydrate	<i>d</i> -Glu	Fluka (Sigma)	198,17

Nom du Produit	Notation ou formule chimique	Fournisseur	Masse molaire moyenne (en g/mol)
Hydrochlorure de N-(3-diméthylamino-propyl)-N'-éthylcarbodiimide	EDC	Sigma	191,71
Hydroxyde de sodium	NaOH	Sigma	40
Poly(<i>l</i> -lysine) succinylée	PL _s	Sigma	50000
Poly(<i>l</i> -lysine) fluorescéine isothiocyanate	PL _s ^{FITC}	Sigma	50000
Transforming growth factor-β1	TGF-β1	R&D system	25000
Sodium dodécyl sulfate	SDS	Sigma	288,4

Tableau II.2 : Principaux composés utilisés et fournisseurs

II.2. Méthodes

II.2.1. Système de dépôts automatisés des multicouches

La technique de trempage a été automatisée grâce à l'utilisation d'un robot (Riegler & Kirstein GmbH, Berlin, Allemagne) afin de faciliter la procédure de dépôt de multicouches de polyélectrolytes et de permettre une forte reproductibilité. Le robot est constitué d'un moteur avec un bras mobile supportant des portoirs en téflon, façonnés au laboratoire, où sont placées les surfaces à recouvrir (figure II.8).



Figure II.8: Dipping robot ou système automatisé de trempage pour la construction des films multicouches.

Les surfaces choisies pour construire les multicouches sont des lamelles de verre (voir protocole de nettoyage paragraphe II.1.6.). Le robot suivra un programme défini au préalable (positions et temps de trempage) qui sera toujours identique au cours de nos études. Les lamelles sont immergées dans les solutions de polyélectrolytes pendant 10 minutes. Puis suivent 3 étapes de rinçage dans des solutions de NaCl 0,15M (3 minutes dans un cristalliseur de 500 mL, deux fois 5 minutes dans deux flacons de 50 mL) qui élimineront l'excès de polyélectrolytes et les chaînes faiblement adsorbées. Ensuite les lamelles seront plongées dans la solution de polyélectrolytes de charge opposée et ainsi de suite jusqu'à atteindre le nombre de couches total souhaité. Ainsi, la construction d'une multicouche de $(PL\ell-HA)_{30}$ nécessitera environ 24H.

II.2.2. Construction des films de PLGA par " solvant casting "

Le dépôt de PLGA sur les multicouches réservoirs s'effectue soit par la méthode dite de " solvant casting ", soit par une technique de nébulisation ou pulvérisation.

Le " solvant casting " est une méthode simple et rapide (Lu et al. 1999). Le PLGA (en forme de granules) est dissout dans du chloroforme à une concentration de 10 mg/mL. La solution est ensuite coulée sur les lamelles en verre recouvertes des multicouches fonctionnalisées et séchées rapidement avec un pistolet à azote. Plusieurs lamelles peuvent être placées dans une boîte de Pétri en verre de diamètre 5,5 cm pour être recouvertes de PLGA simultanément. Des volumes de 4,3, 2,5 et 1,3 mL de la solution de PLGA sont alors coulés dans la boîte de Pétri pour obtenir des épaisseurs de PLGA variables (de 0,5 μ m environ à 6,8 μ m).

Une autre possibilité consiste à utiliser une cuvette de 14 mm de diamètre constituée d'un support en téflon de 14 mm et entourée d'un joint circulaire (O-ring) en caoutchouc. Le joint et le téflon forment une cuvette étanche où il est possible de couler la solution de PLGA. Le solvant est laissé à évaporer sous une hotte jusqu'à gélification du film (entre 30 minutes et 1 heure). Les lamelles sont ensuite transférées sous une pompe à vide pendant 12 heures pour enlever toutes traces de solvant résiduel. L'épaisseur finale du film de PLGA sera fonction du volume et de la concentration de solution de PLGA déposée initialement.

II.2.3. Nébuliseur

Nous avons utilisé une autre technique de dépôt du polymère PLGA nommée " spray casting " ou nébulisation (Mooney et al. 1996). Les différents mélanges de PLGA dissouts dans le chloroforme sont pulvérisés grâce à un pousse-seringue (KD Scientific 200 Hollistone, USA) couplé à un nébuliseur (Agilent Technologies, Massy, France).

Le procédé consiste en un système automatisé qui contrôle précisément les conditions de dépôt. Tout d'abord, le pousse-seringue KD Scientific 200 (Hollistone, USA) apporte une stabilité et une précision sur les volumes délivrés au nébuliseur (figure II.9).



Figure II.9: Pousse-seringue KD Scientific 200. Ce pousse-seringue permet de délivrer un volume précis au nébuliseur via un tube en téflon de 2 mm de diamètre.

Des seringues spécifiques en verre sont utilisées (Exmire Microsyringe, Ito Corporation, Shizuoka, Japan) et ont un volume maximal de 5 mL. Le piston en téflon de ces seringues permet de maintenir une très bonne étanchéité malgré la pression interne.

Le nébuliseur (Agilent Technologies, Massy, France) est composé d'une aiguille très fine adaptée à une sortie d'azote comme représenté figure II.10. La solution de PLGA circule en flux continu au travers de l'aiguille et est directement pulvérisée à sa sortie par le courant d'azote imposé autour de la buse.

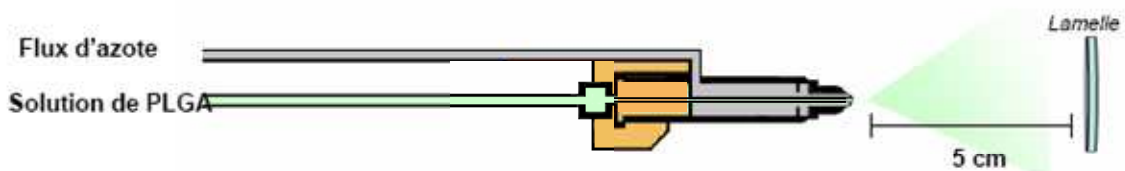


Figure II.10: Schéma du système automatique de pulvérisation du PLGA. Une solution injectée par un pousse-seringue circule au travers de l'aiguille. Dans un autre compartiment est injecté un courant d'azote dont la pression est contrôlée par un manomètre. Les deux flux se retrouvent à la sortie de la buse où l'azote pulvérise la solution de PLGA vers la lamelle de verre.

Le débit utilisé pour nos expériences est de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ et le volume total pulvérisé est de 1 ou 2 mL selon l'épaisseur désirée (tableau II.3).

Paramètres	Valeurs
Pression d'azote	2 bars
Débit volumique	300 μ L/min
Volumes injectés de PGA (à 10 mg/mL)	1 ou 2 mL
Distance nébuliseur - échantillon	5 cm
Inclinaison de la lamelle / jet	45 °

Tableau II.3: Paramètres utilisés pour la construction des films de PLGA par " spray casting " en utilisant un nébuliseur.

Grâce à ce système de nébuliseur, la vitesse de pulvérisation, le cône de pulvérisation et la taille des gouttes formées sont totalement modulables et finement contrôlables.

Cette technique va permettre de diminuer le risque de solvant résiduel dans le film de PLGA aux vues des exigences de la culture cellulaire. La solution de polymères est pulvérisée vers la lamelle où se forment alors des microgouttelettes. L'évaporation du chloroforme et la formation du film de PLGA s'effectueront très rapidement par rapport aux conditions de la méthode de " solvant casting ". Par coalescence, les gouttelettes vont progressivement former un film mince sur le substrat de façon reproductible.

II.2.4. Microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation

Principe de la technique

La technique de microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation (QCM-D) permet de mesurer des variations de fréquences de résonance d'une lame de quartz, dues à l'augmentation (ou la diminution) de masse induite par le dépôt (ou le départ) de molécules sur le cristal de quartz.

La QCM-D est une technique qui se base sur les propriétés piézoélectriques du quartz. L'effet piézoélectrique inverse fait qu'une oscillation de quelques nanomètres est générée lorsqu'un champ électrique est appliqué. Une différence de potentiel est appliquée entre les deux faces du cristal de quartz grâce à un film en or recouvrant la partie supérieure du cristal et une électrode en or sur l'autre face. Le quartz soumis à une tension électrique est équivalent à un

oscillateur harmonique et vibre alors à sa fréquence propre, qui est utilisée comme référence de pulsation. Cette fréquence de résonance du cristal est corrélée à sa masse.

Toute addition ou soustraction de masse, Δm , provoque une différence de fréquence, Δf , qui est reliée directement à la différence de masse Δm , grâce à la relation de Sauerbrey, en supposant que Δm est très inférieure à la masse du cristal :

$$\Delta f = \frac{-2\Delta m f_0^2}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}}, \quad (1)$$

où f_0 est la fréquence de résonance intrinsèque du cristal, A la surface active du cristal (entre les électrodes), ρ_q la densité du quartz et μ_q le module de cisaillement du matériau.

La relation (1) peut être simplifiée en appliquant une constante C caractérisant le cristal de quartz. Pour les cristaux utilisés dans les expériences de QCM-D, C est égal à $17,7 \text{ ng/cm}^2\text{Hz}$.

L'équation suivante peut être alors posée :

$$\Delta m_0 = -C \Delta f \quad (2)$$

Cependant, le cristal de quartz peut non seulement résonner à une fréquence f (appelée fréquence fondamentale) de 5 MHz, mais aussi à toutes ses harmoniques impaires ($f_v = \nu f$ où ν est le nombre de l'harmonique : 3, 5 et 7 dans notre cas). A chaque harmonique correspondra une variation de fréquence de résonance consécutive au dépôt de matière. Δm_0 sera alors relié à Δf_v par la relation (3) :

$$\Delta m_0 = \frac{-C \Delta f_v}{\nu} \quad (3)$$

Cette relation s'applique pour un dépôt au contact avec le vide. Il a récemment été démontré qu'elle s'applique également, de façon approchée, à un dépôt solide au contact d'un liquide sous certaines conditions (Rodahl and Kasemo 1996a; Rodahl and Kasemo 1996b).

Il est possible ensuite d'estimer l'épaisseur d_{est} de la surface adhésive grâce à la relation (4) :

$$d_{\text{est}} = \frac{\Delta m}{\rho_{\text{eff}}}, \quad (4)$$

où ρ_{eff} est la densité effective du film.

La fréquence de résonance, f , d'un cristal de quartz dépend donc de la masse totale oscillante, incluant l'eau couplée à l'oscillation. Lorsque le dépôt adsorbé sur le cristal est au contact d'un fluide, la masse m_0 représente la masse mise en mouvement lors des oscillations. Cette masse inclura non seulement la matière constituant le film, mais également le fluide contenu

dans le film. Lorsqu'un film fin et rigide se dépose, la fréquence oscillatoire va décroître de manière proportionnelle à la masse, celui-ci étant peu perturbé par l'eau environnante.

Cependant, dans de nombreuses situations, le film adsorbé n'est pas rigide et la relation de Sauerbrey devient invalide. Un film mou ne se couplera pas entièrement à l'oscillation du cristal, voire même amortira l'oscillation, ce qui correspond à un phénomène de dissipation. La dissipation va donc révéler le caractère viscoélastique d'un film. Dans ce cas, la masse de surface est faussée et sous-estimée par la relation de Sauerbrey.

Ici, la technique de QCM-D apporte une solution qui va porter à connaissance les propriétés structurales du matériel déposé. En effet, elle mesure aussi les différences de dissipation de la fréquence d'oscillation du cristal après arrêt de l'excitation électrique du piézoélectrique. L'arrêt est répété grâce à un courant alternatif imposé via les électrodes au cristal.

En fait, un générateur de fréquence excite le cristal de quartz avec une tension sinusoïdale de fréquence f_1 . Cette fréquence prend successivement la valeur de la fréquence fondamentale de résonance du cristal (5 MHz) et de ses harmoniques (15, 25 et 35 MHz). L'excitation du cristal est imposée sur une durée très brève (quelques μs). Après arrêt de l'excitation, le cristal oscille librement à la fréquence de résonance la plus proche de la fréquence d'excitation du cristal. Ces oscillations sont amorties, l'amortissement du signal étant dû à l'énergie dissipée dans le cristal, mais surtout dans le film et le fluide au contact de l'ensemble. Donc quand la source électrique est coupée, une constante d'amortissement liée à la dissipation D du système sera évaluée par la QCM-D (figure II.11).

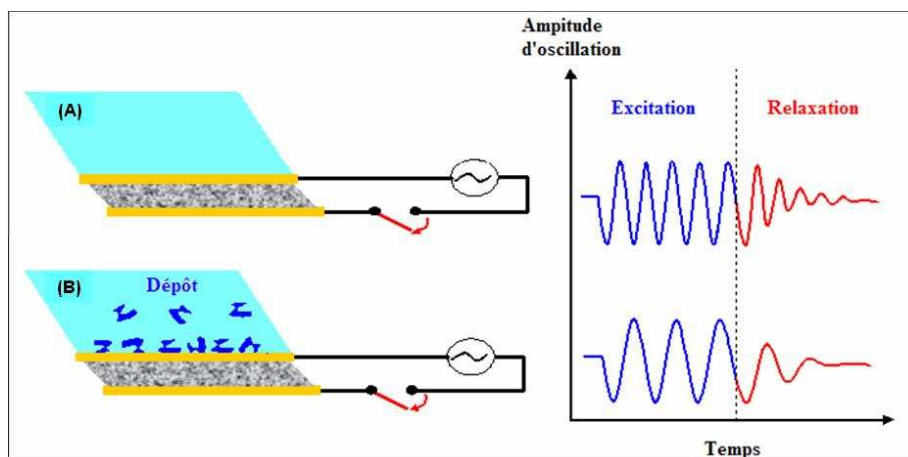


Figure II.11: Simulation d'un signal mesuré avec la microbalance à cristal de quartz. (A) Oscillation du cristal nu (en bleu). Lors de l'arrêt de l'excitation électrique, le phénomène de dissipation apparaît (en rouge). (B) Oscillation du cristal après dépôt du matériel. Le dépôt a engendré une diminution de la fréquence d'oscillation (en bleu). De plus, quand le courant est arrêté (en rouge), une différence d'amortissement est observée. La dissipation augmente donc fortement en comparaison au cristal nu.

La décroissance sera lente avec un film rigide sur la surface, alors que la décroissance sera rapide avec un film viscoélastique. Cette différence de vitesse est due à la forte perte d'énergie dans le film viscoélastique.

En mesurant la dissipation aux multiples fréquences harmoniques, la viscosité, le module d'élasticité et l'épaisseur pourront être estimés même pour des films mous en utilisant des modèles viscoélastiques (Voinova et al. 1999). Cependant, les modèles ne sont pas encore pleinement validés et il faudra prendre ces résultats avec précautions.

De cette manière, la QCM-D opère comme une balance très sensible. Les grandeurs minimales détectables sont de l'ordre de 5 ng/cm^2 dans l'eau et de 1 ng/cm^2 dans l'air. Grâce à cette technique, il est possible par exemple de vérifier que les polyélectrolytes se déposent successivement lors de la construction couche par couche par le contrôle pas à pas des variations de fréquences et des variations de dissipation du cristal de quartz vibratile (Ariga et al. 1997; Picart et al. 2001).

Descriptif de l'appareillage

La microbalance Q-Sense D301 provient de l'entreprise Q-Sense (Västra Frölunda, Suède). La figure II.12 représente une vue d'ensemble du dispositif qui comporte : une chambre de mesure thermostatée et une unité électronique interfacée avec un ordinateur.



Figure II.12: Dispositif de QCM-D Q-sense type D300. Il comporte de gauche à droite : une chambre de mesure, une unité électronique pour contrôler la température des liquides dans la chambre via un système Peltier, et un ordinateur pour collecter les mesures puis les interpréter.

L'unité électronique, cœur du système, fait la jonction entre la chambre de mesure et l'ordinateur. Grâce à cette unité, une température de travail est imposée dans la chambre à une valeur fixe entre 18 et $40\text{ °C} \pm 0,025\text{ °C}$ par un système Peltier. Un bouton unique en façade (en omettant le bouton on/off) doit être tourné pour fixer la température désirée. La chambre de mesure contenant le cristal vibratile est aussi caractérisée par une molette unique en façade comme figuré photo II.13.



Figure II.13: Photographie de la chambre de mesure de la QCM-D.

Le cristal se situe dans une cellule de mesure d'un volume approximatif de 75 μL où se dérouleront les dépôts de matériel. Avant d'arriver dans la cellule, le liquide est maintenu dans une boucle thermostatée (T-Loop) de capacité 500 μl qui est raccordée à un réservoir externe via un capillaire verticale (Tygon, R-3603) où le liquide est dispensé. Ainsi les liquides sont injectés dans la cellule à température fixée. Pour faire circuler le liquide, une valve déplaçable par la molette va permettre d'abord de mettre le liquide dans la " loop " (l'excédent sort de la chambre par le capillaire gauche) comme montré figures II.13 et II.14. Après avoir atteint la thermorégulation, le liquide est injecté dans la cellule en plaçant la molette sur " sensor ". L'excédent de matériel sort par un autre capillaire (à droite de l'appareil).

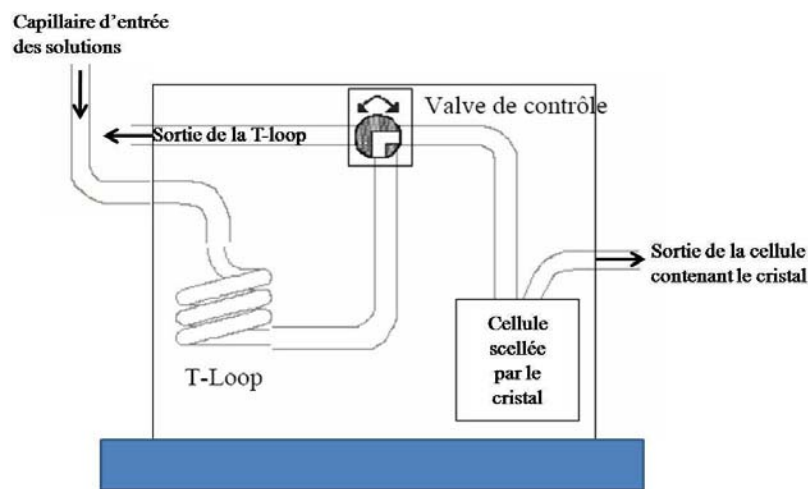


Figure II.14: Circuit de la chambre de mesure de QCM-D.

Les cristaux utilisés sont de type QSX 303 (Q-sense). Ils sont composés de quartz, entouré de surfaces en or et enfin d'un film de SiO_2 de 100 nm sur l'une des faces (figure II.15). Ils possèdent une fréquence de résonance fondamentale de 5 MHz et des fréquences harmoniques de 15, 25 et 35 MHz. Les fréquences de résonance du cristal sont mesurées avec une précision de 1 Hz.



Figure II.15: Cristal de quartz vu de face. Le cristal de quartz est pris en sandwich avec de l'or et recouvert de SiO_2 sur la face de travail.

Protocole expérimental

La construction des films se fait *in situ*. Les temps de réaction sont les mêmes que pour la construction manuelle ou avec le " dipping robot ". 1,5 mL de solution de polyélectrolytes sont injectés dans la T-Loop afin de réguler la température de tous les liquides injectés à 25 °C +/- 0,05 °C. Après un temps d'attente de 3 minutes, le liquide (0,5 mL) est injecté dans la cellule sensible. En fait, les 0,5 mL injectés par le capillaire ne seront pas ceux retrouvés dans la cellule mais vont " pousser " jusqu'à la cellule le liquide thermostaté présent dans la T-Loop. Après 10 minutes d'absorption, une solution de rinçage déjà thermostatée est injectée puis laissée pendant 10 minutes. Pour cela, le tampon est injecté dans la loop à 7 minutes de temps de dépôt afin d'injecter un liquide thermostaté. Le procédé est répété avec les solutions successives de polycations ou de polyanions jusqu'à formation du film multicouche désiré. A la fin de l'expérience, on peut sortir le cristal avec le film pour des observations en AFM par exemple. Sinon le système QCM-D (capillaires, T-loop, cellule et cristal) est nettoyé avec une solution d'Hellmanex à 2 % (Hellma, Paris, France). L'Hellmanex est un concentré liquide alcalin très efficace pour le nettoyage du verre, quartz, porcelaine... Après 30 minutes à température ambiante, l'Hellmanex est rincé avec du HCl 0,1 M (10 minutes). Un lavage à l'eau puis un séchage à l'azote de tout le système terminent le processus de nettoyage.

Durant le temps d'adsorption, une acquisition en continu des données de la chambre de mesure est effectuée. Grâce au logiciel " Q-Soft ", on peut donc suivre les paramètres, à savoir les différences de fréquence Δf_v (en bleu) et la dissipation D_v (en rouge) (figure II.16) en fonction du temps et en temps réel.

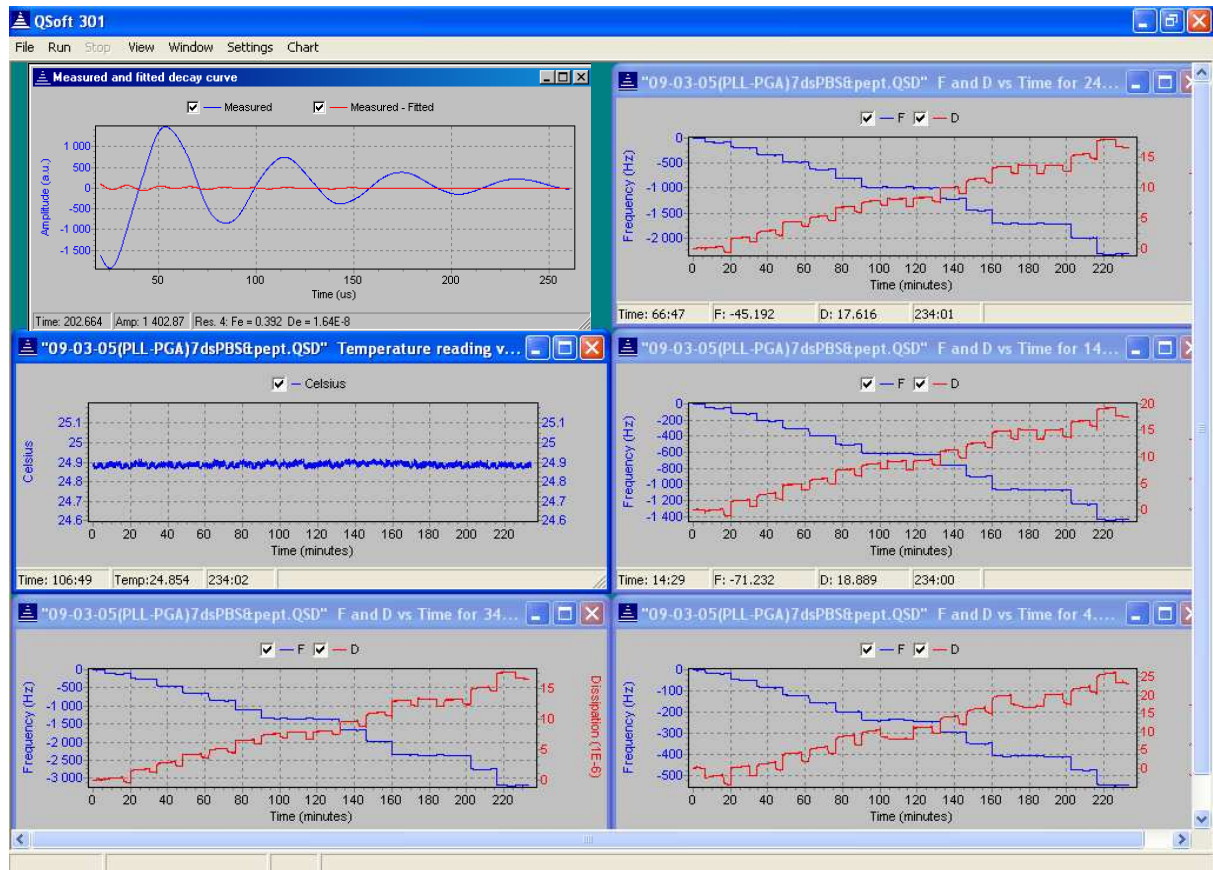


Figure II.16: Exemple d'acquisition en QCM-D avec le logiciel Q-Soft (capture d'écran). La construction de $(\text{PLL-PGA})_3\text{-PLL-norepinephrine-(PLL-PGA)}_2\text{-P4-PGA-PLL-PGA}$ est réalisée.

Cette expérience met clairement en évidence la formation sur le cristal d'un film multicouche de polyelectrolytes lors des dépôts successifs de polyelectrolytes ((Picart et al. 2001) et (figure II.17)).

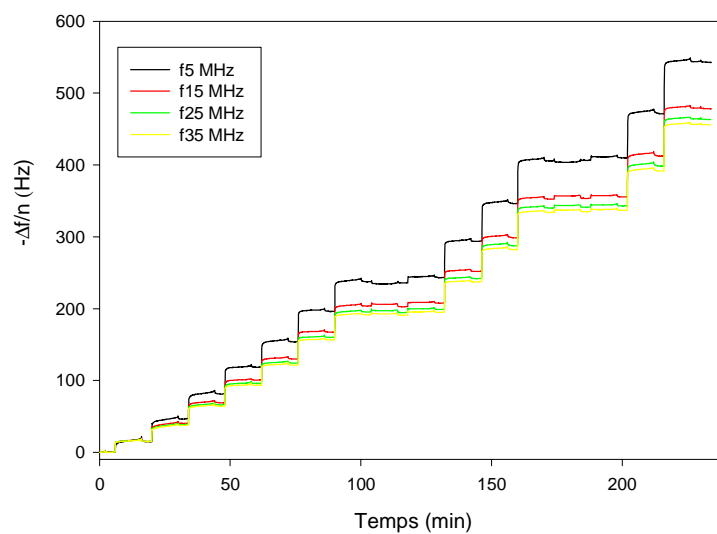


Figure II.17: Changements des fréquences mesurées en QCM-D lors de la construction d'un film multicouche $(\text{PLL-PGA})_3\text{-PLL-norepinephrine-(PLL-PGA)}_2\text{-P4-PGA-PLL-PGA}$.

Ces courbes (figure II.18) sont alors traitées afin de visualiser les variations des paramètres en fonction du nombre de couches déposées grâce à un logiciel développé au laboratoire. Ce logiciel utilise le modèle viscoélectrique de Voight (Voinova et al. 1999) et permet de déterminer l'épaisseur et la viscosité, entre autres.

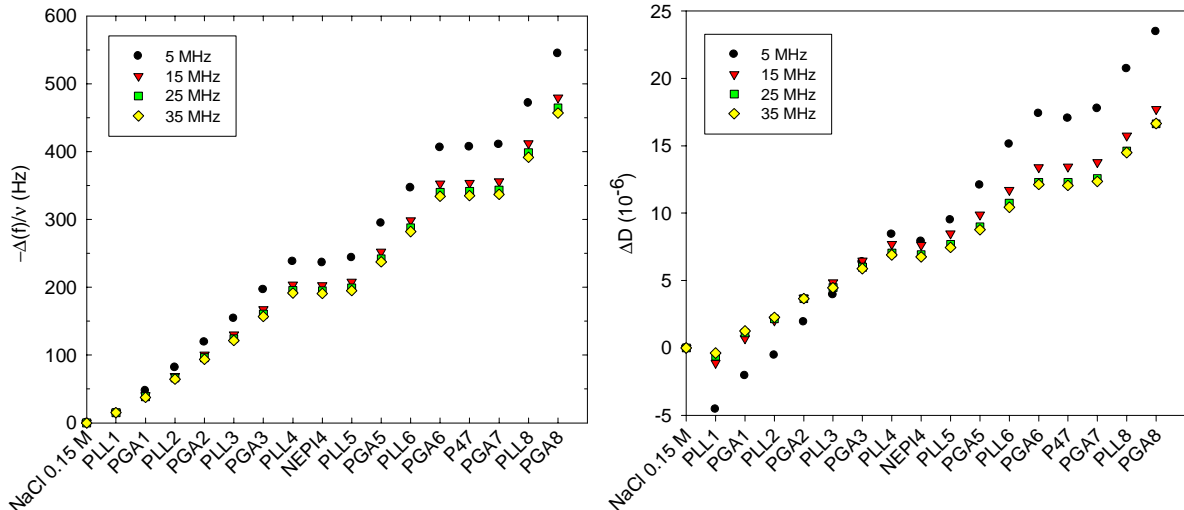


Figure II.18: Evolution des paramètres $-\Delta f_v$ (A) et ΔD_v (B) au cours de la construction d'un film (PLL-PGA)₃-PLL-norepinephrine-(PLL-PGA)₂-P4-PGA-PLL-PGA. Les courbes sont représentées en fonction des couches déposées en abscisse.

II.2.5. Microscope à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM) dérive de la microscopie à effet tunnel. L'AFM est une variante destinée à observer la topographie des surfaces non-conductrices. Développée depuis 1986 (Binnig et al. 1986), elle appartient à la famille des microscopies à champ proche ou microscopies à sonde locale.

Cette technologie s'est imposée dans l'imagerie de la topographie des surfaces à l'échelle nanométrique. Des données comme l'épaisseur, la rugosité, la viscosité sont détectables avec une grande précision.

Plusieurs modes de fonctionnement sont disponibles : le mode contact, le mode oscillant ou "tapping" et le mode non-contact. Le mode non-contact requiert un vide poussé (10^{-11} Torr) et n'a pas été envisagé dans notre étude. Le mode "tapping" étudie les échantillons faiblement adsorbés sur leur support et fragile. La pointe oscille à la fréquence de résonance du *cantilever* et touche la surface de l'échantillon par intermittence. Ce mode d'investigation permet un contact non invasif et permet de ne pas endommager les échantillons. Le mode

contact est le mode le plus couramment utilisé. C'est ce dernier mode qui sera employé pour l'étude de nos échantillons.

Principe de la technique

L'échantillon est collé préalablement sur une pastille métallique pour permettre une fixation sur un tube piézoélectrique. Le tube piézoélectrique autorise des mouvements précis de l'échantillon dans les trois dimensions de l'espace avec une précision inférieure au nanomètre. Une pointe effilée ayant une terminaison de dimension nanométrique ($< 20\text{nm}$) en nitrure de silicium (Si_3N_4) joue le rôle de sonde et est fixée à l'extrémité d'un microlevier flexible (ou "cantilever" en anglais) possédant une constante de raideur connue (figure II.19). Cette pointe va balayer la surface de l'échantillon à imager.

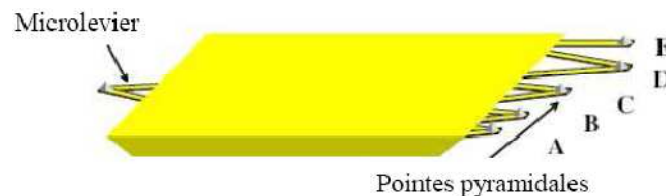


Figure II.19: Représentation schématique d'un cantilever.

La technique repose sur la détection des interactions entre la pointe et la surface. Le mode déflexion consiste à conserver la pointe à une distance constante par rapport à l'échantillon. Cette distance pointe/échantillon dépend de la force appliquée par le microlevier et donc, pour maintenir une distance constante, il faut appliquer une force constante de la pointe sur la surface.

Lors de l'acquisition de l'image, la pointe est approchée au voisinage de la surface et subit alors des interactions à courte distance ($< 5\text{ nm}$) dites de champs proches (forces répulsives et forces attractives). Lors du balayage de la surface ligne par ligne, les variations de la topographie de l'échantillon provoquent une déflexion du cantilever. Cette déflexion est alors mesurée en focalisant sur le cantilever un faisceau laser réfléchi vers un photodétecteur, c'est-à-dire une diode à quatre quadrants. Les variations de position du cantilever sont ainsi mesurées par le photodétecteur. Comme on veut maintenir la distance pointe/échantillon constante, la déflexion du cantilever est corrigée par une boucle de rétroaction. Cette boucle d'asservissement maintient constante la déflexion du cantilever (la force d'interaction) par correction de la hauteur de l'échantillon qui est monté sur un tube piézoélectrique. Le déplacement est contrôlé avec une précision subnanométrique (figure II.20).

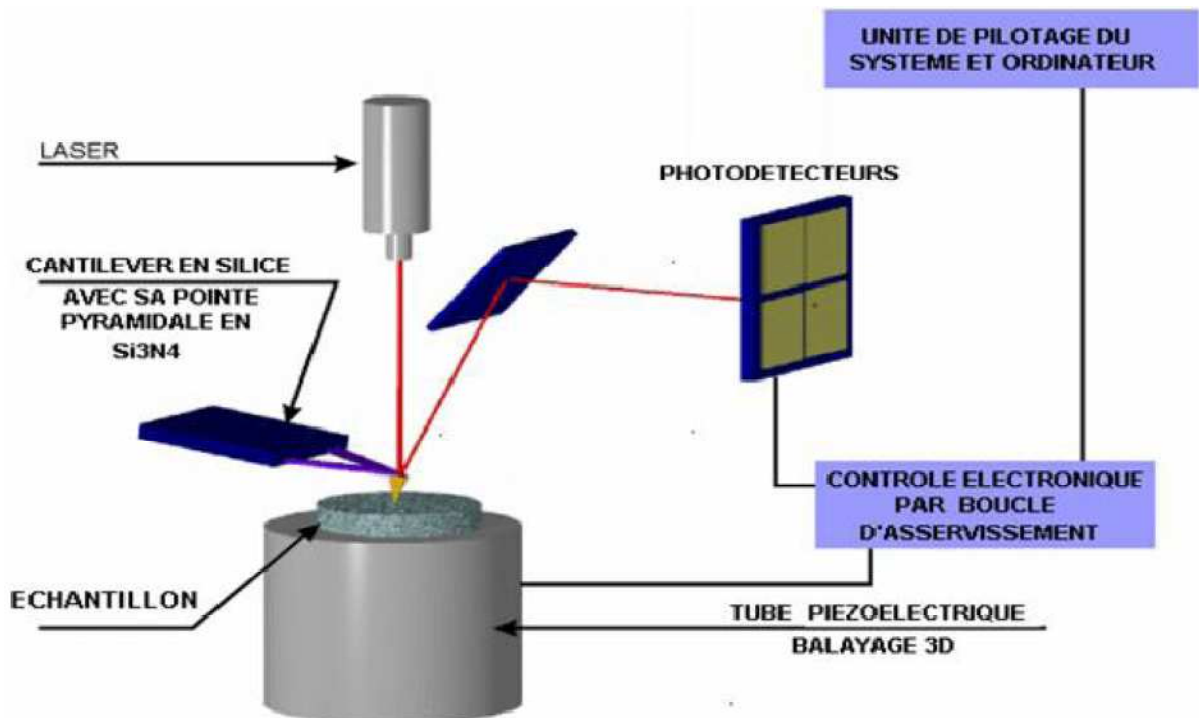


Figure II.20: Schéma d'un microscope à force atomique. Une céramique piézoélectrique permet le contrôle du déplacement de l'échantillon en x , y , z . Un faisceau laser est focalisé sur le *cantilever*. Les variations de position du faisceau réfléchi sont détectées par une photodiode à quatre quadrants.

Deux images seront donc obtenues : une image de déflexion et une image en hauteur. L'image de hauteur représente la topographie de la surface explorée et est basée sur les mouvements du tube piézoélectrique. L'image de déflexion permet de visualiser les erreurs résiduelles après correction par rétroaction. Cette image d'erreur contient les fréquences spatiales hautes et est riche d'information mais ne permet pas de déterminer des paramètres comme la rugosité. De plus, il faut noter que la pointe pyramidale voit l'incident de surface avant l'extrémité de la pointe en raison de sa forme triangulaire. Ceci entraîne des erreurs visualisables sur l'image de déflexion. Dans le cas de notre étude la topographie des surfaces est très bien déterminée en utilisant des pointes ayant un diamètre terminal inférieur à 20 nm.

Descriptif de l'appareillage

Les images topographiques sont effectuées sur un appareillage Nanoscope IV (Veeco, Dourdan, France) avec des pointes pyramidales ($\alpha = 35^\circ$, rayon de courbure de 15 nm environ) montées sur des leviers triangulaires de constantes de raideur comprises entre 50 et 200 pN/nm (MLCT-AUHW, Veeco, Dourdan, France). Les observations des films sont

effectuées en phase sèche. Les échantillons sont conservés au dessiccateur à cristaux après les avoir séchés avec un flux d'azote.

Le logiciel de traitement d'image associé à l'appareil permet l'analyse en coupe transversale, l'analyse des profondeurs, ou encore la mesure de la rugosité entre autres.

Mesure de la rugosité RMS

La rugosité RMS, pour " root mean square ", est définie comme l'écart-type des points de l'image. Elle correspond donc à la moyenne des écarts quadratiques des hauteurs mesurées par rapport au plan moyen, en d'autres termes, la racine carré de la moyenne du carré des distances entre les points et la hauteur moyenne de l'échantillon :

$$Rrms = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (z_i - \bar{z})^2}{N-1}}$$

Cette valeur est en Rq qui représente le paramètre de la rugosité RMS de surface. Elle a pour unité le nm. Le logiciel MutiMode Zeiss intègre cette formule mathématique et permet de mesurer la rugosité RMS d'une zone précise sélectionnée à partir de l'image obtenue par AFM.

II.2.6. Fluorimètre

La fluorescence correspond à une émission de lumière par des molécules revenant à leur état fondamental d'énergie après avoir été portées dans un état excité instable. La lumière est émise pendant un laps de temps court, de l'ordre de quelques nanosecondes. L'excitation est causée par une irradiation avec une lumière UV ou visible. Une molécule fluorescente possède donc la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse et de la restituer rapidement sous forme de fluorescence. Le fluorimètre va permettre de quantifier cette fluorescence. Le trajet optique débute au niveau d'une lampe halogène de quartz (figure II.21).

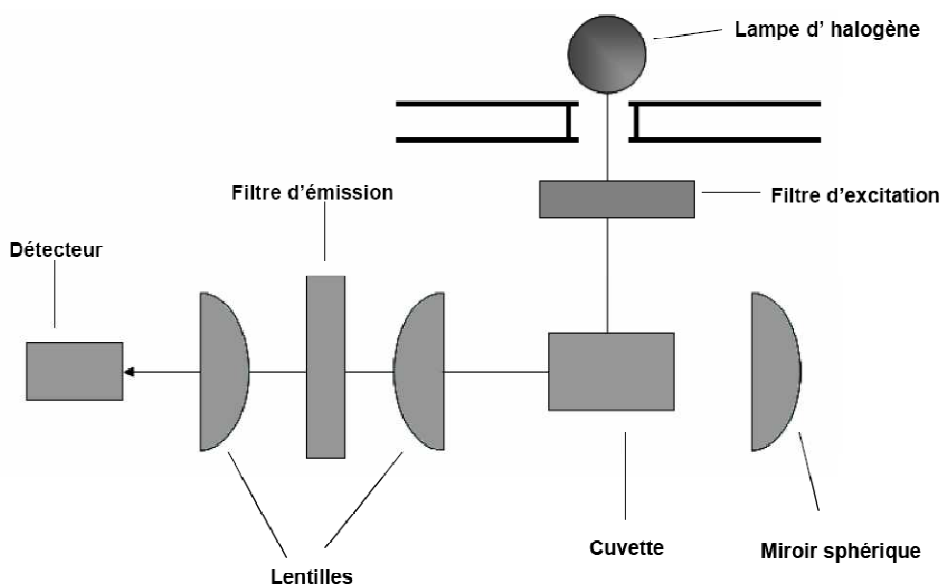


Figure II.21: Schéma de fonctionnement d'un fluorimètre. Les filtres d'excitation et d'émission vont permettre de sélectionner spécifiquement la lumière. L'intensité de lumière émise permet de remonter à la concentration en fluorophore.

Un monochromateur d'excitation est placé juste après pour découper une bande étroite de longueurs d'onde dans le spectre continu de la lampe (entre 350 et 900 nm). Cette lumière focalisée sur l'échantillon porte les molécules dans un état électronique excité. La lumière émise lors du retour à l'état fondamental est focalisée par un miroir sphérique et dirigée vers une première lentille asphérique. Un deuxième filtre (émission) de longueur d'onde correspondant à la fluorescence de l'échantillon est positionné sur le trajet optique. Ensuite la lumière traverse une deuxième lentille asphérique qui la dirige au niveau du détecteur. Le système de détection est une photodiode avec un circuit analogique amplifiant le signal. Le signal amplifié est transformé en un signal digital et converti en unités relatives de fluorescence.

Un fluorimètre de marque VersaFluor (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) avec un filtre d'excitation EX 490/10 (longueurs d'onde de 485 à 495 nm) et un filtre d'émission EX520/10 (longueurs d'onde de 515 à 525 nm) est utilisé pour quantifier les molécules fluorescentes telles que le Tx^{Green 488}. La cuvette de mesure a une dimension de 35 x 5 x 5 mm³.

II.2.7. Microscope à épifluorescence

Les observations des différentes cultures cellulaires sont effectuées avec un microscope TE200 (Nikon) équipé en champ clair et en épifluorescence. Le système se compose notamment d'une lampe au mercure 100W et de filtres pour observer la coloration Hoechst (UV 348/461 nm), et les marquages avec des sondes FITC (495/520nm) ou rhodamine (560/590 nm). Les images sont acquises à l'aide d'une caméra numérique DMX1200 (Nikon) associée à un logiciel de capture d'images (Lucia).

Un schéma simplifié permet de comprendre le principe du microscope à fluorescence (figure II.22, tiré de <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Microscopie/fluo/fluorouge.htm>).

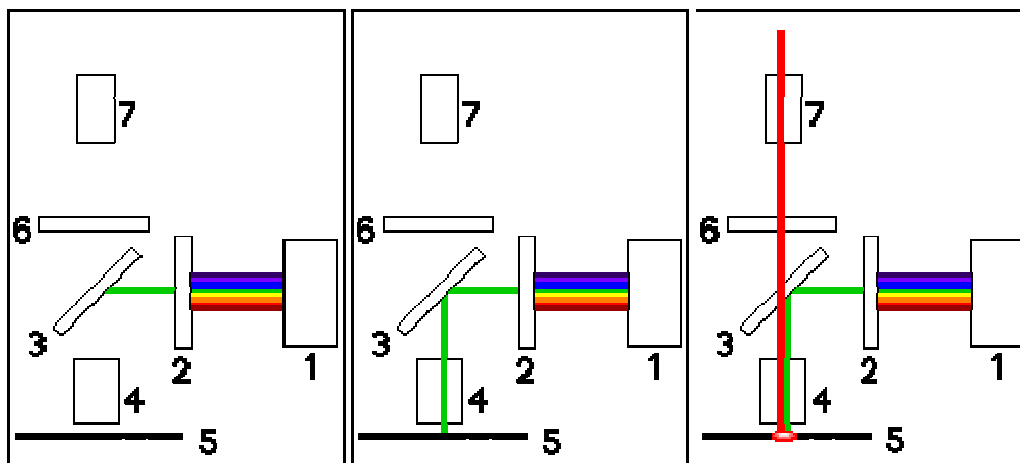


Figure II.22: Schéma de fonctionnement du microscope à épifluorescence.

II.2.8. Microscope confocal à balayage laser

La microscopie confocale à balayage laser (CLSM) représente une avancée technologique majeure dans l'imagerie biologique. Elle est basée sur la microscopie à épifluorescence complétée par une lumière cohérente (un laser) et de composants dont un sténopé (" pinhole " en anglais) dans le but d'éliminer la fluorescence provenant de plans défocalisés. En effet, en microscopie à épifluorescence, l'image est mise au point sur le plan focal mais toute la lumière due à l'excitation des molécules fluorescentes en dehors du plan focal ou placées sur le trajet de la lumière est aussi enregistrée. Ce défaut est corrigé en microscopie confocale qui discrimine les plans en dehors du plan focal. Le laser n'éclaire l'échantillon que localement. Seul le signal provenant du plan focal est transmis au détecteur grâce au trou d'aiguille placé sur le trajet optique et seule l'image de la fluorescence émise dans le plan est enregistrée. Le signal récupéré est donc exempt de parasites et sans perte de résolution.

Le brevet de Marvin Minsky pour le microscope confocal date de 1955 mais la technique n'est rentrée en pratique que dans les années 80 avec l'utilisation de laser, à la place des lampes à arc, qui permet de cibler les zones à observer. Des images de matériaux fluorescents sous forme de coupes horizontales virtuelles sont accessibles grâce à ce système ainsi que des représentations 3D par sommation de ces coupes. Cette avancée technologique permet d'accéder virtuellement à l'intérieur des objets transparents avec pour seule obligation d'y intégrer des molécules fluorescentes.

Fonctionnement du microscope à balayage laser

Le principe du CLSM est résumé par la figure II.23.

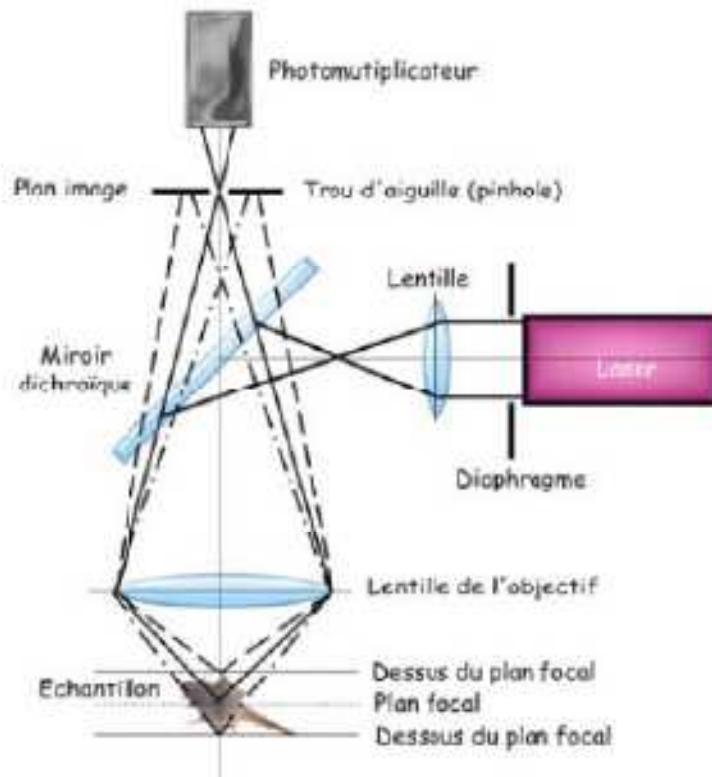


Figure II.23: Schéma de fonctionnement du microscope confocal à épifluorescence. Le rayon laser excitateur illumine l'échantillon. Seuls les rayons fluorescents du plan focal sont sélectionnés grâce à un diaphragme variable ou "pinhole" placé dans un plan focal conjugué à celui de l'objectif. La fluorescence parasite (lignes en pointillé) est ainsi éliminée avant le photomultiplicateur pour la détection des signaux.

La surface est éclairée par une source ponctuelle de lumière, un laser, concentrée grâce à une lentille dans un plan focale. Un trou d'aiguille situé dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif (plans confocaux) bloque physiquement les photons ne provenant pas du plan focal avant le détecteur. De cette manière, seuls les photons provenant du plan focal passent le diaphragme et participent à la formation de l'image, d'où le nom "confocal" (lumière conjuguée au plan focal). Un photomultiplicateur est installé en bout du trajet lumineux. Il amplifie le signal qui est alors transmis à un capteur enregistrant l'image pixélisée.

Pour parcourir l'échantillon, l'objectif se déplace selon l'axe z avec un moteur piézo-électrique par pas successifs de 300 nm. Le plan focal est alors modifié successivement. Le balayage de l'échantillon en (x,y) par le laser fournit une image de chaque plan focal. Ce balayage est obtenu à l'aide de miroirs orthogonaux motorisés disposés sur le trajet optique du

laser. La résolution horizontale (x,y) est de l'ordre de 150 nm et la résolution verticale (z) de l'ordre de 400 nm.

Les lasers Argon contenant trois raies : 405 nm (la plus faible, violet extrême), 488 nm (bleu) et 561 nm (vert-jaune), Hélium Néon I (543 nm, vert), et Hélium Néon II (633 nm, orangé-rouge) sont utilisables. Il est ainsi envisageable d'imager un échantillon avec 3 fluorophores différents en microscopie confocale.

Protocole expérimental

Le microscope confocal utilisé pour imager les échantillons fluorescents est le modèle LSM 510 (Zeiss, Allemagne) monté sur un microscope AxioVert100M (Zeiss) avec objectifs de grandissement 40 fois d'ouverture numérique de 1,2 μm ou de grandissement 63 fois à huile d'ouverture numérique de 1,4 μm . La fluorescence verte de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), ou du Tx^{Green 488}, est détectée après excitation du laser Argon (488 nm) avec un filtre d'émission ayant une bande passante de 505 à 530 nm. La détection de la fluorescence rouge de la rhodamine B (Rho) est obtenue après excitation du laser HeNe I (543 nm) puis détectée avec un filtre passe-haut de 585 nm. Enfin, la coloration bleue des cellules par du Hoechst a été visualisée par excitation avec le laser Argon (405 nm) puis un filtre d'émission ayant une bande passante de 420 à 480 nm (figure II.24).

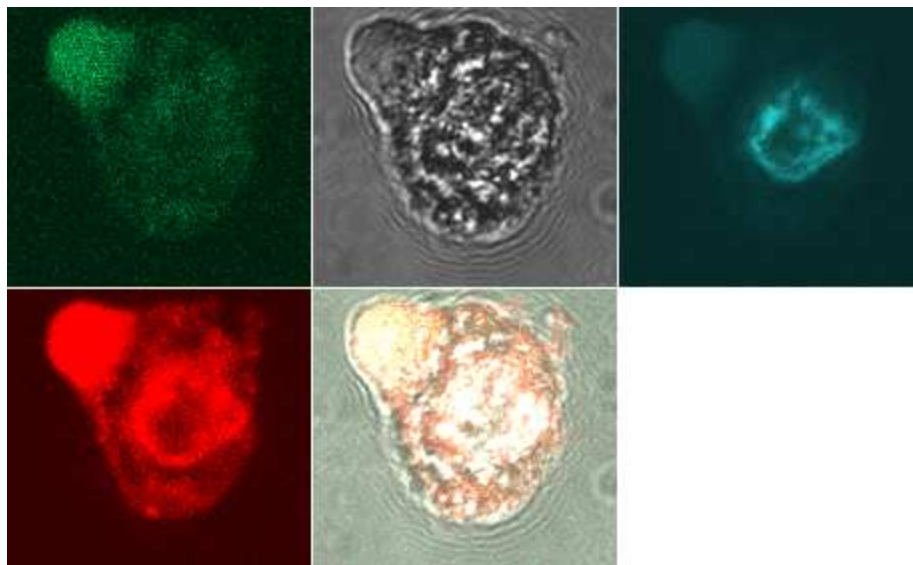


Figure II.24: Observation d'une cellule HT29 avec 4 canaux : vert, champ claire, bleu et rouge en CLSM.

La taille de l'image est de 21,21 x 19,53 μm^2 . La dernière image est la sommation des 4 autres.

Les images d'un échantillon fluorescent peuvent correspondre aussi à un empilement de coupes virtuelles horizontales. Le logiciel Zeiss LSM Image Browser (version 3) reconstitue

alors un objet tridimensionnel en les additionnant. Des coupes transversales virtuelles de l'échantillon en (x,z) ou en (y,z) sont également réalisables pour visualiser l'épaisseur du film.

II.2.9. Dichroïsme circulaire

Principe de la technique

Le spectropolarimètre pour la mesure du dichroïsme circulaire (DC) est une technique spectroscopique d'analyse puissante pour caractériser l'activité optique des molécules due à la présence de carbones asymétriques. Le dichroïsme circulaire représente la capacité des molécules optiquement actives à absorber différemment les composantes droite et gauche d'un faisceau de photons polarisés circulairement. A la sortie de l'échantillon, la polarisation circulaire des composantes persiste, mais leur amplitude a changé. Dans les cas les plus courants, l'étude de la conformation des acides nucléiques ou des protéines est accessible grâce à cette technique non destructive. L'enregistrement de spectres de DC renseigne sur la nature des différents types de structures secondaires de la protéine : hélices α , feuillets β (parallèles ou antiparallèles), "coudes" et structures désordonnées (*random coil* en anglais). Le traitement des données permet d'évaluer les changements d'états conformationnels d'une protéine en fonction de nombreux facteurs (température, solvant, pH, substrats...) et d'estimer la quantité de chaque conformation de manière rapide.

Grâce à cette technique, une différenciation entre deux molécules chirales est possible car leurs coefficients d'extinction molaires (ϵ) pour une lumière polarisée circulairement gauche (ϵ_G) et droite (ϵ_D) sont différents. La différence entre ϵ_G et ϵ_D ($\epsilon_G - \epsilon_D$), soit $\Delta\epsilon$, correspond au phénomène de DC et s'exprime en $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ou en $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$.

Toutefois, la grandeur mesurée par l'appareil n'est pas directement le DC ni les ϵ . Les polariseurs mesurent l'ellipticité θ en millidegrés (mdeg) pour chaque longueur d'onde. Cette ellipticité est un angle correspondant à la forme de la polarisation de la lumière : si la polarisation est rectiligne alors $\theta = 0^\circ$, et si la polarisation est circulaire alors $\theta = 45^\circ$. Ensuite l'ellipticité molaire $[\theta]$ est définie comme suit :

$$[\theta] = \frac{100\theta}{Cl},$$

avec C la concentration molaire en mol/L et l la longueur de l'échantillon traversée par la lumière en cm.

L'ellipticité molaire est directement proportionnelle aux coefficients d'extinction \square_G et \square_D , soit au DC, si l'on pose l'hypothèse que le phénomène de DC est faible. La relation suivante peut alors être développée :

$$[\theta] = K \times (\varepsilon_G - \varepsilon_D),$$

avec $K = 3298 \text{ mdeg}$.

Une relation directe entre l'ellipticité θ et le DC existe donc :

$$\theta = K' \times \Delta\varepsilon \times C \times l,$$

avec $K' = 32,98 \text{ mdeg}$.

Nous représenterons les résultats de DC pour les films multicouches de polyélectrolytes en termes de θ en mdeg sans faire la conversion en DC en $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ étant donné qu'il est difficile d'estimer la concentration de chaque élément dans le film. Nous nous permettrons par abus de langage de parler de DC même s'il ne faut pas oublier que seule l'ellipticité est représentée.

Dans notre étude, le DC sera exploité avec les polyélectrolytes poly(lysine) PL et poly(acide glutamique) PGA, deux poly(acides aminés), pour différencier les compositions chirales ℓ et d de solutions de polyélectrolytes ou de films multicouches. L'appareil de DC est particulièrement sensible à la chiralité de ces polypeptides pour les longueurs d'ondes comprises entre 190 et 250 nm (UV lointain) étant donné que la liaison peptidique absorbe dans cette gamme de longueurs d'onde (Johnson 1978). De plus, l'évolution de la composition des films multicouches en énantiomères ℓ et d sera mesurée après mise en contact des films dans des solutions de polyélectrolytes de chiralité opposée à celle constituant le film.

Protocole expérimental

Les mélanges de polyélectrolytes à chiralité différente se font selon le modèle suivant : $(PLd_x, PL\ell_{1-x})$ pour la poly(lysine) et $(PGAd_x, PGA\ell_{1-x})$ pour le poly(acide glutamique), où x est le ratio en nombre de monomères d du mélange par rapport à la forme ℓ . x représente donc le rapport entre le nombre de monomères de type d présents dans les solutions de polypeptides et le nombre total de monomères. Lors des différentes expériences, la proportion x de polypeptides de type d varie de la même façon dans les solutions de polyanions que dans les solutions de polycations. Par ailleurs, afin de ne pas induire de compétition résultant des différentes longueurs de chaînes lors de l'adsorption, des lots de polyélectrolytes avec des

masses moléculaires voisines ($M_w = 44$ kD pour PGA_ℓ , 38 kD pour $PGAd$, 38 kD pour PL_ℓ et 58 kD pour PLd) ont été utilisés.

Les courbes représentant le DC de deux énantiomères de PL (par exemple) en fonction de la longueur d'onde présentent un point d'inflexion pour les courtes longueurs d'ondes. Elles ont l'allure caractéristique suivante (figure II.25) :

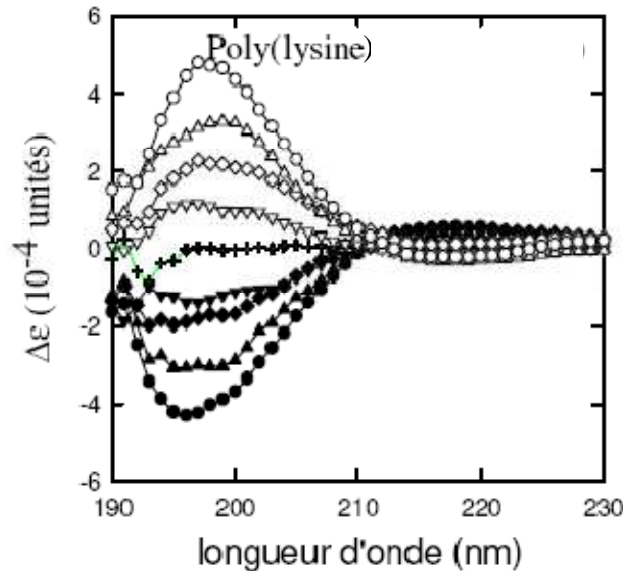


Figure II.25: Spectres de dichroïsme circulaire pour différentes solutions de $(PLd_x, PL_{l_{1-x}})$ où $x = 0$ (●); $x = 0,12$ (▲); $x = 0,25$ (◆); $x = 0,33$ (▼); $x = 0,5$ (+); $x = 0,67$ (∇); $x = 0,75$ (◇); $x = 0,88$ (Δ); $x = 1$ (○).

Deux énantiomères donnent des courbes opposées en CD comme montré sur la figure II.25 :

- ✓ Les courbes dont la tangente au point d'inflexion a une pente positive correspondent aux énantiomères de forme d .
- ✓ Les courbes dont la tangente au point d'inflexion a une pente négative correspondent aux énantiomères de forme l .

Avant l'analyse, les films sont séchés sous un flux d'azote. Les lames de quartz sont utilisées comme surface à la place du verre car elles n'absorbent pas dans le domaine spectral étudié. Cependant, le spectre de la lame de quartz nue sera toujours soustrait aux spectres des films construits sur la lame de quartz afin d'enlever les bruits de fond potentiels.

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- ✓ La lamelle en quartz est immergée 5 minutes dans chaque solution de polyélectrolytes. La couche précurseur est une couche de poly(éthylène glycol) PEI suivie de la construction $(PGAd_x, PGA_{l_{1-x}}-PLd_x, PL_{l_{1-x}})_6$ ou $(PGAd_x, PGA_{l_{1-x}}-PLd_x, PL_{l_{1-x}})_5$ - $PGAd_x, PGA_{l_{1-x}}$

✓ Un rinçage rapide puis 5 minutes de rinçage dans une solution de NaCl à 0,15 M, pH = 7,4 suit toujours les étapes dépôts couche par couche de polyélectrolytes.

✓ Après la construction couche par couche du film multicouche de polyélectrolytes, la lamelle en quartz est immergée à des temps variables dans une solution de polyélectrolytes de même nature que le polyélectrolyte constituant la couche terminale du film et d'énantioméries égale ou opposé.

✓ Juste avant la mesure du film en DC, un rinçage rapide puis 5 minutes de rinçage avec H₂O sont effectués afin d'enlever le tampon NaCl.

✓ Un séchage de la lame de quartz recouverte du film avec un flux d'air pur termine la préparation de l'échantillon pour le DC.

Descriptif de l'appareillage

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été mesurés sur un appareil JASCO J-810 (figure II.26) avec une lamelle en quartz de 3,8 x 1,2 x 0,1 cm³ (Hellma precision cells, type 665-QG, Hellma, Paris, France). Les données enregistrées sur le spectromètre sont en mdeg. Elles peuvent être recalculées et exprimées en ellipticité molaire (mdeg.m².mol⁻¹) comme démontré plus haut.



Figure II.26: Photographie du spectromètre infrarouge à dichroïsme circulaire Jasco J-810.

La température est toujours maintenue constante pour toutes les expériences. La cellule de mesure est placée sous flux d'azote (5 L/min) à $20 \pm 0,2$ °C. La plage de longueur d'onde étudiée varie de 190 à 250 nm, le pas d'incrément de longueur d'onde étant fixé à 1 nm. Les différents échantillons sont placés dans une cellule de mesure où le trajet optique est de 0,01 cm. La concentration totale en polyélectrolytes est fixée à 1 mg/mL dans du NaCl 0,15

M et à un pH de 7,4. Chaque spectre est obtenu en faisant la moyenne de cinq balayages de longueurs d'onde entre 190 et 250 nm.

II.2.10. Test de viabilité cellulaire par mesure de l'activité de la phosphatase acide

Pour quantifier la viabilité cellulaire, plusieurs techniques sont à disposition. Elles marquent différents éléments cellulaires. Ainsi, pour ne citer que les plus courantes :

- ✓ Le trypan bleu (à 20 %) permet de colorer en bleu les cellules mortes car leur membranes sont perméables alors que les cellules vivantes exclues pendant un certain temps le trypan bleu.
- ✓ Le MTT est le substrat d'enzymes déshydrogénases mitochondriales et est transformé en un composé chromophore : le formozan pourpre.
- ✓ Le rouge neutre est pinocyté par les cellules vivantes, les colorant ainsi en rouge.
- ✓ Le cristal violet s'intègre dans l'ADN.
- ✓ Le dosage enzymatique de la lactate déshydrogénase (LDH) va permettre de mener un test de mortalité, les cellules mortes ayant relâché leur LDH dans le surnageant.
- ✓ Le pNPP, substrat des phosphatases, est modifié en un composé jaune : le p-nitrophénol.

Le pNPP est la technique qui a été choisie pour faire les mesures de la viabilité cellulaire étant plus sensible que le test au XTT (Ueda et al. 1994).

Comme dit précédemment, le pNPP représente un substrat chromogénique des phosphatases dont la phosphatase acide (E.C : 3.1.3.2.) qui l'hydrolyse en un composé terminal le p-nitrophénol selon la réaction suivante :

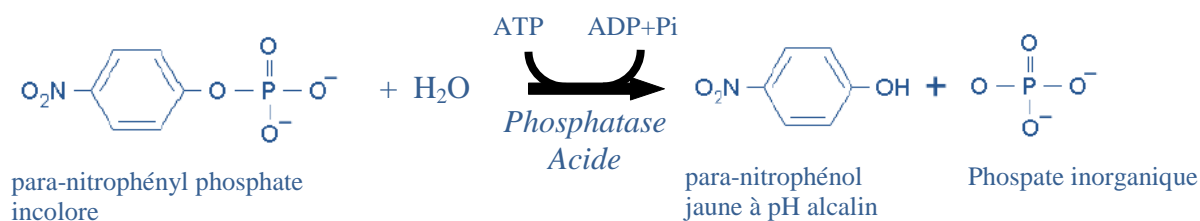


Figure II.27: Transformation du para-nitrophényl phosphate incolore en para-nitrophénol jaune par action de la phosphatase acide intracellulaire.

L'enzyme phosphatase acide ne fonctionne qu'en présence d'ATP, soit dans des cellules vivantes voire non quiescentes. Son activité augmente proportionnellement au nombre de cellules viables. Elle est dosée en milieu tampon acétate 0,1 M à pH 5,0 (pour inhiber les phosphatase alcalines), 0,1 % de Triton X-100 (pour perméabiliser les membranes) et 2,7 mM de para-nitrophényl phosphate (comme substrat) directement placés dans les puits de culture. Préalablement le tapis cellulaire aura été lavé avec du PBS (phosphate-buffered saline) pour éliminer les cellules mortes et non adhérentes.

La réaction est laissée à incuber pendant 2,5 heures à 37 °C et bloquée par addition de 60 µl de NaOH 1 M. Une coloration jaune apparaît alors fortement, causée par le para-nitrophénol qui est jaune à pH alcalin. La coloration est mesurable par une mesure de l'absorbance à 405 nm avec un spectrophotomètre (Metertech, Σ960, Taïwan) qui lit des plaques 96 puits ou le lecteur de plaque Elisa Multiskan EX (Thermo electro corporation©).

II.2.11. Dosages de la mélanine extracellulaire et intracellulaire synthétisée par les mélanocytes murins B16-F1

Les premières cellules utilisées pour tester les barrières de PLGA sont des mélanocytes murins B16-F1 (ECACC 92101203). Elles sont cultivées dans un milieu Modified Eagle's Medium (MEM) avec 2 mM de L-Glutamine et des sels de Earle, supplémenté avec 10 % de sérum de boeuf foetal (FBS) décomplémenté, 100 U/mL de Pénicilline, 100 µg/mL de Streptomycine, 0,1 mM d'acides aminés non essentiels et 1 % (volume) de vitamines (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Les cellules sont placées dans une étuve thermostatée à 37 °C sous une atmosphère de 5 % de CO₂ (Jouan, Saint Herblain, France). Le milieu est renouvelé tous les 2 jours. Pour le passage, les cellules sont détachées en remplaçant le milieu de culture par de la Trypsine (Trypsine/EDTA, Sigma, St Quentin Fallavier, France) à 0,5 % pendant 5 minutes à 37 °C.

La molécule active intégrée dans le film multicouche réservoir est le PGA- α -MSH. Il active la synthèse de mélanine par les B16-F1. La particularité de la lignée B16-F1 est qu'elle excrète la mélanine après sa synthèse. Le dosage de la mélanine est donc aisé puisque la molécule se trouve rapidement dans le surnageant. Le dosage s'effectue après 4 jours de culture. Les cellules sontensemencées à une densité de $2,5 \times 10^4$ cellules/mL dans une plaque 24 puits sur les différentes constructions déposées sur des lames en verre. Le milieu est enrichi avec 0,3 mM de Tyrosine, la Tyr étant le précurseur de la mélanine. Le dosage de mélanine dans le

surnageant au bout de 4 jours de culture se fait directement en spectrophotométrie étant donné que la mélanine absorbe à 405 nm.

Pour s'assurer que toute la mélanine est excrétée, des dosages intracellulaires ont aussi été menés suivant le protocole décrit par Kim (Kim et al. 2004).

Les cellules sont trypsinées, collectées par centrifugation à 4500 rpm (Centrifugeuse de culture cellulaire C312 Jouan, Saint Herblain, France) pendant 5 minutes puis lysées dans 500 µl de NaOH 1M pendant 30 minutes à 90 °C. L'absorbance des surnageants est mesurée à 405 nm avec un spectrophotomètre.

II.2.12. Culture des adénocarcinomes humains de côlon (HT29)

Cellules adhérentes monocouche en culture *in vitro* avec une morphologie de type épithélial, les cellules HT29 (Human Tumor n° 29) ont été isolées à partir d'une tumeur primaire de côlon d'une femme caucasienne âgée de 44 ans. La lignée est décrite comme un adénocarcinome colorectal humain caucasien modérément différencié de grade II. Elle présente des caractéristiques ultrastructurales comme des microvillosités qui les rapprochent de cellules intestinales matures telles les cellules calciformes. Ces cellules sont différenciées et forment un tapis cellulaire uniforme et proche de celui rencontré *in vivo*. Elles expriment le gène *mrp1* (multidrug resistance protein 1) et les récepteurs à l'urokinase (von Kleist et al. 1975).

Les cellules sont cultivées dans un incubateur à CO₂ saturé en eau contenant une atmosphère composée de 5 % de CO₂-95 % d'air et à 36,5 °C (température eugénésique). Le milieu de culture est composé de DMEM (Dulbecco's modified essential medium, Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France), supplémenté avec du glucose (concentration finale 0,3 g/L) (Sigma), 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté (FBS, Gibco), de la pénicilline (100 U/mL) (Sigma) et de la streptomycine (100 µg/mL) (Sigma). Le milieu est renouvelé tous les 2 jours. Le passage des cellules se fait par ajout de trypsine/EDTA pendant 10 minutes à 37 °C.

II.2.13. Mise en place de l'architecture multicouche-PLGA

Le poly(acide *d,l*-lactique-co-glycolique), PLGA, va être utilisé en tant que barrière tout d'abord sur un film multicouche PL ℓ -PGA fonctionnalisés avec du PGA- α -MSH puis sur un film multicouche (PL ℓ -HA)₃₀ avec du Taxol. Chaque élément s'intégrant dans la construction de l'architecture a été testé :

II.2.13.1. Le chloroforme comme solvant du PLGA

Le fait de déposer du PLGA sur les films multicouches suggère de mettre en contact les films avec un solvant apolaire, ici le chloroforme. Ceci pourrait engendrer une déstructuration du film mais des articles préexistants nous ont confortés dans cette voie.

Ainsi le THF, un autre solvant apolaire dans lequel le PLGA peut aussi être solubilisé, est utilisé lors de la construction d'" hollow capsule " pour dissoudre le squelette de la nanoparticule (Pastoriza-Santos et al. 2001).

Le chloroforme est un élément dix fois plus toxique que le chlorure de méthylène (Aubert-Pouessel et al. 2004) ou que le dichlorométhane (Hirsjarvi et al. 2006). Cependant, le chloroforme est couramment utilisé pour solubiliser le PLGA (Sander et al. 2004). Il a déjà été utilisé avec des résultats satisfaisants sur des cultures cellulaires (Park et al. 2005a) et des cellules endothéliales dérivées de cellules humaines embryonnaires (Levenberg et al. 2002). De plus, il autorise la construction de multicouches au-dessus de la couche polymère formée (Hirsjarvi et al. 2006).

Le chloroforme est donc choisi comme solvant du PLGA pour toutes les expériences menées en éliminant toujours les résidus par une étape sous vide de 17 heures.

II.2.13.2. Dépôt de PL ℓ en surface du PLGA

Une couche de PL ℓ est déposée sur la barrière de PLGA afin d'optimiser l'adhésion cellulaire aux vues des propriétés de la PL ℓ présentées au paragraphe I.2.2.2.1.. En effet, il est possible de déposer un film multicouche sur des structures polymériques hydrophobes sans modification chimique préalable (Hirsjarvi et al. 2006). D'autre part, la couche de PL ℓ permet l'adhésion de sérum et de protéines de la matrice extracellulaire (McKeehan 1984). Cette

caractéristique pourrait améliorer encore l'adhésion cellulaire dans le cadre d'une intégration future *in vivo*.

Nous avons ainsi testé le bénéfice de la mise en contact des constructions avec du milieu de culture avant ensemencement. Les cellules ont proliféré sur la surface tamponnée avec le milieu de culture alors qu'elles prolifèrent très peu sur la surface mise en contact avec du PBS.

II.2.13.3. Conditions de culture des cellules B16-F1

Les conditions optimales de culture des B16-F1 et de dosage de la mélanine doivent être déterminées précisément. Les mélanocytes murins sont naturellement activés par l' α -MSH via leur récepteur MCR (melanocortin receptor). Ils synthétisent la mélanine à partir de l'acide aminé Tyrosine (Tyr) (Tsatmali et al. 2002). Le milieu de culture est donc supplémenté avec de la Tyr à 0,3 mM afin d'améliorer la mélanogénèse (Donatien et al. 1993; Chluba et al. 2001).

De plus, nous avons voulu vérifier si les cellules étaient sensibles à la Trypsine utilisée lors des étapes de repiquage par rapport au Triple Express. La solution de Triple Express est moins corrosive que la Trypsine. Elle autorise la conservation des récepteurs extracellulaires dont les MCR lors des repiquages.

Enfin la mélanine peut être dosée dans le surnageant avec ou sans étape de centrifugation et aussi en intracellulaire avant sécrétion, à des temps entre 3 et 6 jours.

Le récapitulatif de toutes les expériences préliminaires pour la culture des cellules B16-F1 est représenté sur les figures II.28, II.29, et II.30.

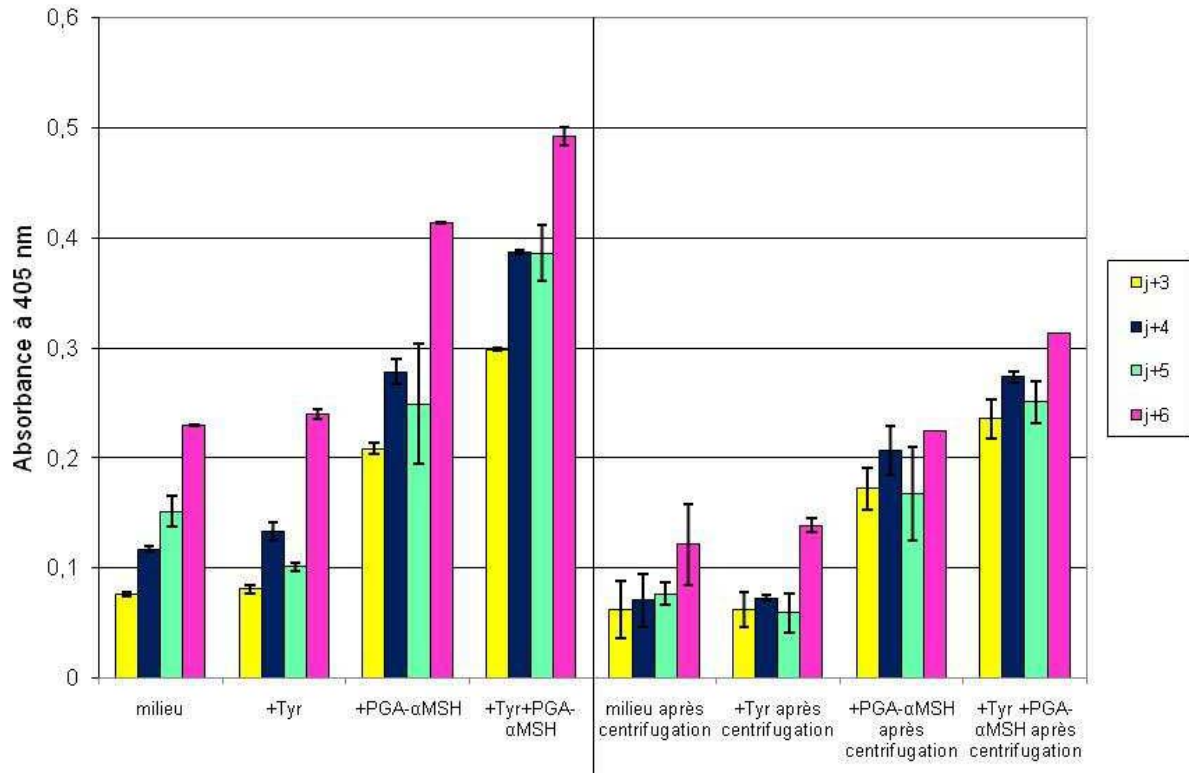


Figure II.28: Conditions de culture variables des B16-F1 sous l'action de la Trypsine. 4 expériences sont réalisées : milieu seul, milieu supplémenté avec de la Tyrosine à 0,3 mM, avec du PGA- α -MSH à 100 μ g/mL, ou avec de la Tyrosine et du PGA- α -MSH. Les expériences sont menées après 3, 4, 5 ou 6 jours d'ensemencement. La partie gauche du graphique correspond à la détection directe de la mélanine dans le surnageant. La partie droite représente des mesures de mélanine obtenues après centrifugation. Les cellules sont ensemencées à une densité de $2,5 \times 10^4$ cellules/mL. Les barres d'erreur sont déterminées en calculant les écart-types de 3 échantillons par condition.

Le PGA- α -MSH à 100 μ g/mL induit significativement la mélanogénèse en comparaison avec le milieu seul ou complémenté avec de la Tyrosine (Tyr). La supplémentation du milieu en Tyr à 0,3 mM augmente aussi significativement la synthèse de mélanine induite par le PGA- α -MSH mais pas la synthèse constitutive. En effet, les cellules B16-F1 synthétisent de façon constitutive la mélanine. Après 5 jours de culture, le taux de mélanine " constitutive " commence à être élevé et représente un bruit de fond important. A ce moment, les cellules sont alors toujours viables. Cependant leur nombre diminue puisqu'elles atteignent la confluence. Les expériences seront donc menées à 4 jours, les dosages n'étant pas significativement différents de ceux à 5 jours.

La centrifugation réduit les différences entre chaque condition tout en conservant l'évolution des réponses. Il ne semble donc pas nécessaire de passer par cette étape pour quantifier la mélanine.

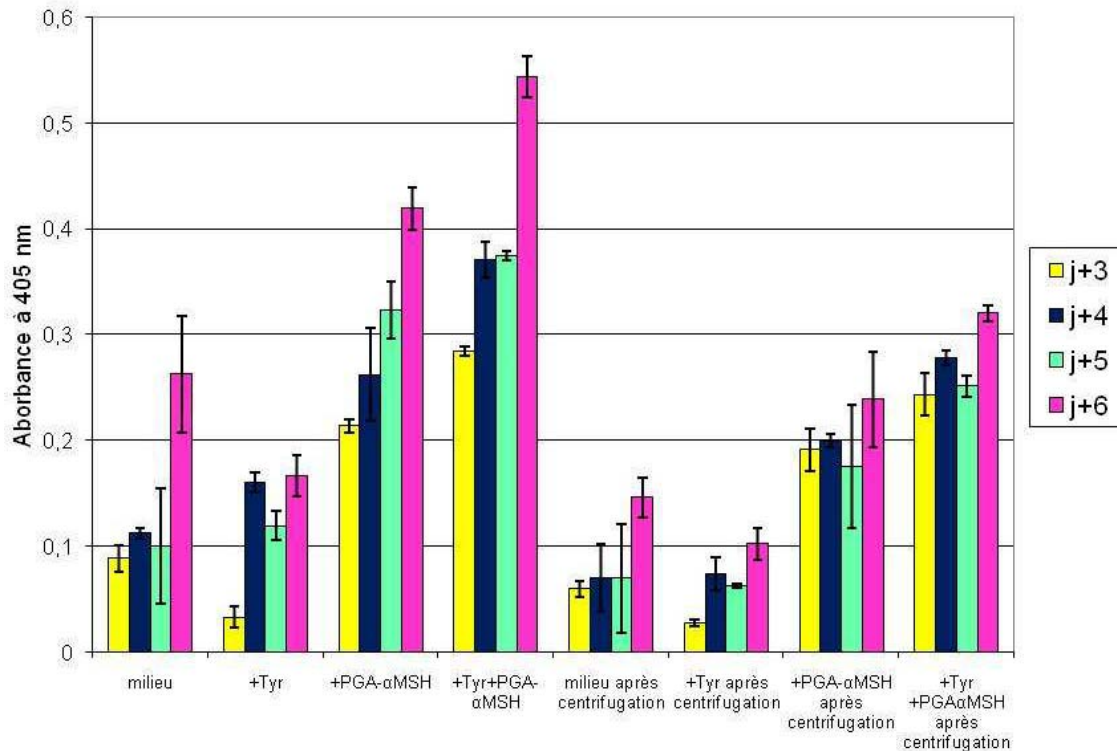


Figure II.29: Conditions de culture variables des B16-F1 sous l'action du Triple Express. 4 expériences sont réalisées : milieu seul, supplémenté avec de la Tyrosine à 0,3 mM, avec du PGA-α-MSH à 100µg/mL, ou avec de la Tyrosine et du PGA-α-MSH. La partie gauche correspond à la détection directe de la mélanine dans le surnageant. La partie droite représente des mesures de mélanine obtenues après centrifugation. Les cellules sontensemencées à une densité de $2,5 \times 10^4$ cellules/mL. Les barres d'erreur sont déterminées en calculant les écart-types des 3 échantillons par condition.

En comparant toutes les conditions figure II.29 par rapport à celles présentées figure II.28, il est mis en évidence que le fait de décoller les cellules lors des repiquages par le Triple Express et non avec de la Trypsine modifie peu les réponses sauf au jour 6, avec un milieu complémenté en Tyr et en PGA-α-MSH sans centrifugation et au jour 3 avec Tyr. La Trypsine sera donc utilisée avec les cellules B16-F1.

Enfin une dernière expérience a consisté à déterminer si le dosage de la mélanine intracellulaire permettait d'obtenir des informations supplémentaires par rapport à la mélanine détectée dans le surnageant (figure II.30).

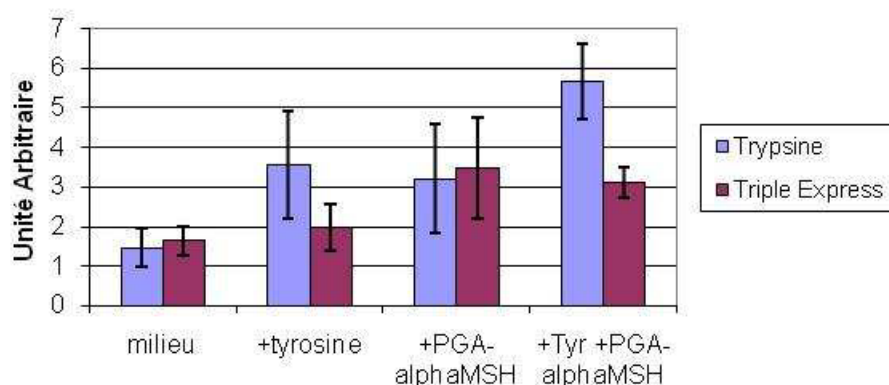


Figure II.30: Concentrations intracellulaires en mélanine normalisées pour 10^3 cellules à J+5 et détectées dans différentes conditions de culture de B16-F1 sous l'action de la Trypsine ou du Triple Express. 4 expériences sont réalisées : milieu simple, supplémenté avec de la Tyrosine à 0,3 mM, avec du PGA- α -MSH à 100 μ g/mL, ou avec de la Tyrosine et du PGA- α -MSH.

Le profil des réponses cellulaires semble équivalent en intracellulaire et dans le surnageant. L'ajout de Tyr dans le milieu permet d'augmenter la synthèse de mélanine. Cependant l'expérience avec du milieu complétement avec de la Tyrosine seule présente un taux de mélanine intracellulaire équivalent à une excitation par le PGA- α -MSH. Il serait préférable de mesurer la mélanine sécrétée par les B16-F1 plutôt que la mélanine intracellulaire pour éviter ce problème.

II.2.13.4. Concentration en Taxol déposée

Le Taxol est testé dans les constructions réservoir multicouche (PL ℓ -HA)₃₀-barrière PLGA. Il est déposé à 5 μ g/mL pendant 17 heures. Selon la figure III.2 p.96, si le Tx est déposé à 5 μ g/mL (5,85 μ M) sur les multicouches, la concentration résultante dans la multicouche est d'environ 200 μ g/mL. Le seuil de toxicité du Tx est ainsi largement dépassé aux vues de résultats de toxicité cellulaire présentés figure III.7 p.112 qui fixe ce seuil à une concentration de 10 μ g/mL.

II.2.13.5. Dépôt de PSS sur (PL ℓ -HA)₃₀

Après le dépôt de Tx sur le film (PL ℓ -HA)₃₀ et avant le recouvrement avec la barrière de PLGA, une couche de PSS est déposée afin d'améliorer l'adhésion cellulaire de ce film mou comme expliqué chapitre III.1 et selon l'article de Vodouhê *et al.* (Vodouhê et al. 2006).

II.2.14. Techniques de coloration spécifiques du cartilage et de l'os

II.2.14.1. Coloration du cartilage par le bleu Alcian

Le bleu Alcian est un cation tétravalent qui révèle les fonctions acides ionisées au pH utilisé. Les protéoglycanes synthétisés par les chondrocytes dérivés des cellules souches embryonnaires vont être colorés par le bleu Alcian. En effet, ces molécules constituées d'une protéine et d'un glycosaminoglycane (anciennement dénommé mucopolysaccharide acide avec pour exemples : l'acide hyaluronique ou la chondroïtine sulfate) sont chargées négativement.

La coloration est réalisée en même temps que la fixation des chondrocytes. Pendant 48 heures, une solution composée de 5 % de glutaraldéhyde, 25 mM d'acétate de sodium, et 0,4 M de $MgCl_2$ contenant 0,05 % de bleu Alcian est déposée sur les cultures. Trois étapes de rinçage successives dans 3 % d'acide acétique, 3 % d'acide acétique/25 % d'éthanol, puis 3 % d'acide acétique/50 % d'éthanol permettront de réduire les liaisons non spécifiques de la coloration. La visualisation du marquage et des cellules se fait avec un microscope à contraste de phase (20x).

II.2.14.2. Coloration de l'os par la méthode argentique de Von Kossa

Le principe de cette technique est de révéler les sels de calcium (phosphate, carbonate, sulfate, oxalate) en substituant le calcium par de l'argent, un cation métallique lourd, visualisable après réduction en argent métallique noir. Il sera donc possible de détecter les cellules différenciées en ostéoblastes puisqu'elles fixent du calcium par rapport aux cellules non différenciées.

Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS (phosphate-buffered saline) et fixées avec 10 % de formaline tamponnée à pH neutre pendant 2 heures à température ambiante. Après un rinçage avec de l'eau distillée, une solution de nitrate d'argent à 2,5 % préparée extemporanément est déposée pendant 30 minutes. L'excédent est enlevé par deux rinçages à l'eau distillée, et les cellules sont alors marquées par du bleu de toluidine en contact pendant 10 secondes. Le bleu de toluidine est un colorant thiazine qui sert à marquer les acides nucléiques, donc les noyaux, d'un matériel histologique s'il est déposé assez longtemps. Ici, le temps de contact court va permettre l'obtention d'une coloration métachromatique (roses à rouges ou violets) des mucopolysaccharides constituant le cartilage. La coloration est achevée par trois rinçages à l'eau distillée et est laissée à sécher à l'air. Ce séchage va permettre

l'oxydation de l'argent à l'air. La présence de structures minéralisées noires est visualisée avec un microscope à épifluorescence Leica DRB couplé à un appareil photo.

II.2.14.3. Technique d'immunofluorescence pour détecter l'expression d'ostéopontine

L'immunofluorescence de l'ostéopontine est réalisée dans le but de visualiser la différenciation des cellules du corps embryonnaire en ostéoblastes. Tout d'abord, les cellules sont fixées après 21 jours d'ensemencement avec 2 % de paraformaldéhyde. L'immunocytochimie s'effectue par un traitement avec l'anticorps monoclonal antiostéopontine de souris (OPN (Akm2A1): sc-21742; Santa Cruz Biotechnology) suivi de l'anticorps secondaire : une immunoglobuline G de chèvre anti-souris marquée avec Cy3 (cyanine 3). Les cellules sont ensuite colorées pendant 20 secondes par du Hoechst à 5 ng/mL. Ainsi les cellules synthétisant de l'ostéopontine seront rouges et bleues alors que les cellules non différenciées ou à un stade moins avancé seront seulement bleues. La visualisation de la fluorescence se fait avec un microscope à épifluorescence Leica DRB avec un filtre spécifique pour Cy3 couplé à un appareil photo.

Chapitre III : Les films multicouches comme réservoirs de molécules actives :
modulation des cinétiques de réponses cellulaires

*Heñvel war wir a sav ken aes
Ha ma ra dienn war al laezh.
(Le semblable sur le vrai s'élève aussi facilement que le fait la crème sur le lait.)*

*Dibaot hent kaer na vez meinek
Ha gwenodenn na vez dreinek.
(Rare la route qui ne soit caillouteuse ni le sentier qui ne soit épineux.)*

***Chapitre III : Les films multicouches comme réservoirs de molécules actives :
modulation des cinétiques de réponses cellulaires***

III.1. Modulation de l'accès au Taxol par recouvrement du film

(PL ℓ -HA)₃₀ par un film PSS-PAH

III.1.1. Contexte et intérêt

En 2003, Boulmedais *et al.* ont suggéré que le dépôt d'un film multicouche de PSS et de PAH sur un film PL ℓ -PGA pouvait perturber la diffusion des molécules de PL ℓ et de PGA dans la nouvelle structure (Boulmedais et al. 2003). Avec cette étude, l'effet barrière du film PSS-PAH a été mis en évidence. Le film PL ℓ -PGA correspond à un "compartiment" ou "réservoir" de molécules diffusives dont le contact avec l'extérieur est empêché par la barrière PSS-PAH. Nous nous sommes basés sur cette observation pour réaliser des édifices constitués de réservoirs et de barrières. Un film PL ℓ -HA biodégradable à croissance exponentielle forme la base de l'architecture, sur laquelle est déposé un film multicouche PSS-PAH non dégradabile à croissance linéaire (Garza et al. 2004). L'idée est de former des films multicouches multicompartimentés en alternant des compartiments biodégradables composés de PL ℓ -HA et des barrières composées de PSS-PAH. Pour démontrer l'effet barrière, une architecture de type (PL ℓ -HA)₃₀-PL ℓ ^{FITC}-HA-(PAH-PSS)₃₀-(PL ℓ -HA)₃₀-(PAH-PSS)₃₀-(PL ℓ -HA)₃₀-PL ℓ ^{FITC} est réalisée, soit trois compartiments séparés par deux barrières (figure III.1).

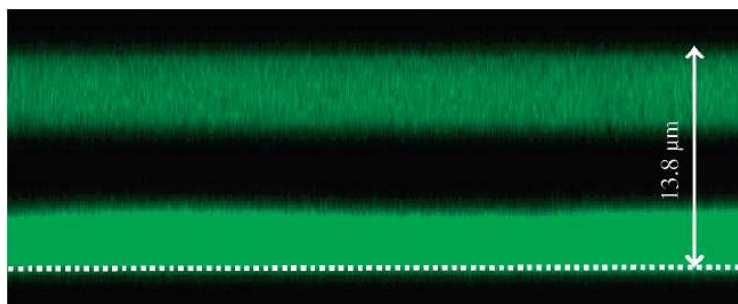


Figure III.1: Section verticale du film (PL ℓ -HA)₃₀-PL ℓ ^{FITC}-HA-(PAH-PSS)₃₀-(PL ℓ -HA)₃₀-(PAH-PSS)₃₀-(PL ℓ -HA)₃₀-PL ℓ ^{FITC} observée par microscopie confocale. Le film est conservé dans une solution de NaCl 0,15 M à pH = 5,9. La position de la lamelle de verre servant de substrat de départ est marquée par les pointillés blancs.

Le fluorophore $PL\ell^{FITC}$ est inséré au cours de la construction dans les compartiments 1 et 3. Le compartiment 2 n'a pas été chargé de fluorophore. La microscopie confocale permet de mettre en évidence une diffusion normale de la $PL\ell^{FITC}$ dans les compartiments 1 et 3 qui sont des films à croissance exponentielle pour lesquelles la diffusion de la $PL\ell$ est connue. Cependant, le fluorophore n'accède pas au compartiment 2 qui reste non fluorescent.

Les films non dégradables PSS-PAH agissent donc réellement comme une barrière pour la diffusion des polyélectrolytes. De plus, en modifiant le pH de la solution déposée sur le film, il a été mis en évidence que la multicouche à croissance linéaire ralentissait mais n'empêchait pas la diffusion à l'intérieur des films des protons, donc sans doute aussi des petits ions se trouvant dans les surnageants (Garza et al. 2004).

Ces films multicompartimentés ouvrent la voie à la préparation de multicouches "réservoirs" intégrant une quantité importante de molécules actives dont la diffusion passive à l'extérieur du film pourrait être contrôlée par le dépôt d'un film barrière constitué de multicouches de polyélectrolytes à croissance linéaire (Berg et al. 2006).

La molécule d'intérêt testée dans ce cadre original est le paclitaxel ou Taxol® (noté Tx). Le Tx est un antinéoplasique puissant utilisé en thérapie du cancer du sein et des ovaires. Depuis peu, il est appliqué dans le domaine vasculaire sur des *stents* (endoprothèses) et sert alors d'agent antiprolifératif. Par ce biais, le taux de resténose après implantation d'un *stent* lors de pathologies vasculaires obstructives est diminué de 77 % (http://www.ptca.org/articles/taxus_profileframe.html). Toute technologie simple et rapide permettant de recouvrir les *stents* vasculaires d'agents actifs constitue donc un domaine d'étude aux applications cliniques majeures.

III.1.2. Résultats principaux et discussion

L'étude repose sur la réalisation d'un réservoir fonctionnalisé par le Tx et recouvert par un nombre variable de paires de couches PSS-PAH. Le but est de former un réservoir de Tx dans le film $PL\ell$ -HA, dont l'accès pour les cellules serait contrôlé selon le nombre de paires de couches, n , du film barrière $(PSS-PAH)_n$ recouvrant le réservoir.

Tout d'abord, l'adsorption et la diffusion du Tx dans le film $PL\ell$ -HA ont été suivies par microscopie confocale en utilisant le Tx fluorescent, le Tx Oregon Green® 488 (noté $Tx^{Green488}$). Une première observation notable a pu être faite : le film réservoir peut stocker de façon contrôlée une concentration élevée de $Tx^{Green488}$ (figure III.2).

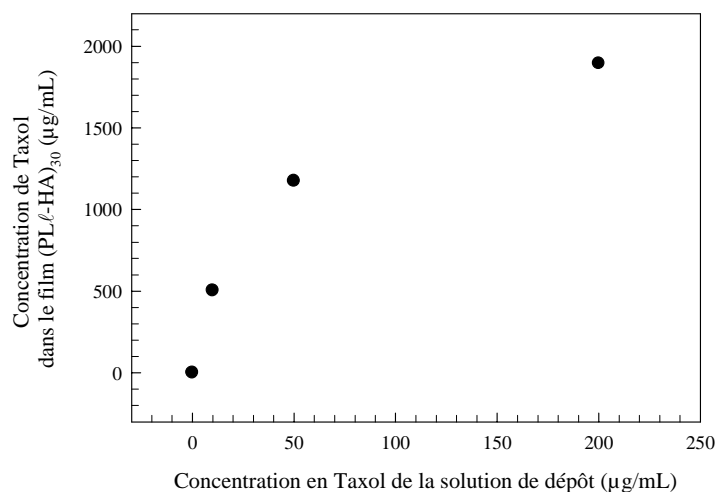


Figure III.2: Isotherme d'adsorption du Taxol dans un film (PLℓ-HA)₃₀ après dépôt du Tx pendant 18 heures.

La concentration en Taxol est déterminée après étalonnage par mesures de l'intensité de fluorescence par microscopie confocale et en utilisant des intensités de laser et des gains de détecteurs constants.

Le réservoir PLℓ-HA permet de stocker une concentration en molécules bien supérieure à celle présente en solution lors de l'étape d'adsorption. Il agit donc comme une sorte d'éponge vis-à-vis du Tx. La concentration stockée croît avec la concentration en solution pour atteindre un palier de saturation pour des concentrations de Tx en solution supérieure à 200 µg/mL. La concentration résultante dans le film est alors de 2000 à 2200 µg/mL. Cette variation de la concentration interne en Tx représente une première voie pour moduler la réponse cellulaire au contact de films. De plus, au bout de 4 jours de vieillissement de la multicouche, la fluorescence du film marqué avec du Tx^{Green488} est toujours maintenue selon des visualisations en microscopie confocale indiquant donc que le Tx ne semble pas diffuser de façon passive hors du film.

Ensuite, des études cellulaires ont été réalisées pour vérifier si le Tx inséré dans les réservoirs demeurait actif. Des cellules d'adénocarcinomes de côlon humain (HT29) ont été cultivées sur des films réservoirs (PLℓ-HA)₃₀. Ce type de film ne permet pas une bonne adhésion des cellules HT29 comme cela a été préalablement constaté pour d'autres types cellulaires (Richert et al. 2004b). L'ajout de la barrière PSS-PAH sur le film PLL-HA rend possible l'adhérence cellulaire.

Pour expliquer ce comportement, le module d'Young de tels films a été déterminé récemment au sein de notre équipe grâce à la technique d'AFM nanoindentation (Francius et al. 2007). Le module d'Young des films (PLℓ-HA)₃₀-(PSS-PAH)_n-PSS croît avec le nombre *n* de paires de couches PSS-PAH déposées (Tableau III.1). Ces résultats soulignent que le recouvrement de

films (PL ℓ -HA)₃₀ par des paires de couches (PSS-PAH)_{*n*} rigidifie le film multicouche, favorisant ainsi l'adhésion cellulaire.

Nombre <i>n</i> de dépôt de (PSS-PAH) _{<i>n</i>}	Module d'Young <i>E</i> ₀ (kPa)
0	12,9 +/- 7,8
1	27,2 +/- 10,1
2	42,1 +/- 14,6
4	72,7 +/- 15,7

Tableau III.1 : Variations du module d'Young selon le nombre, *n*, de paires de couches de (PSS-PAH)_{*n*} déposées sur un film (PL ℓ -HA)₃₀. Les mesures sont effectuées par AFM nanoindentation.

Par ailleurs, la visualisation en microscopie confocale après 24 heures de culture des cellules d'adénocarcinomes de côlon HT29 déposées sur l'architecture (PL ℓ -HA)₃₀-Tx^{Green488}-PSS^{Rho}-PAH^{Rho}-PSS^{Rho}, comportant les fluorophores vert de l'Oregon Green® 488 couplé au Tx et rouge de la rhodamine B couplée à PAH et PSS, permet d'obtenir des données importantes (figure III.3).

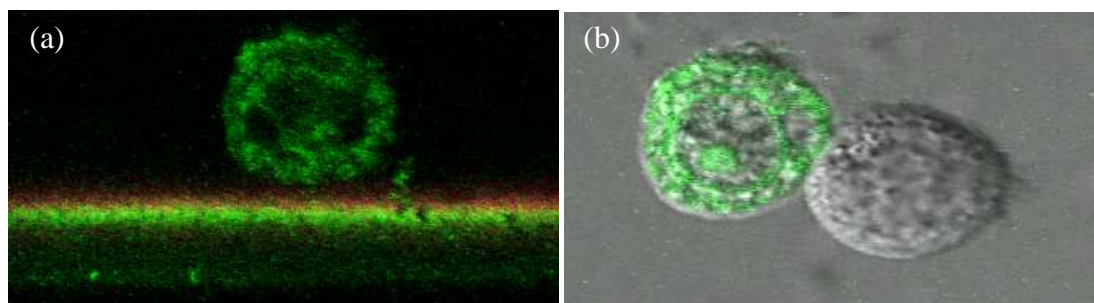


Figure III.3: Images en microscopie confocale de cellules HT29 cultivées sur l'architecture (PL ℓ -HA)₃₀-Tx^{Green488}-PSS^{Rho}-PAH^{Rho}-PSS^{Rho} (a) Coupe en *z* d'une cellule HT29 après 24 heures d'ensemencement sur le film, taille d'image : 46,0 x 22,6 μm^2 (b) Section (*x,y*) de cette même cellule, champ claire ajouté, taille d'image : 48,5 x 26,7 μm^2 . Le Tx^{Green488} est déposé à 100 $\mu\text{g/mL}$. Les cellules sont ensemencées à une densité de 8000 cellules/mL

Une séparation nette entre une zone verte et une autre rouge est observée figure III.3 (a). Le Tx^{Green488} ne diffuse pas dans le film PSS-PAH et, à l'inverse, les polyélectrolytes PSS^{Rho} et PAH^{Rho} ne diffusent pas dans le film réservoir. De plus, il est intéressant de noter que les cellules apparaissent marquées en vert, mais ne présentent pas de fluorescence rouge (figure III.3 (b)). Par conséquent, elles intègrent du Tx^{Green488} présent dans le film réservoir sans internaliser les polyélectrolytes du film PSS-PAH-PSS. Enfin, la localisation particulière du Tx^{Green488} est mise en évidence sur la figure III.3 (b). Le cytoplasme et le nucléole concentrent

fortement la fluorescence verte alors que le noyau reste peu marqué, ce qui correspond à des résultats cohérents par rapport aux études antérieures (Rao et al. 1998).

Nous avons ensuite fait varier le nombre, n , de paires de couches (PSS-PAH) $_n$ pour essayer de moduler l'accès des cellules au Tx enfoui dans le réservoir. Les résultats sont concluants : le fait de déposer (PSS-PAH) $_2$ -PSS permet de différer ou ralentir fortement l'accès des cellules au Tx en comparaison du dépôt d'une seule couche de PSS. Ainsi une induction de la mort cellulaire est obtenue dans les 2 cas à 24 et 96 heures. Cependant, le taux de mort cellulaire observé est toujours plus important dans le cas d'une barrière PSS comparé à la barrière (PSS-PAH) $_2$ -PSS. Les pourcentages de mortalité sont alors respectivement de 45 % à 24 heures et 80 % à 96 heures en comparaison de 20 % à 24 heures et 35 % à 96 heures.

Le fait que le dépôt de 2,5 paires de couches PSS-PAH non dégradables ne constitue pas une barrière totalement étanche peut être expliqué de deux façons. Tout d'abord, Picart *et al.* ont observé que les premiers dépôts de PL ℓ et HA sur une surface solide conduisaient à des complexes matérialisés par la formation de gouttelettes. Ces gouttelettes coalescent progressivement et forment finalement un film uniforme après 5 cycles de construction couche par couche (Picart et al. 2001). Il a été observé ensuite pour les films PSS-PAH qu'un recouvrement complet de la surface de dépôt était obtenu après le même nombre de cycles (5), les étapes précédentes ne présentant pas de structure particulière en gouttelettes (Lavalle et al. 2002). On ne peut évidemment pas extrapoler directement cette observation pour le dépôt du film PSS-PAH sur un réservoir (PL ℓ -HA) $_{30}$. Cependant ce phénomène expliquerait pourquoi le film constitué de (PSS-PAH) $_n$ est de plus en plus efficace comme barrière vis-à-vis des cellules lorsque le nombre de couches n augmente et non dès que $n = 1$.

On peut aussi envisager que, lors des premiers cycles de dépôt de PSS-PAH, un remaniement et une restructuration ont lieu dans la partie supérieure du film PL ℓ -HA (Francius et al. 2007). Le PSS diffuse dans la structure, ceci pouvant conduire à une surface hybride incluant les 4 polyélectrolytes. Ce mélange hybride renfermerait donc du HA et de la PL ℓ , deux polyélectrolytes biodégradables. Le film barrière pourrait dès lors être dégradé par les cellules.

III.1.3. Article, (Vodouhê et al. 2006)

[*Signalement bibliographique ajouté par :*
SICD Strasbourg - Département de la Documentation électronique
Service des thèses électroniques]

Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films

C. VODOUHE, E. LE GUEN, J. MENDEZ GARZA, G. FRANCIUS, C. DÉJUGNAT, J. OGIER, P. SCHAAF, J.-C. VOEGEL, P. LAVALLE

Biomaterials, 2006, Vol. 27, N° 22, Pages 4149-56

Pages 99-106 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.024>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

III.1.4. Conclusions et perspectives

Nous avons pu montrer qu'il est possible de fonctionnaliser un film "réservoir" par un principe actif (le Taxol dans l'exemple choisi) et de moduler la réponse des cellules à cette molécule en modifiant, d'une part la quantité intégrée dans le réservoir, et d'autre part le nombre de paires de couches de polyélectrolytes barrières déposées sur le réservoir. L'augmentation de ce nombre de couches retarde le processus de mort cellulaire provoqué par le Taxol.

Une telle stratégie pourrait constituer un outil de fonctionnalisation de *stents* par le Taxol. La technique des multicouches permet en effet de recouvrir facilement ces structures non planes. Des études *in vivo* chez l'animal seraient utiles pour vérifier la stabilité du film subissant le flux sanguin ainsi que l'efficacité de cette architecture recouvrant le *stent* pour limiter la resténose.

III.2. Modulation de l'accès à des principes actifs par réticulation des films multicouches

III.2.1. Les films multicouches réticulés

Les films multicouches de polyélectrolytes utilisés comme réservoirs de molécules actives sont le plus souvent des films à croissance exponentielle. Or les cellules sont très peu adhérentes sur des films à croissance exponentielle de type PL ℓ -PGA, PL ℓ -HA ou chitosan-HA (noté CHI-HA) en raison du fort taux d'hydratation et de la forte viscoélasticité de ces films "mous". En effet, les cellules adhèrent et prolifèrent sur des structures de préférence rigides, car elles peuvent probablement appliquer des forces de traction importantes. Une migration des cellules est même induite par les propriétés mécaniques du substrat sur lequel elles sont ensemencées selon sa rigidité, phénomène appelé "durotaxie" ou "mécanotaxie" (Pelham and Wang 1997; Lo et al. 2000; Gray et al. 2003; Wong et al. 2003). Ainsi, pour favoriser l'adhésion cellulaire et l'étalement sur les films à croissance exponentielle, une voie consiste à rigidifier les films. Beaucoup de méthodes pour rigidifier le film multicouche sont envisageables dont l'inclusion de nanoparticules (Koktysh et al. 2002), le recouvrement par un film multicouche constitué de polyélectrolytes synthétiques comme présenté chapitre III.1 (Vodouhê et al. 2006), ou la réticulation par chauffage (Harris et al. 1999). La technique choisie dans la présente étude concerne la réticulation par voie chimique. Grâce à une réticulation, le film résiste durablement à l'action d'enzymes spécifiques (Richert et al. 2004b) et également vis-à-vis de l'exposition à des solvants, à des variations de pH ou de force ionique, paramètres qui sont connus pour affecter les films multicouches de polyélectrolytes (Dubas and Schlenoff 2001).

Il reste à démontrer si les films multicouches réticulés peuvent être fonctionnalisés par intégration de molécules actives. La fonctionnalisation des films ne peut se faire qu'après l'étape de réticulation afin d'éviter une dénaturation des biomolécules insérées dans les films par les agents de réticulation. Nous aboutirions alors à un film multicouche de polyélectrolytes dont les propriétés mécaniques et l'action biologique seraient contrôlées précisément.

III.2.2. Résultats et discussion

Des mesures par nanoindentation en AFM (microscopie à force atomique) démontrent clairement que la réticulation rend la surface plus rigide. Ainsi le module d'Young d'un film PL ℓ -HA ou CHI-HA augmente d'environ 12 % après réticulation.

Deux molécules pharmaceutiques, un anti-inflammatoire non stéroïdien, le Diclofénac, et un anticancéreux, le Taxol (Tx) ont été insérées dans des films multicouches. L'insertion des principes actifs par dépôt lors de la construction du film ne permet pas le maintien de leur activité biologique une fois la réticulation du film effectuée. Le dépôt de ces biomolécules doit donc se faire après la réticulation par simple diffusion dans le film ce qui permet alors la conservation de leur activité.

Les taux de réticulation variables ne modifient pas la concentration de principes actifs intégrés dans le film (CHI-HA)₂₄ par diffusion.

En revanche, la quantité en Diclofénac dans le film CHI-HA est modulable selon le nombre de paires de couches du film sur lequel le principe actif est déposé (figure III.4).

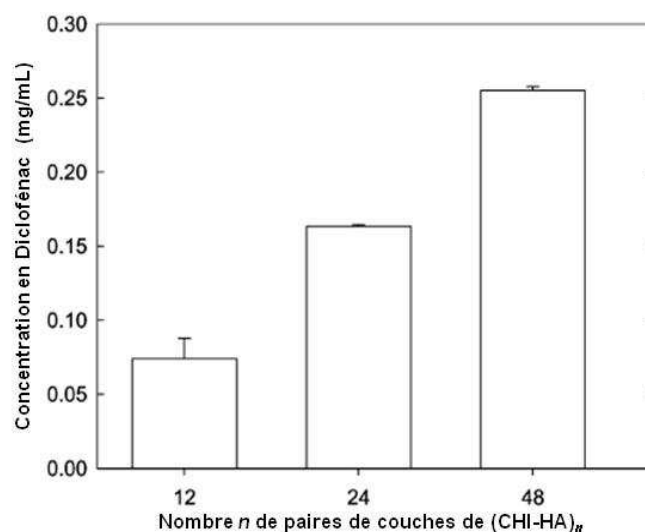


Figure III.4: Influence du nombre n de paires de couches (CHI-HA) _{n} sur la concentration en Diclofénac après dégradation dans 1 mL de SDS des films (CHI/HA) _{n} préalablement réticulé (avec $n = 12$, 24, et 48). La concentration de la solution de dépôt de Diclofénac sur le film réticulé est de 2 mg/mL. Les barres d'erreurs représentent les écart-types calculés à partir de mesures sur 3 échantillons.

Le Diclofénac est négativement chargé à pH neutre ($pK_a = 4$) et a des parties hydrophobes alors que le Tx est une molécule hydrophobe. Or, la réticulation d'un film multicouche perturbe fortement la composition en acides carboxyliques et en groupements amines (Richert

et al. 2004b). Par conséquent, la déposition semble se faire dans des zones hydrophobes du film puisque des taux de réticulation variables ne permettent pas de moduler la concentration finale en principes actifs intégrés dans le film. Les molécules actives (Diclofénac et Taxol) interagiraient dans le film essentiellement par le biais d'interactions hydrophobes. La présence de ces zones hydrophobes a été mise en évidence par la possibilité de construire un film multicouche à partir de polysaccharides anioniques modifiés hydrophobiquement et de différents polycations (Guyomard et al. 2005). Dans notre cas de figure (films PL ℓ -HA ou CHI-HA), la molécule de HA présente des capacités hydrophobes. En effet, le HA interagit avec le graphite, une surface hydrophobe (Spagnoli et al. 2005). De plus, une modélisation moléculaire du HA a suggéré que des interactions hydrophobes aidaient à stabiliser sa structure propre (Scott and Heatley 2002).

Ceci explique que la quantité en Diclofénac dans le film (CHI-HA) $_n$ soit modulable selon le nombre n de paires de couches puisqu'elle est alors directement reliée à l'augmentation de l'épaisseur totale du film, soit du volume des zones hydrophobes.

La concentration en Diclofénac dans le film (CHI-HA) $_n$ peut aussi varier selon la concentration de la solution en principes actifs utilisée lors du dépôt comme noté préalablement chapitre III.1 pour le Tx avec un film (PL ℓ -HA) $_{30}$ (figure III.2) (Vodouhê et al. 2006).

La libération du Diclofénac se fait en deux phases distinctes : une phase de libération rapide de 30 minutes où environ 60 % des molécules sont libérées ("burst") puis une phase lente qui dure jusqu'à 50 heures où la totalité du Diclofénac s'échappe du film (CHI-HA) $_{24}$ (figure III.5).

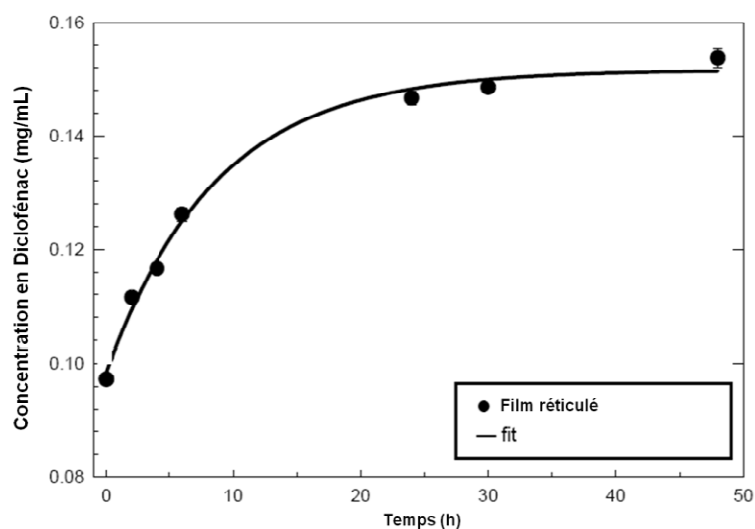


Figure III.5: Concentration en Diclofénac libéré dans le surnageant suite à l'intégration du Diclofénac dans des films de (CHI-HA)₂₄ réticulé. La concentration de la solution de dépôt de Diclofénac sur le film réticulé est de 2 mg/mL.

Cette libération se fait par diffusion passive et non par dégradation du film qui, une fois réticulé, se dégrade très lentement (Etienne et al. 2005).

Pour valider le concept de fonctionnalisation d'un film réticulé avec le Tx, des études par spectroscopie UV-visible n'ont pas permis de déterminer la concentration de Taxol dans le film (PL ℓ -HA)₂₀ réticulé ou dans le surnageant en raison de la présence de Crémophor EL® commercial, le solvant du Tx. Une telle détermination nécessiterait un passage par une étape de purification du solvant (extraction sur phase solide puis HPLC (Huizing et al. 1998)).

Par ailleurs, des cultures cellulaires ont donc été réalisées sur ces films afin de vérifier les effets combinés de la réticulation et de la fonctionnalisation du film. Des cellules d'adénocarcinomes de cancer du côlon humain (HT29) ont étéensemencées sur des films multicouches PL ℓ -HA réticulés et chargés en Tx. Après 3 jours de culture, la densité cellulaire diminue de 90 % en présence de Tx en comparaison du film non fonctionnalisé. Le Tx reste donc actif après le dépôt sur le film réticulé.

Les cellules peuvent accéder au Tx suivant trois scénarios possibles :

- ✓ Les cellules dégradent le film pour rentrer en contact avec le Tx. Néanmoins, les films réticulés résistent à l'action d'enzymes tels que la hyaluronidase (Richert et al. 2004b) et le lysozyme. De plus, dans des conditions de dégradation *in vivo* importantes (cavité buccale d'une souris), les films multicouches réticulés montrent une résistance forte. Après 3 jours, le film non réticulé a disparu de la surface jugale tandis qu'il persiste plus de 60 % des films

réticulés (Etienne et al. 2005). Il semble donc peu probable que les cellules de côlon puissent dégrader les films multicouches.

✓ Les cellules forment des pseudopodes pour traverser le film, accéder au Tx et l'internaliser. Pour cela, le film réticulé doit présenter des discontinuités qui permettraient un passage des pseudopodes au travers du film réticulé.

✓ Le Tx est libéré dans les premières heures par diffusion passive de façon similaire au Diclofénac.

Cette dernière hypothèse semble étayée par des résultats en fluorimétrie. La fluorimétrie permet de déterminer avec précision la concentration de Tx en solution grâce à l'utilisation de Tx^{Green488} et de l'établissement d'une courbe étalon (figure III.6).

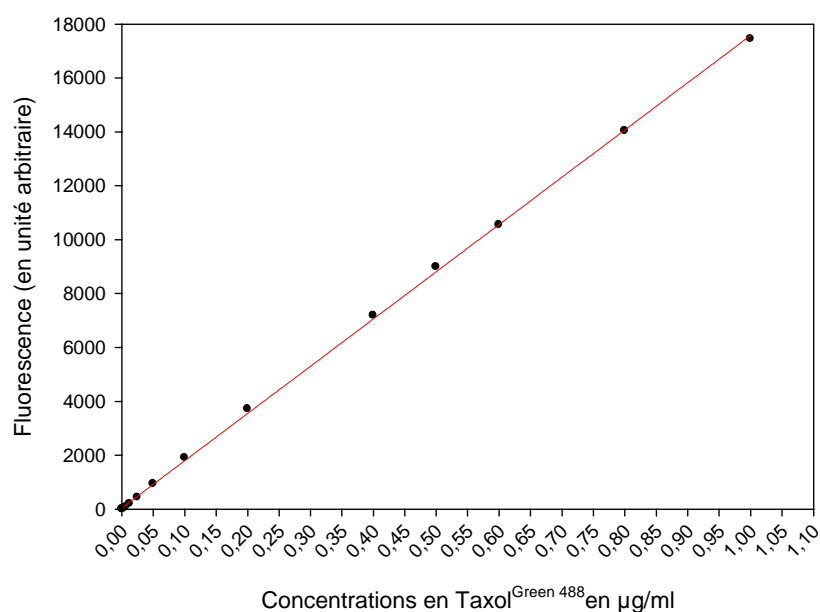


Figure III.6: Courbe étalon du TxI^{Green488} déterminée au fluorimètre. Le seuil de détection du fluorimètre est évalué à 3 ng/mL. La saturation est obtenue à partir de 1 µg/mL. La droite rouge correspond à la régression linéaire des résultats avec $r = 0,9999$

Selon la courbe étalon, des concentrations d'au moins 3 ng/mL en Tx^{Green488} peuvent être détectées grâce à cette technique.

En parallèle, la réponse des cellules HT29 mises en contact direct avec des solutions de Tx à différentes concentrations a été déterminée pour mettre en évidence l'effet dose-réponse (figure III.7).

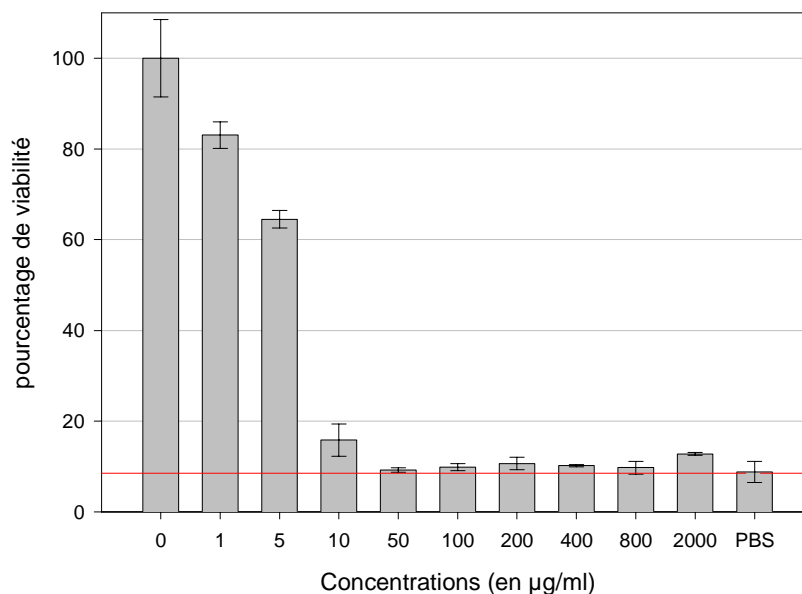


Figure III.7: Evaluation de la cytotoxicité du Taxol sur les HT29. Les cellules sontensemencées à 10^5 cellules/mL. Après 48 heures de culture, elles sont mises en contact avec les différentes solutions de Tx pendant 72 heures. La viabilité est alors déterminée par le test à la phosphatase acide. Les barres d'erreurs représentent les écart-types de 3 échantillons. La ligne rouge représente le pourcentage de viabilité minimale obtenu en cultivant les cellules dans du PBS (phosphate-buffered saline) seul. Le PBS permet d'imposer des conditions de culture drastiques, sans nutriments, ni sérum, ni vitamines, tout en conservant une bonne osmolarité.

L' EC_{50} du Tx (concentration effective : concentration molaire qui produit 50 % de la réponse maximale pour un produit actif) pour les HT29 se situe entre 5 et 10 $\mu\text{g/mL}$. Par conséquent, la technique de fluorimétrie permet la détection de la concentration en $\text{Tx}^{\text{Green488}}$ dans le surnageant ou dans le film bien avant qu'il ne soit toxique pour les cellules.

La concentration en $\text{Tx}^{\text{Green488}}$ après 24 heures de résidence dans un film réticulé a été déterminée par dégradation du film dans 1 mL de SDS à 0,01 N pendant 18 heures et 72 heures puis observation de ces solutions en fluorimétrie. Aucun signal n'est obtenu en fluorimétrie. La concentration du film en Tx est donc inférieure à 3 ng/mL de SDS ce qui correspond à une concentration en Tx inférieure à environ $0,75 \mu\text{g/cm}^3$ dans le film réticulé après 18 heures (en prenant en compte le volume du film). Cette concentration surfacique est donc inférieure à l' EC_{50} pour les HT29.

Lors des études de viabilité cellulaire, la mortalité cellulaire s'expliquerait par un contact direct entre les cellules et le Tx qui a diffusé dans le surnageant pendant 48 heures puisque le milieu n'est changé qu'après ce laps de temps. La diminution de densité cellulaire perdurant à 72 heures ne serait pas due à une diffusion du Tx du film vers le surnageant, le film ne contenant plus de Tx après 48H. Elle pourrait être due à l'action résiduelle du Tx avec une

latence de 24 heures entre la mise en contact avec l'agent antiprolifératif et la mort cellulaire résultante. Ce délai d'action de 24 heures entre l'intégration cellulaire du composé et l'apoptose a déjà été décrit avec le Cisplatine (Ceraline et al. 1997). Le Cisplatine, un agent anticancéreux alkylant, est mis en contact avec des fibroblastes humains normaux pendant 1 heure. L'évolution intracellulaire suite à ce contact court est alors observée. 24 heures après le contact, le nombre de cellules bloquées en phase G2/M continue d'augmenter ainsi que le taux de protéines P53⁵. Par conséquent, 24 heures après contact avec du Cisplatine, des cellules rentrent encore en apoptose suite à l'arrêt du cycle et à l'augmentation de la concentration intracellulaire en P53.

⁵ La P53 est une phosphoprotéine nucléaire connue comme « la gardienne du génome ». Elle module les phases du cycle cellulaire, l'apoptose ainsi que la différenciation cellulaire.

III.2.3. Article, (Schneider et al. 2007)

[*Signalement bibliographique ajouté par :*
SICD Strasbourg - Département de la Documentation électronique
Service des thèses électroniques]

Multifunctional polyelectrolyte multilayer films: combining mechanical resistance, biodegradability and bioactivity.

A. SCHNEIDER, C. VODOUHE, L. RICHERT, G. FRANCIUS, E. LE GUEN, P. SCHAAF, J.-C. VOEGEL, B. FRISCH, C. PICART

Biomacromolecules, 2007, Vol. 8, N° 1, 139-145

Pages 114-121 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1021/bm060765k>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

III.2.4. Conclusions et perspectives

La réticulation chimique représente une méthode pouvant s'appliquer à une grande variété de films multicouches de polyélectrolytes dès lors que des groupements amines et carboxyliques sont présents sur les chaînes. Elle a pour conséquence une modification des propriétés mécaniques du film en le rigidifiant. Cette réticulation augmente également la rugosité et la résistance du film à la dégradation. Les films à croissance exponentielle réticulés présentent alors l'avantage de devenir adhérents aux cellules comparativement aux films utilisés dans leur état natif.

Des molécules dont des médicaments peuvent alors être aisément incorporées dans ces structures par simple diffusion après réticulation, tout en conservant leur activité biologique. Il est également possible de moduler la quantité totale de ces principes actifs présents dans le film en augmentant le nombre de paires de couches du film (épaisseur) ou d'augmenter la concentration de molécules actives en chargeant le film avec des solutions plus concentrées. Toutefois, il semble que les films réticulés après mise en contact avec la solution ne permettent pas d'induire une activité sur plus de 3 jours probablement suite à la libération de toutes les molécules par diffusion hors du film. Cette voie ne semble donc pas appropriée pour une action longue.

Il est fort probable que les molécules diffusant à l'intérieur de l'assemblage établissent des interactions faibles avec le film réticulé (interactions hydrophobes, Van der Waals...) et que la constante d'équilibre résultante soit très faible. Il en résulte une désorption rapide des molécules adsorbées dans le film dès lors que la solution en contact du film ne renferme plus de principe actif (tampon seul). Pour augmenter la durée de la libération des molécules, des stratégies devraient être mises en œuvre consistant à augmenter les interactions molécules/films par exemple par augmentation des sites hydrophobes. Les sites hydrophobes peuvent être augmentés en construisant des films plus épais ou en utilisant des polyélectrolytes modifiés avec des parties hydrophobes (Guyomard et al. 2005).

III.3. Mélanges de copolymères de PLGA et effet barrière pour des réservoirs de molécules actives

III.3.1. Contexte initial

Par définition, un système à libération contrôlée doit délivrer un principe actif à une localisation, une concentration, une vitesse et sur une durée pré-déterminées. Pour créer un réservoir de molécules constitué de films multicouches, la difficulté réside essentiellement dans le contrôle de l'ouverture des différents compartiments pour la libération des molécules actives insérées dans les multicouches faisant fonction de réservoir.

Des films multicouches structurés avec des pores de taille variable ont permis de contrôler la vitesse de libération du kétoprofène et de la cytochalasine D (Berg et al. 2006).

L'équipe de P. Hammond a mis au point un système à base de polyélectrolytes et de médicaments qui permet de libérer différents composés de façon successive. La séquence de libération est déterminée selon le niveau d'enfouissement de la molécule ainsi que la barrière entre les deux compartiments (Wood et al. 2006).

Des monocytés déposés sur une structure hybride composée d'un film à croissance exponentielle recouvert d'un film à croissance linéaire ne peuvent traverser une barrière (PSS-PAH)₃₀ (Garza et al. 2005). Seul un film (PSS-PAH)₄ ou ceux d'épaisseur moindre permettent d'atteindre le compartiment "réservoir" sous-jacent (communication personnelle, chapitre III.1, (Vodouhê et al. 2006)). Par ailleurs, la réticulation ne semble pas conduire à des systèmes permettant une libération contrôlée sur des temps longs. Comme démontré chapitre III.2 (Schneider et al. 2007), la libération de molécules se fait sur une durée de 50 heures environ sans grande possibilité de faire varier la libération des molécules dans le temps. Le contrôle du taux de réticulation ne permet pas non plus de moduler la libération de principes actifs en termes de concentrations ou de durée de libération étant donné que la quantité de molécules intégrées dans la multicouche reste constante quelque soit le taux de réticulation.

D'autres stratégies s'avèrent donc nécessaires pour construire des films multifonctionnalisés ayant une activité biologique programmée dans le temps.

III.3.2. Multicouches construites à partir de mélanges de polyélectrolytes ℓ et d comme système de libération contrôlée de molécules actives

III.3.2.1. Introduction

Dans une première étude réalisée au laboratoire, l'accès à la protéine A, une protéine constitutive de la paroi bactérienne de *Staphylococcus aureus*, a été précisément modulée grâce à un assemblage particulier de multicouches de polyélectrolytes. La protéine A a été insérée dans un film multicouche PL-PGA dont le taux en énantiomères ℓ et d pour ces deux polyélectrolytes était variable. L'intérêt réside dans le fait que les énantiomères de forme d ne sont pas biodégradables. En effet, la forme d pour les acides aminés représente une forme synthétique, absente de la nature et il n'existe pas d'enzymes naturelles capables de les cliver. Grâce à un mélange variable d'énantiomères ℓ et d , des monocytes mis en culture sur des films fonctionnalisés avec la protéine A ont été activés de façon contrôlée dans le temps. La production de TNF- α (tumoral necrosis factor- α) suite à la présence de protéine A est induite après des laps de temps variables. Une transition entre la non-production (film constitué de 100 % de polyélectrolytes de forme d) et la production de TNF- α va dépendre de la composition en ℓ et d du film et de la profondeur d'insertion de la protéine A (Benkirane-Jessel et al. 2005).

Dans une étude complémentaire, une prodrogue a été synthétisée en couplant un dérivé de l' α -MSH (α -melanocyte stimulating hormone) à la PL ℓ (Chluba et al. 2001). L' α -MSH est une hormone stimulant la mélanogenèse au niveau des mélanocytes. Elle se lie à des récepteurs spécifiques présents sur ces cellules, les MCRs (melanocortin receptors), et induit ainsi l'activation de la tyrosinase, enzyme-clé dans la chaîne de synthèse de la mélanine.

Pour tester cette prodrogue, des mélanocytes murins particuliers nommés B16-F1 ont été cultivés sur un film multicouche PL ℓ -PGA ℓ fonctionnalisé avec la prodrogue. Ces mélanocytes ont la capacité de sécréter la mélanine mais ne la conservent pas dans le cytoplasme. Il a été démontré que les mélanocytes réagissaient à la PL ℓ - α -MSH insérée dans le film multicouche et que la synthèse de mélanine était prolongée dans le temps. L' α -MSH couplée à la PL ℓ maintient donc son activité et présente même une action potentialisée lors de son insertion dans un film multicouche (Chluba et al. 2001).

D'autre part, l' α -MSH a aussi un effet anti-inflammatoire. Pour tester cet effet, une réponse inflammatoire des monocytes est induite par la mise en contact avec du LPS

(lipopolysaccharide), un composant de la paroi bactérienne et une endotoxine. Dans ce cas de figure, l' α -MSH doit être couplée au PGA et non plus à la PL ℓ . En effet, la PL ℓ a un effet inflammatoire néfaste pour cette étude (Hwang et al. 2005). De plus, le PGA a été couplé au niveau de la séquence N-terminale pour laisser libre la séquence C-terminale où se trouve le site actif du peptide α -MSH. Un film multicouche est alors formé entre le PGA- α -MSH et le polycation PL ℓ . Une réponse anti-inflammatoire des monocytes cultivés sur cette structure est induite en raison de la présence de l' α -MSH. Le couplage au PGA ainsi que l'insertion dans le film ne modifie donc pas l'activité de l' α -MSH (Benkirane-Jessel et al. 2004a).

III.3.2.2. Evaluation du système de libération contrôlée du PGA- α -MSH

Au regard de ces différentes expériences, nous avons voulu tester la molécule active PGA- α -MSH déposée en surface de la multicouche composée d'un mélange d'énantiomères de PGA et PL. Le couplage avec le PGA devrait permettre de maintenir le tridécapeptide hydrophobe dans la multicouche. En effet, le peptide α -MSH a un poids moléculaire de 1690 Da alors que la protéine A a un poids moléculaire de 41400 Da. Le couplage de l' α -MSH au polyélectrolyte PGA chargé devrait faciliter son insertion dans la multicouche et réduire la diffusion à l'extérieur du film de cette molécule active de petit poids moléculaire.

Le PGA- α -MSH a ainsi été déposé en surface de films (PL-PGA)₂₀ construits à partir de solutions constituées de mélanges d'énantiomères ℓ et d correspondant soit à un film pur d , soit à un film pur ℓ , soit à des pourcentages en forme d notés (PL $d_{\%}$ -PGA $d_{\%}$)₂₀ de 25 %, 50 % ou 75 %. Le PGA est un polyélectrolyte qui diffuse dans les films multicouches PL-PGA (Lavalle et al. 2004b). En admettant que le PGA- α -MSH diffuse aussi dans l'ensemble du film, l'accès au PGA- α -MSH pourrait être modulé selon la vitesse de dégradation du film par les enzymes produites par les cellules. Cette hypothèse semble justifiée puisque l' α -MSH est un tridécapeptide qui ne devrait pas modifier le comportement du PGA en raison de sa petite taille.

Pour vérifier si l' α -MSH conserve son activité biologique après couplage au PGA et insertion dans ces films multicouches particuliers, la synthèse de mélanine par des mélanocytes murins (B16-F1)ensemencés sur ces différentes architectures a d'abord été visualisée par microscopie optique après 4 jours de culture (voir les conditions de culture présentées au chapitre II.2.11). En effet, la mélanine présente au sein des cellules leur confère une importante opacité à la lumière. Les cellules B16-F1 sont également cultivées sur un support

plastique en présence de PGA- α -MSH libre à 200 μ g/mL dans le surnageant (contrôle positif). Pour le contrôle négatif, les cellules sont ensemencées sur un film multicouche de polyélectrolytes en l'absence du peptide (figure III.8).

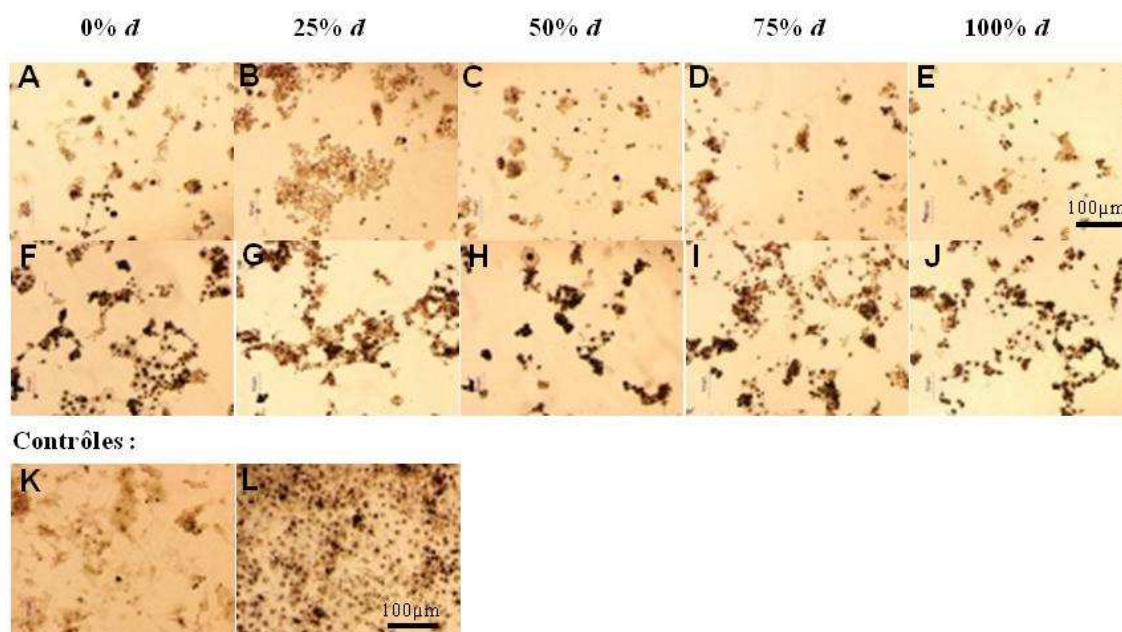


Figure III.8: Culture de mélanocytes sur différents films $(PLd/l-PGAd/l)_{20}$ construits avec des solutions contenant différents pourcentages en énantiomères d : en l'absence de PGA- α -MSH dans les films : (A) = 0% de d $(PLl-PGAl)_{20}$, (B) = 25% de d $(PLd_{25}-PGAd_{25})_{20}$, (C) = 50% de d $(PLd_{50}-PGAd_{50})_{20}$, (D) = 75% de d $(PLd_{75}-PGAd_{75})_{20}$, (E) = 100% de d $(PLd-PGAd)_{20}$; ou en présence de PGA- α -MSH adsorbé en surface des films à une concentration de 400 μ g/mL : (F) = 0% de d $(PLl-PGAl)_{20}$, (G) = 25% de d $(PLd_{25}-PGAd_{25})_{20}$, (H) = 50% de d $(PLd_{50}-PGAd_{50})_{20}$, (I) = 75% de d $(PLd_{75}-PGAd_{75})_{20}$, (J) = 100% de d $(PLd-PGAd)_{20}$. (K) représente les cellules cultivées sur une lamelle en verre (contrôle négatif) et (L) représente les cellules cultivées sur une lamelle en verre avec un milieu de culture supplémenté avec du PGA- α -MSH libre à 200 μ g/mL (contrôle positif). Les réglages (zoom, lumière, exposition de la caméra...) sont équivalents pour toutes les conditions présentées.

Tout d'abord, les observations au microscope optique montrent l'état morphologique des mélanocytes. Les cellules sur le contrôle positif (figure III.8 L) apparaissent plus opaques que les cellules sur le contrôle négatif (figure III.8 K) en raison de l'induction de la synthèse de mélanine. Il est donc possible d'identifier qualitativement de manière visuelle une cellule ayant interagi ou non avec PGA- α -MSH. La comparaison entre les films fonctionnalisés avec la prodrogue (images F à J) ou non fonctionnalisés (images A à E) permet de conclure que les films fonctionnalisés avec le PGA- α -MSH induisent visiblement la mélanogénèse. Par contre,

il est difficile de distinguer si la sécrétion est identique quelque soit le pourcentage en énantiomères de forme *d* rentrant dans la composition du film.

La réponse cellulaire au PGA- α -MSH inséré dans un film multicouche (PL ℓ -PGA ℓ)₅-PL ℓ -PGA- α -MSH-(PL*d*%-PGA*d*%)₂₀ sur un temps long (4 jours) a ensuite été quantifiée plus précisément. Pour cela la production de mélanine dans le surnageant est observée à l'aide de la spectrophotométrie visible à 405 nm (figure III.9).

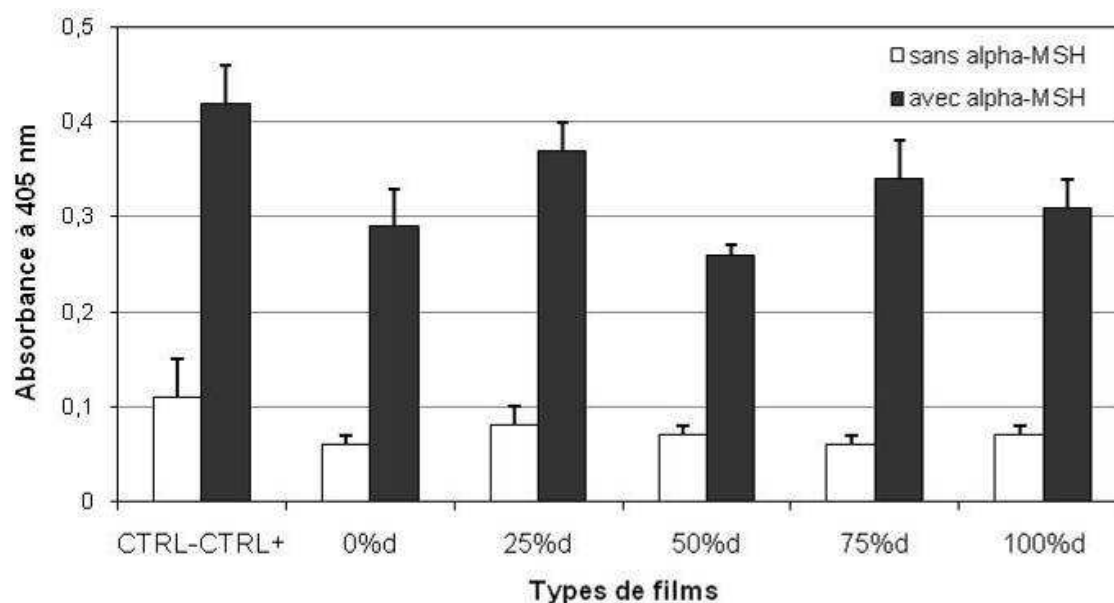


Figure III.9: Quantification de la production de mélanine après 4 jours d'interaction entre les cellules B16-F1 et les films multicouches par spectrophotométrie visible (405 nm). Le film multicouche (PL ℓ -PGA ℓ)₅-PL ℓ forme la base de l'architecture. Une couche de PGA- α -MSH à 400 μ g/mL est alors déposée (barres grisées) ou non (barres blanches). La construction s'achève par le dépôt de (PL*d*%-PGA*d*%)₂₀ dont la composition en énantiomères *d* varie selon les solutions utilisées pour la construction. Les cellules sont déposées sur une plaque 24 puits à une densité de $2,5 \times 10^4$ cellules/puits. Le contrôle négatif (CTRL -) correspond à la sécrétion de mélanine par des cellules cultivées sur plastique. Le contrôle positif (CTRL +) est obtenu en utilisant du PGA- α -MSH libre sur des cellules cultivées sur plastique. Les résultats correspondent à la moyenne de 3 mesures et les barres verticales représentent les écart-types de ces mesures.

Aucune différence de quantités de mélanine produites n'est observée lors de l'utilisation des différentes multicouches fonctionnalisées par PGA- α -MSH. Les films contenant uniquement des polyélectrolytes de forme *d*, donc des films non dégradables, n'empêchent pas l'accès des mélanocytes aux molécules de PGA- α -MSH insérées. D'autre part, la production de mélanine observée sur le support plastique (contrôle négatif) ou avec des multicouches non fonctionnalisés (barres blanches) s'explique par une activité basale constitutive du récepteur MCR-1 (Holst and Schwartz 2003; Sanchez-Mas et al. 2004). Ce récepteur couplé à la

protéine G est le premier élément de la chaîne de réactions cellulaires aboutissant à la synthèse de mélanine. Dans les cellules B16-F1, une production résiduelle de mélanine existe en permanence sans besoin de stimulus au niveau du récepteur (Siegrist et al. 1996).

III.3.2.3. Conclusions

La variation de la composition en énantiomères ℓ et d constituant les films de polyélectrolytes formés de poly(lysine) et de poly(acide glutamique) fonctionnalisés avec la molécule PGA- α -MSH ne permet aucune modulation de la production de mélanine par les cellules. La réponse ne dépend donc nullement de la composition du film recouvrant le peptide actif. Une hypothèse pourrait être que le peptide couplé et enfoui diffuse dans le film et se répartit dans l'intégralité du film et notamment en surface. Ainsi les cellules au contact du film sont probablement activées par le peptide présent à la surface avec une concentration surfacique suffisante pour déclencher la réaction. De ce fait, les cellules sont insensibles à la composition du film sous-jacent.

Les études de Chluba *et al.* ont déjà révélé une probable diffusion de l' α -MSH couplée à la PL ℓ (Chluba et al. 2001). En effet, la synthèse de mélanine par des mélanocytes cultivés sur des films PL ℓ -PGA avec différentes profondeurs d'enfouissement pour la PL ℓ - α -MSH (sous 0, 10 et 25 paires de couches) ne varie pas.

De plus, lorsque des mélanocytes sont déposés sur une structure complexe formée d'un film PL ℓ -PGA contenant la PL ℓ - α -MSH et recouvert de couches (PSS-PAH)₈, les cellules présentent alors une synthèse résiduelle de 80 %. Les cellules interagissent donc avec la PL ℓ - α -MSH malgré la présence du film multicouche de polyélectrolytes de synthèse (PSS-PAH)₈ censé agir comme barrière non-dégradable. En comparaison, il suffit de 3 paires de couches de PSS-PAH pour bloquer significativement l'accès au paclitaxel (Taxol) et conserver une activité résiduelle de seulement 30 % après 4 jours de culture cellulaire (Vodouhê et al. 2006). Une autre hypothèse est que la barrière PSS-PAH est peut-être constituée de PGA et de PL ℓ - α -MSH qui se mélangent au PSS et à la PAH au cours de la construction, la PL ℓ - α -MSH ayant auparavant diffusé jusqu'à la surface.

Selon ces résultats, l'intérêt est de limiter la diffusion des espèces dans le film multicouche et d'obtenir une molécule qui reste à son site de dépôt comme le fait la protéine A. L'utilisation de plus grandes chaînes de PGA est à tester pour diminuer cette diffusion ou le couplage à un polyélectrolyte non diffusible comme le PSS ou le PAH.

III.3.3. Choix du PLGA comme barrière à la diffusion de molécules actives intégrées dans des multicouches

Parmi les systèmes de supports médicamenteux insérés dans l'organisme, certains sont basés sur des composés dont la structure chimique est inerte pendant et après la libération de médicaments. Ils ne se dégradent pas et nécessitent généralement une intervention pour les retirer. Actuellement, beaucoup d'attentions et d'efforts sont portés sur l'utilisation de polymères biodégradables en tant que plateforme de libération de médicaments. Ces matériaux se dégradent naturellement dans le corps humain suite à divers processus biologiques, évitant ainsi l'acte chirurgical dès lors que la libération de l'agent actif est terminée. Ainsi, la plupart des polymères biodégradables se dégradent par hydrolyse des chaînes de polymères. Les polymères sont respectivement décomposés en monomères naturels, comme pour le poly(acide lactique), le poly(acide glycolique), ou leurs copolymères qui libèrent l'acide lactique et l'acide glycolique en se dégradant. Ces derniers sont à leur tour décomposés par des cycles biologiques physiologiques en eau et en dioxyde de carbone (voir chapitre I.3.2).

En 2003, le groupe du Professeur R. Langer au MIT (Massachusetts Institute of Technology, Boston) a présenté des " microchips " à base de polymères biodégradables qui libèrent à des temps variables des molécules actives sur des durées variant de quelques jours à 5 mois (Grayson et al. 2003). Ces biopuces sont constituées de réservoirs macroscopiques en poly(acide *l*-lactique) (PLA) remplis de principes actifs et scellés par une couche constituée de poly(acide *d,l*-lactique-co-glycolique) (PLGA). Ce dispositif mesure 1,2 cm de diamètre et fait 560 μm d'épaisseur. Il dispose de 36 réservoirs pouvant être chargés avec des molécules différentes. Ces microréservoirs sont recouverts d'une couche de PLGA de poids moléculaires différents conduisant à des vitesses de dégradation variables (figure III.10).

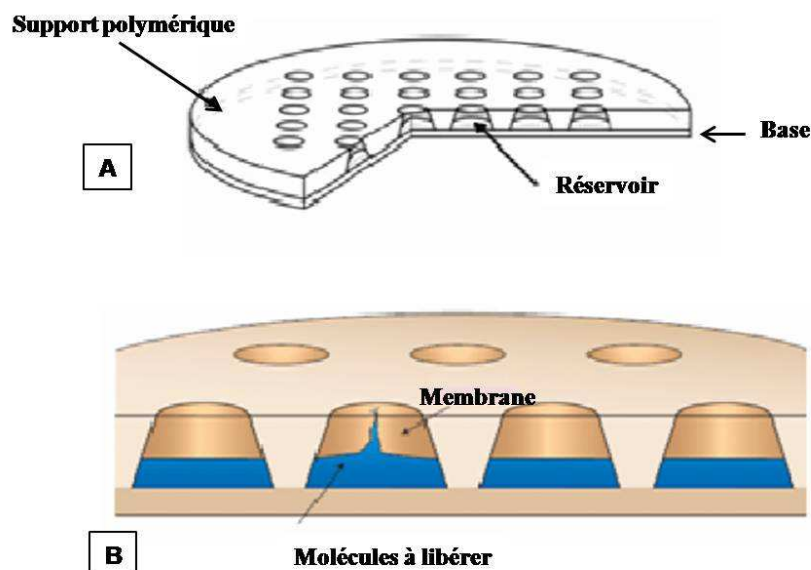


Figure III.10: Schéma du dispositif des " microchips " biodégradables. (A) Le support est fabriqué à base du polyester PLA. (B) Chaque réservoir peut être rempli par un composé différent (en bleu) puis est refermé par une couche biodégradable de PLGA (Grayson et al. 2003).

Les cinétiques de dégradation de la couche de PLGA et la libération d'héparine, de HGH (human growth hormone) ou de dextran contenus dans les microréservoirs sous-jacents ont été déterminées. Une modulation des quantités de biomolécules libérées a été possible jusqu'à une durée de 5 mois tout en conservant l'activité des molécules durant l'ensemble de cette période.

Suite à ces études prometteuses, une stratégie a été développée au laboratoire afin de créer un système réservoir/barrière constitué d'un film multicouche PL ℓ -HA, pour stocker les principes actifs, et d'une couche de PLGA, placée sur le film PL ℓ -HA en tant que barrière pour prévenir la libre diffusion des biomolécules enfouies (Garza et al. 2005). Des cellules de moelle osseuse de souris ont été déposées sur les films comprenant les multicouches de polyélectrolytes et la couche hydrolysable de PLGA. Après 17 heures d'ensemencement, ces cellules internalisent la PL ℓ^{FITC} contenue dans le film multicouche PL ℓ -HA. Les cellules dégradent donc localement la barrière de PLGA afin d'accéder à la PL ℓ^{FITC} localisée dans le compartiment (PL ℓ -HA)₂₀ sous-jacent.

Une architecture plus complexe a ensuite été réalisée par ces mêmes auteurs pour obtenir un système de multicompartiments : (PL ℓ -HA)₃₀-PL ℓ^{FITC} -PLGA-(PL ℓ -HA)₃₀-PL ℓ^{Rho} c'est-à-dire un compartiment marqué par un fluorophore vert et un compartiment marqué par un fluorophore rouge séparés par une barrière de PLGA. Les cellules intègrent en moins d'une

heure la $PL\ell^{Rho}$. Mais les cellules n'accèdent à la $PL\ell^{FITC}$ dans le deuxième compartiment qu'après 5 jours de culture en raison de la présence de la barrière de PLGA de haut poids moléculaire de plusieurs micromètres d'épaisseur.

L'objectif de la présente étude dérive de l'ensemble de ces travaux. Il consiste à stimuler et contrôler une réponse cellulaire spécifique en modulant la vitesse de dégradation de la barrière de PLGA. De plus, la dégradation de ces barrières par hydrolyse ou/et par action des enzymes sécrétées par les cellules doit être modulable pour atteindre un intervalle de temps de plusieurs jours (de 1 à 7 jours) en jouant sur les compositions et propriétés des films de PLGA. Ces architectures mixtes faites de films bioactifs de multicouches de polyélectrolytes et de couches de polymères hydrolysables pourraient alors constituer une nouvelle voie pour un accès contrôlé à des principes actifs afin d'induire une cascade de signalisations cellulaires spécifiques et déclenchées avec un délai prédéterminé.

III.3.4. Mélanges de PLGA et modulation de la dégradation

Le concept original de l'étude présentée dans ce chapitre se situe dans la composition des barrières de PLGA permettant de varier les vitesses de dégradation de cette barrière.

La dégradation du PLGA est déjà couramment étudiée en raison de l'utilisation de ce polyester dans les formes galéniques. Différents types de chaînes de PLGA ont été synthétisés afin de dégrader le PLGA après des temps d'incubation plus ou moins long en fonction du traitement recherché. Le taux en énantiomères ℓ ou d de l'acide lactique modifie le comportement du PLGA car l'acide d -lactique n'est pas biodégradable (Li 1999). Dans notre étude, nous utiliserons toujours des polymères avec un ratio en énantiomères de 50:50. Les taux d'acide lactique et d'acide glycolique constituant le copolymère PLGA interviennent aussi dans le processus de dégradation étant donné que l'acide glycolique se dégrade plus rapidement que l'acide lactique puisqu'il ne possède pas de radical greffé sur sa chaîne principale (Lu et al. 1999). Cependant nous conserverons tout au long des expériences un ratio en composition de 50:50 pour les deux acides.

Nous allons jouer sur le ratio volumique en polymères de haut et bas poids moléculaire. L'avantage du ratio de PLGA de deux masses moléculaires différentes par rapport au changement des ratios lactique/glycolique ou acide lactique ℓ/d est qu'il ne sera pas besoin de synthétiser différentes molécules pour chaque cas de figure. De plus, la modulation selon les

poids moléculaires pourrait permettre un contrôle plus fin de la dégradation par rapport aux deux autres méthodes.

Mauduit *et al.* ont mélangé du poly(acide *l,d*-lactique) (PLA) de deux poids moléculaires dans le but de créer des systèmes de libération contrôlée de médicaments (Mauduit et al. 1993). Le PLA de bas poids moléculaire se dégrade plus vite et libère l'antibiotique gentamycine plus tôt que le PLA de haut poids moléculaire. Les mélanges se dégradent et libèrent la gentamycine dans une fenêtre de temps entre ces deux extrêmes. Le mélange des deux polymères de poids moléculaires différents permet donc une modulation de la vitesse de dégradation d'où une libération contrôlée des molécules actives selon l'échelle de temps thérapeutique désirée.

Ravivarapu *et al.* ont repris ce concept et utilisent des copolymères de poly(acide *l,d*-lactique-co-glycolique) (PLGA) de poids moléculaires différents pour créer des microsphères. Des cinétiques de libération variables sont obtenues en modifiant le ratio en poids moléculaire du mélange de copolymères. Les microsphères chargées de l'analogue de l'hormone LH-RH (hormone de libération de l'hormone lutéinisante) nommé leuprolide (ou leuproreline), et constituées d'un taux important en polymères de bas poids moléculaires libèrent les médicaments beaucoup plus rapidement que des microsphères composées de taux faibles en PLGA de bas poids moléculaires. Par utilisation de diverses microsphères pour l'injection, la molécule active est ainsi libérée en quantité satisfaisante pour agir dans l'organisme très tôt après l'injection ainsi qu'à plus long terme. La libération de leuprolide est continue et contrôlée en termes de quantité pour antagoniser la synthèse des hormones sexuelles par "down-regulation" (voir paragraphe I.3.3.). L'intérêt du mélange de différentes microsphères, composées de mélanges de copolymères, réside dans la durée d'action thérapeutique et dans l'absence de phase de latence thérapeutique normalement observée lors de l'utilisation d'autres types de microcapsules (Ravivarapu et al. 2000).

Notre étude présentée ci-dessous découle des résultats décrits dans la littérature. Elle se base sur la formation de films barrières en polymères PLGA sur les films multicouches de polyélectrolytes réservoirs déjà présentés chapitre III.1 et III.2.. La composition des barrières de PLGA varie selon le taux volumique de PLGA de haut et de bas poids moléculaires. Les barrières sont ainsi formées d'un mélange de deux poids moléculaires de PLGA, 70000 g/mol et 5000 g/mol. Ce ratio volumique est noté PLGA x/y , x représentant le pourcentage de PLGA de haut poids moléculaire et y le pourcentage de faible poids moléculaire.

Il faut préciser ici le type de notation utilisée. Il est courant de trouver dans les publications la notation PLGA x/y . Elle correspond alors aux pourcentages d'acide lactique et d'acide glycolique en termes de masse ou de mole dans la composition propre du PLGA. Dans toute notre étude, ce taux en acide lactique/acide glycolique est maintenu à 50/50 (nombre de monomères). Dans certaines publications, ces notations peuvent également signifier le taux d'énantiomères l et d de l'acide lactique. Là encore dans notre étude, le ratio en l et d n'est jamais modifié et demeure racémique (50/50).

Les deux solutions mères de PLGA de haut et de bas poids moléculaires sont préparées extemporanément à une concentration de 10 mg/mL dans du chloroforme. Elles sont ensuite mélangées pour obtenir le ratio volumique $x/y = 100-x$ désiré. Les différents mélanges utilisés sont représentés dans le tableau III.2 :

Notation	PLGA 100/0	PLGA 75/25	PLGA 50/50	PLGA 25/75	PLGA 0/100
Ratio volumique de solution de PLGA MW = 40000/75000 g/mol	1	0,75	0,5	0,25	0
Ratio volumique de solution de PLGA MW = 4265 g/mol	0	0,25	0,5	0,75	1

Tableau III.2: Composition des différentes solutions de PLGA utilisées pour la construction des barrières.

Le ratio volumique noté x/y correspond au pourcentage de PLGA de haut poids moléculaire, x , par rapport au pourcentage de bas poids moléculaire, $y = 100-x$.

De cette façon, la dégradation, soit spontanée par hydrolyse, soit activée par les cellules mises en culture sur le film, devrait être modulée en fonction des mélanges de PLGA utilisés pour réaliser la barrière. Nous allons évaluer ces mélanges des polymères de deux poids moléculaires différents pour créer des barrières afin d'obtenir une dégradation contrôlée dans le temps et en conséquence moduler l'activité cellulaire.

Les épaisseurs des films de PLGA constituent une deuxième approche pour moduler les vitesses d'interactions des cellules avec les principes actifs contenus dans les films multicouches. Ce paramètre sera aussi testé en corrélation avec les différents mélanges de poids moléculaire.

III.3.5. Détermination de l'épaisseur des films

En utilisant la méthode de "solvent casting" présentée paragraphe II.2.3., cinq types de films de PLGA sont préparés en mélangeant le PLGA de haut et de bas poids moléculaire (tableau III.2). Ces films sont construits sur des lamelles de verre de 12 mm de diamètre recouvertes avec de la $PL\ell^{FITC}$ et placées dans une boîte de Pétri de 5 cm de diamètre. Un volume fixe de 4,3 mL pour les mélanges est coulé dans la boîte. Après évaporation du chloroforme et prise en masse du PLGA, les lamelles de verre avec les films sont sorties de la boîte de Pétri et placées sous vide pendant 18 heures. Le film est ensuite mis en contact avec une solution de $PL\ell^{FITC}$. Ainsi, il est possible de déterminer les épaisseurs des films de PLGA par microscopie confocale puisque les deux faces sont marquées par une couche de $PL\ell^{FITC}$ (figure III.11 et Tableau III.3).

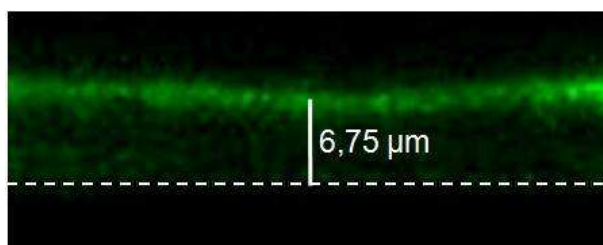


Figure III.11: Détermination de l'épaisseur d'un film PLGA 100/0 par microscopie confocale. La lamelle de verre est préalablement recouverte d'une couche de $PL\ell^{FITC}$. Suite à la construction du film PLGA 100/0, une couche de $PL\ell^{FITC}$ est déposée au-dessus pour délimiter le film. La ligne pointillée représente l'emplacement de la lamelle en verre. La taille de l'image est de 55,79 x 22,04 μm^2 .

Mélanges de PLGA	Epaisseur (μm)	Ecart-type
100/0	6,8	1,2
67/33	4,2	0,2
50/50	5,4	0,5
25/75	8,2	1,9
0/100	2,6	0,3

Tableau III.3: Détermination des épaisseurs de PLGA par imagerie confocale. Les écart-types sont calculés à partir de 2 échantillons par condition et 3 mesures sont réalisées sur chaque échantillon. 4,3 mL de PLGA sont coulés dans les boîtes de Pétri de diamètre 5,5 cm contenant les lamelles de verre.

Les épaisseurs varient entre 2,6 et 8,2 μm selon le mélange de PLGA utilisé. Ces différences d'épaisseurs peuvent être dues à l'arrangement des chaînes les unes par rapport aux autres et à

leur " compactage " dans la structure finale. Cependant, il semble qu'il n'existe pas de relation directe entre le ratio et cette aptitude au " compactage ".

Ces variations seront cependant à prendre en compte pour l'analyse des résultats impliquant la construction complète. Les différences d'épaisseurs entre les couches de PLGA pourraient influencer les temps de dégradation. Par exemple, les couches de PLGA 50/50 doivent en théorie se dégrader moins vite que celles constituées de PLGA 25/75 selon le comportement des poids moléculaires. Toutefois l'effet inverse pourrait être envisagé en raison des épaisseurs différentes observées. Nos conditions expérimentales n'ont cependant pas été modifiées pour obtenir des épaisseurs identiques. La suite des expériences étant réalisée avec des cellules, il nous a semblé bon de conserver des volumes identiques de chloroforme pour éviter d'obtenir des toxicités différentes.

III.3.6. Etudes de la dégradation de différents mélanges de PLGA

III.3.6.1. Diminution de masse des films de PLGA au cours de la dégradation

La dégradation par hydrolyse de différents mélanges de PLGA a été réalisée dans du milieu de culture RPMI complet, placé dans un incubateur à CO₂ saturé en eau sous une atmosphère composée de 5 % de CO₂, 90 % de N₂, 5 % de O₂ et maintenue à 36,5 °C (figure III.12).

Le protocole expérimental suit quatre étapes principales :

Au temps désiré (2 heures, 3 jours...), le film de PLGA contenu dans une boîte de Pétri est rincé avec de l'eau. Il est ensuite séché grâce à une pompe à vide pendant 15 minutes à 1 heure. Après pesée, du milieu RPMI neuf est déposé dans la boîte de Pétri contenant le film de PLGA. Une étape de stérilisation aux UV pendant 10 minutes termine le protocole afin d'éviter une contamination bactérienne pendant l'incubation.

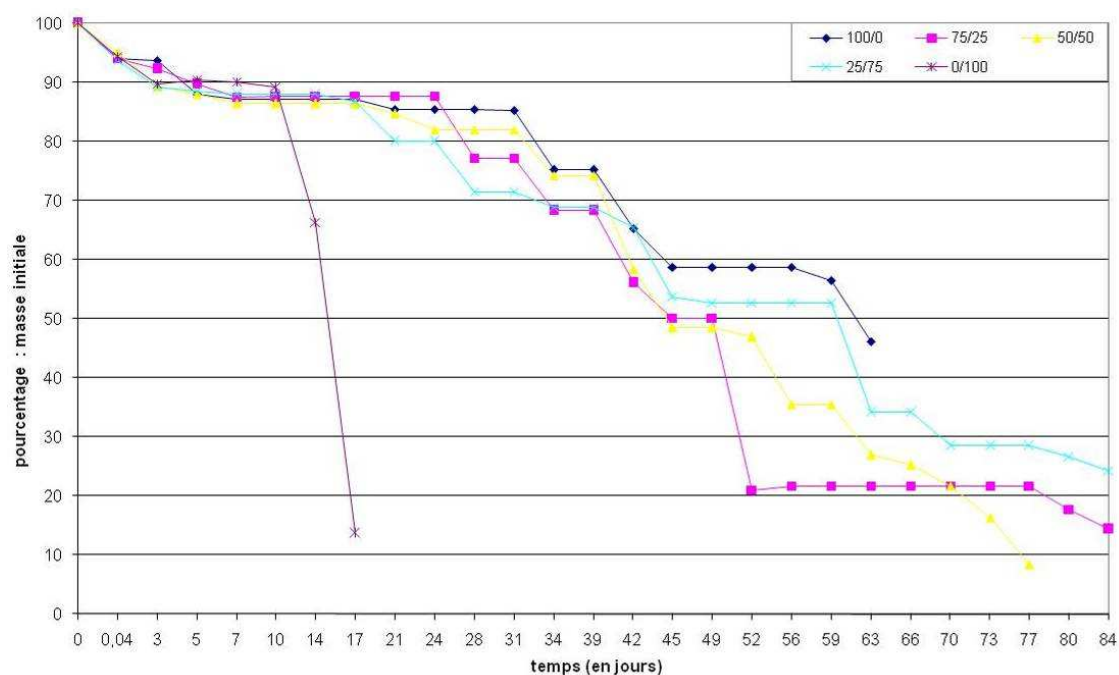


Figure III.12: Dégradation de différents types de films de PLGA dans du milieu RPMI complet. La dégradation dans le temps est mesurée en déterminant le ratio de la masse des films par rapport à la masse initiale au jour 0 de dégradation. Les films de PLGA sont constitués d'un ratio x/y en polymères de haut et bas poids moléculaire

Les cinq films polymères se dégradent de façon équivalente en termes de perte de masse jusqu'au 10^{ème} jour à partir duquel des différences importantes commencent à apparaître.

Le PLGA de bas poids moléculaire (PLGA 0/100) se dégrade totalement en moins de 3 semaines. Après 17 jours de dégradation, il ne reste que 13,7 % du poids initial. Ensuite le film n'est plus manipulable pour le suivi du poids. A contrario, le PLGA de haut poids moléculaire (100/0) résiste mieux à l'hydrolyse et 46 % du poids du film initial persiste encore au bout de 2 mois d'expérience. Le film composé d'un mélange de PLGA 50/50 se comporte de manière identique au PLGA 100/0 jusqu'au 42^{ème} jour de dégradation puis se dégrade alors plus rapidement. Après deux mois, la fraction de film résiduel de PLGA 50/50 est seulement de 27 % alors qu'elle est de 46 % pour le PLGA 100/0.

Pour les mélanges de PLGA 75/25 et 25/75, les résultats sont moins dissociés. Pour le mélange 75/25, la dégradation se fait progressivement puis semble ralentir après 52 jours. Une fraction résiduelle d'environ 20 % persiste alors jusqu'à 80 jours où une dégradation complète semble reprendre.

Pour le mélange 25/75, la réaction de dégradation suit un profil régulier. Ces résultats n'ont pas pu être reproduits par la suite, les autres films de PLGA 25/75 se désagrègent rapidement dans les boîtes de Pétri. Le comportement du PLGA 25/75 empêche donc la détermination

précise du poids restant du polymère. Cette dégradation, beaucoup plus lente que la dégradation attendue, pourrait être due à l'épaisseur importante du film de PLGA 25/75 de $8,2 \mu\text{m} \pm 1,9$ (Tableau III.3) par rapport à l'épaisseur moyenne des autres mélanges de PLGA (moyenne de $5,85 \mu\text{m}$).

Plusieurs facteurs semblent donc déterminer la dégradation des films composés de mélanges de PLGA de haut et de bas poids moléculaires. Il semble que plus la couche de PLGA est constituée d'une fraction importante de chaînes de bas poids moléculaires, plus elle se dégrade rapidement. Cependant, il a aussi été mis en évidence que les épaisseurs de ces structures jouent un rôle non négligeable sur la dégradation. Il faudra donc tenir compte des différences en épaisseur des couches pour interpréter les résultats concernant les réponses cellulaires induites par les films.

III.3.6.2. Evolution des rugosités des films de PLGA au cours de la dégradation

Le microscope à force atomique (AFM) permet d'imager la topographie des films de polymère PLGA (figure III.13).

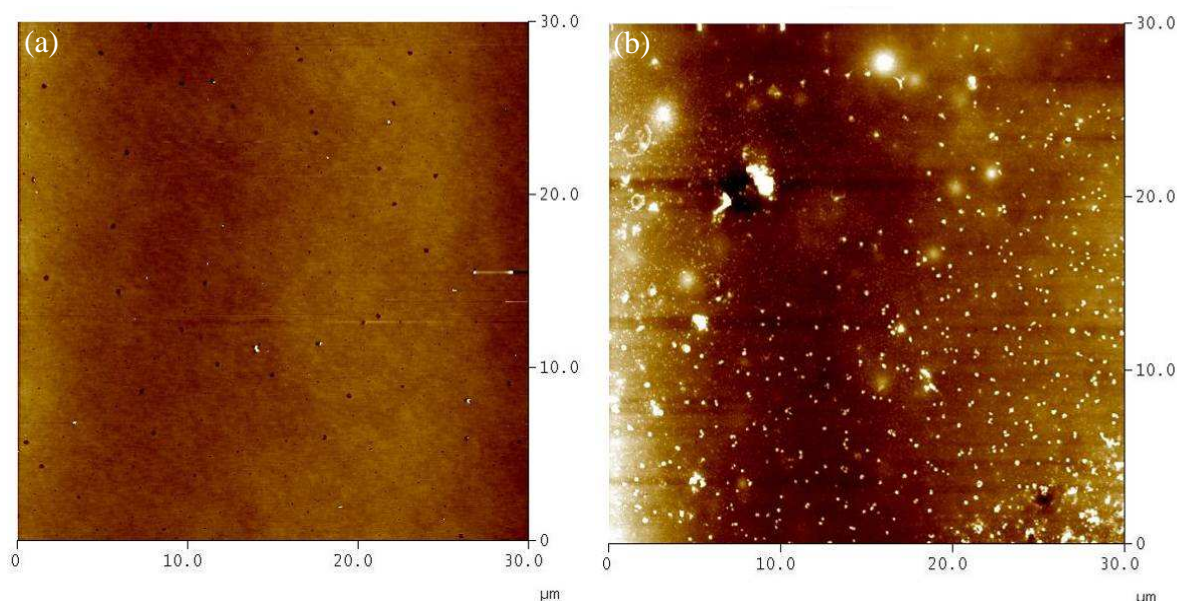


Figure III.13: Images AFM d'un film de PLGA 33/67 à $t=0$ (a) et à $t=1$ jour (b). Les images des hauteurs sont représentées avec une échelle de 20 nm pour (a) et 100 nm pour (b). La taille latérale des images est de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$.

La comparaison entre ces deux images met en évidence un début de dégradation sur une durée de 1 jour du PLGA 50/50 avec notamment la présence de petites aspérités et de larges pores. La limitation de l'AFM ne nous a pas permis d'imager convenablement des structures trop

dégradées et donc trop rugueuses. Il a ainsi été impossible de visualiser les films de PLGA 0/100 en AFM, la surface étant déjà trop rugueuse au bout de 1 jour pour être imagée.

Il est possible de réaliser la mesure de la rugosité des films composés de différents mélanges de PLGA au cours de leur dégradation par hydrolyse. La rugosité de l'échantillon est ainsi mesurée par la valeur de RMS (Root Mean Square) qui correspond à la déviation standard des valeurs de la hauteur des points (voir paragraphe II.2.4.).

La dégradation des films les plus stables, c'est-à-dire ceux constitués de PLGA 100/0 a ainsi été suivie sur un temps long (43 jours) en présence de milieu de culture DMEM (figure III.14).

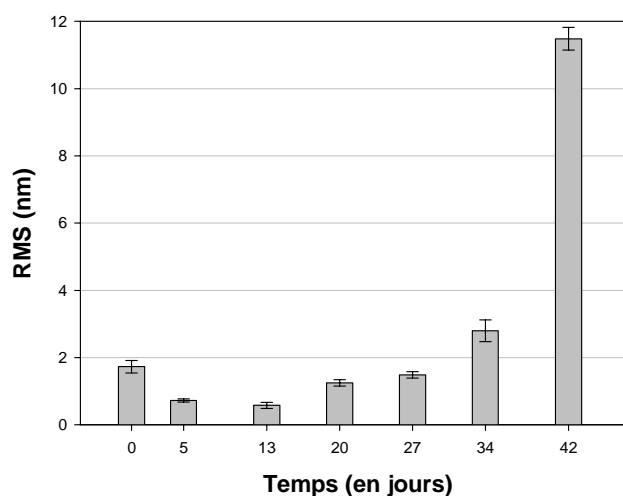


Figure III.14: Evolution de la rugosité (RMS) de surface mesurée par AFM d'un film composé de PLGA 100/0 lorsqu'il est placé dans du milieu de culture (DMEM) pendant 43 jours. La rugosité de la surface est déterminée par AFM en imageant trois zones différentes de l'échantillon de 1 μm de côté (moyenne de trois RMS). Les barres verticales correspondent aux écart-types des valeurs.

Comme déjà noté par l'étude de la perte de masse, le film de PLGA 100/0 commence à se modifier fortement à partir du 32^{ème} jour de mise au contact avec le milieu, la rugosité restant faible auparavant. Nous avons ensuite réalisé une deuxième étude en suivant différents films sur 7 jours avec des monocytes cultivés en surface (figure III.15). Des films de PLGA 33/67 ont été préférés aux films 25/75, ces derniers étant trop rugueux au bout d'une semaine pour être imagés en AFM.

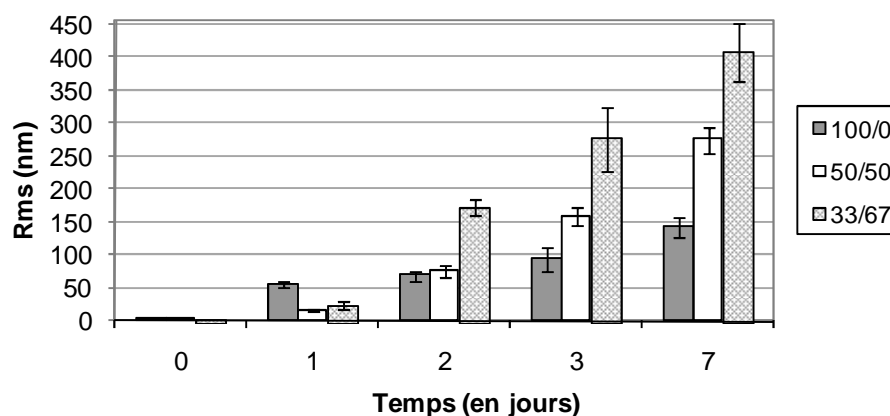


Figure III.15: Evolution de la rugosité (RMS) de surface mesurée par AFM de différents films composés de mélanges de PLGA au contact de milieu de culture (DMEM) et de monocytes sur 7 jours. Trois mélanges de PLGA sont testés : 100/0 (gris foncé), 50/50 (blanc) et 33/67 (gris clair). La rugosité RMS est calculée sur une zone de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$. Les écart-types sur 3 échantillons sont mesurés et représentés par les barres verticales.

Les résultats de rugosité sur 7 jours fournissent des informations sur l'état des films suite à la dégradation par hydrolyse du PLGA, combinée à l'effet des monocytes. Il existe une différence significative de comportement des mélanges de PLGA 100/0, 50/50, et 33/67 lors d'une dégradation sur 7 jours en présence de cellules. Le PLGA 0/100 est trop rugueux après une journée d'incubation pour estimer une rugosité moyenne. Le fait de modifier la composition avec 1/3 de PLGA de haut poids moléculaire (33/67) permet de ralentir la dégradation. Pour le PLGA 50/50, une rugosité importante commence à apparaître à 2 jours de dégradation. La valeur de la rugosité RMS pour cet échantillon se situe toujours entre les deux valeurs de rugosités, minimale pour PLGA 100/0, et maximale pour le PLGA 33/67.

Les rugosités pour le PLGA 100/0 obtenues en présence de cellules sont beaucoup plus élevées que celles obtenues dans le milieu seul. Les monocytes augmentent donc fortement la dégradation du PLGA, soit par acidification locale du milieu, soit par dégradation grâce à des enzymes sécrétées, soit encore par des processus de phagocytose courants pour ces types cellulaires.

III.3.6.3. Visualisation des films de PLGA déposés comme barrière sur des films multicouches

Avant de réaliser les expériences de dosages avec les systèmes cellulaires, nous avons contrôlés les architectures complètes $(PL\ell\text{-PGA})_5\text{-PLGA-PL}\ell$ et $(PL\ell\text{-HA})_{30}\text{-PSS-PLGA-PL}\ell$ (dont le choix de l'architecture sera justifié aux paragraphes III.7. et III.8. respectivement). En effet, les films multicouches recouverts de PLGA pourraient subir de fortes modifications structurales et, inversement, les films multicouches pourraient perturber le dépôt de PLGA.

Plusieurs méthodes sont à notre disposition pour examiner l'évolution des structures dans le temps (microscopie optique, AFM, ou microscopie confocale). Néanmoins, la microscopie confocale fournit une information tridimensionnelle et est parfaitement utilisable selon l'épaisseur des architectures. Elle permet d'observer une section de l'intégralité de l'architecture et de confirmer une absence de diffusion de polyélectrolytes fluorescents dans le film de PLGA (figure III.16).

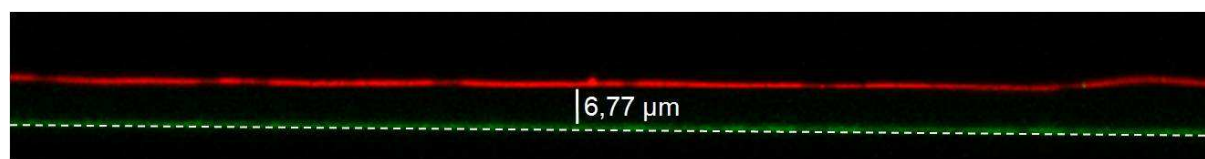


Figure III.16: Observation par microscopie confocale d'une section d'un film composé de $(PL\ell\text{-PGA})_5\text{-PL}\ell^{\text{FITC}}\text{-PLGA 100/0-PL}\ell^{\text{Rho}}$ après incubation pendant 1 jour dans une solution de NaCl 0,15M. Le PLGA100/0 est déposé par la méthode de "solvent casting" en utilisant 4,3 mL de solution de PLGA à 10 mg/mL (couche de 6,8 μm environ). L'image correspond à une section du film (plan x,z) avec la somme des canaux rouge et vert. Le trait en pointillé représente le support en verre. La taille de l'image est de $230,34 \times 28,45 \mu\text{m}^2$.

L'image III.16 démontre que les multicouches $PL\ell\text{-PGA}$ marquées à la $PL\ell^{\text{FITC}}$ semblent toujours intactes suite au contact avec le chloroforme, solvant du PLGA, lors de l'étape de dépôt par "solvent casting". Les films multicouches maintiennent ainsi une fluorescence homogène. En raison de la résolution selon l'axe z du microscope confocal limitée à 400 nm environ, il n'est cependant pas possible de déterminer l'épaisseur du film $(PL\ell\text{-PGA})_5$ sous-jacent. L'épaisseur de la couche de PLGA obtenue suite au dépôt de 4,3 mL de solution est de l'ordre de 6,8 μm , conformément à la valeur obtenue précédemment pour un film construit directement sur une lamelle en verre.

Le film de PLGA (bande noire non marquée et délimitée par les bandes vertes et rouges) semble empêcher correctement la diffusion de $PL\ell^{\text{FITC}}$ ou de $PL\ell^{\text{Rho}}$.

Si le volume de solution de PLGA déposé par "solvent casting" est de 2,5 mL au lieu de 4,3 mL, l'épaisseur du film de PLGA formé diminue fortement (1,5 μm au lieu de 6,8 μm) (figure III.17).

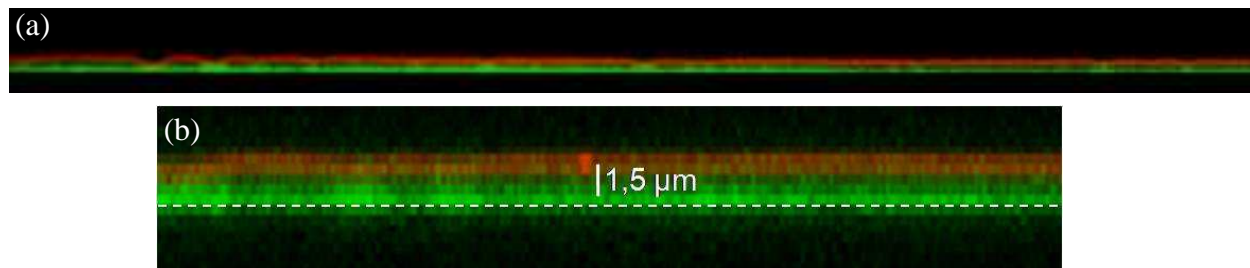


Figure III.17: Observation par microscopie confocale d'une section d'un film composé de $(\text{PL}\ell\text{-PGA})_5\text{-PL}\ell^{\text{FITC}}\text{-PLGA 100/0-PL}\ell^{\text{Rho}}$. Le PLGA 100/0 est construit par la méthode de "solvent casting" en utilisant 2,5 mL de solution de PLGA à 10 mg/mL. L'épaisseur du film est de 1,5 μm environ. Les tailles des images sont de $230,34 \times 15,92 \mu\text{m}^2$ (a) et de $38,33 \times 6,89 \mu\text{m}^2$ (b).

Au final, les mélanges de PLGA utilisés permettent donc d'aboutir à des temps de dégradation variables des barrières. Ce phénomène ne semble pas perturbé par la construction sur des films multicouches de polyélectrolytes à la place d'une surface en verre. On peut donc envisager d'utiliser ce concept et de charger le réservoir constitué par le film multicouche par un substrat actif afin d'évaluer alors l'effet barrière de la couche de PLGA recouvrant le film.

III.3.7. Enfouissement de l' α -MSH dans l'édifice multicouches de polyélectrolytes/barrière de PLGA

III.3.7.1. Modulation de la production de la mélanine par les cellules B16-F1 ensemencées sur différents films

L'objectif principal de cette étude consiste à créer un film comprenant un réservoir de $(\text{PL}\ell\text{-PGA})_5$ fonctionnalisé avec du $\text{PGA-}\alpha\text{-MSH}$ et une barrière de PLGA recouvrant le réservoir. Un analogue de l' α -MSH est lié de façon covalente au PGA pour que cette prodrogue soit capable de s'intégrer dans le film multicouche $\text{PL}\ell\text{-PGA}$. Les différents mélanges de PLGA utilisés pour construire la couche barrière devraient permettre de différer et moduler l'accès des cellules au film fonctionnalisé sous-jacent. Des mélanocytes murins B16-F1 ont été mis en culture sur les différentes architectures et la sécrétion de la mélanine suite à l'activation par l'hormone a été mesurée par spectrophotométrie et lecture de l'absorbance à 405 nm (figure III.18).

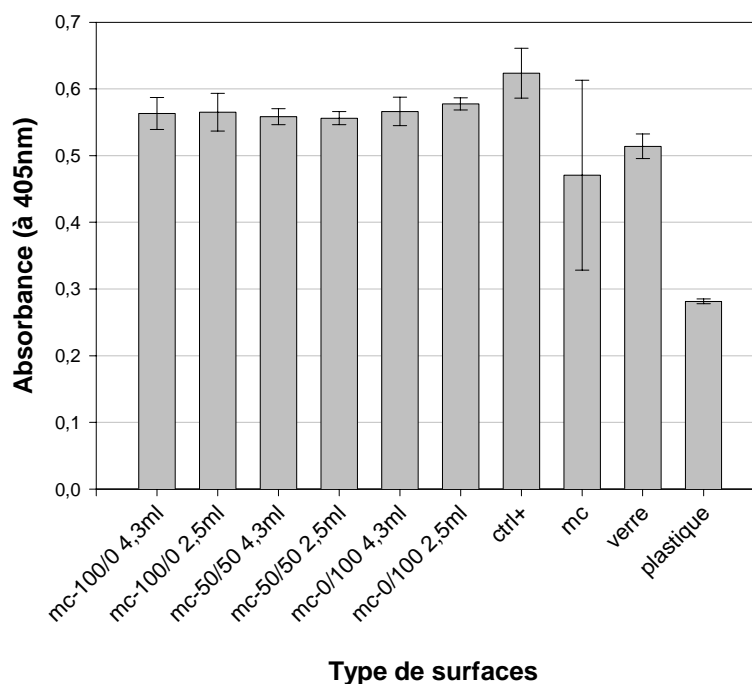


Figure III.18: Mesure par spectrophotométrie (405 nm) de la sécrétion de mélanine par des cellules B16-F1 après 4 jours d'ensemencement sur des constructions de type $(PLl-PGA)_5-PLl-PGA-\alpha-MSH-PLl-PLGA\ x/y-PLl$. Le PLGA est préparé par la méthode du " solvant casting ". Les volumes indiqués (4,3 ou 2,5 mL) correspondent au volume de PLGA coulé dans la boîte de Pétri contenant les lamelles. Le contrôle positif (ctrl +) équivaut à la construction sans PLGA barrière. Le contrôle négatif (noté " mc " pour multicouches) correspond à la construction sans PLGA barrière et en absence de principes actifs enfouis. Les cellules sont ensemencées à une densité de $2,5 \times 10^4$ cellules/mL. Les barres verticales correspondent aux écart-types déterminés sur 3 échantillons identiques.

Selon la figure III.18, le taux de sécrétion de mélanine ne semble pas influencé par le type de PLGA déposé sur le film multicouche. Toutes les conditions aboutissent à un taux de mélanine plus élevé que le taux constitutif visualisé avec les conditions sur verre, sur le film multicouche seul et sur plastique. De plus, ce taux est équivalent aux taux obtenus sans barrière de PLGA (ctrl +) ou suite à l'ajout de $PGA-\alpha-MSH$ libre dans le milieu (donnée non montrée).

La mélanogénèse constitutive des cellules B16-F1 perturbe aussi les résultats puisqu'elle se situe à une absorbance non négligeable de 0,47 dans cet exemple (contrôle négatif noté " mc ") et présente de forts écarts pour chaque expérience indépendante réalisée. Une explication pourrait être la viabilité cellulaire qui diffère selon les conditions ainsi que le passage des cellules (voir paragraphe III.3.7.3.).

Des observations similaires ont été obtenues suite à des études menées avec la construction $(PLl-HA)_{20}-PLl-PGA-\alpha-MSH-PLl-PLGA\ x/y-PLl$

III.3.7.2. Le PGA- α -MSH en question

Suite à ces résultats particuliers, nous avons voulu déterminer l'origine de l'inefficacité apparente des différentes barrières d'où une réponse aspécifique au peptide.

L'exposition éventuelle de la molécule active insérée dans le film multicouche au chloroforme, solvant du PLGA, pourrait constituer une première explication. Le chloroforme pourrait dénaturer l'hormone et la désactiver. Cependant, les cellules présentent une activation continue malgré la présence de barrières de PLGA variées selon la figure III.18. La molécule reste donc toujours active dans le système.

Le PGA- α -MSH pourrait être modifié suite à la stérilisation sous UV réalisée pendant 5 à 20 minutes. Cette étape est néanmoins essentielle avant l'étape d'ensemencement. Elle ne peut être remplacée par une stérilisation à l'éthanol. En effet, l'éthanol n'élimine pas entièrement les virus hydrophiles ainsi que les spores bactériens (Holy et al. 2001). De plus, l'exposition à l'éthanol est connue pour perturber les multicouches (Poptoshev et al. 2004).

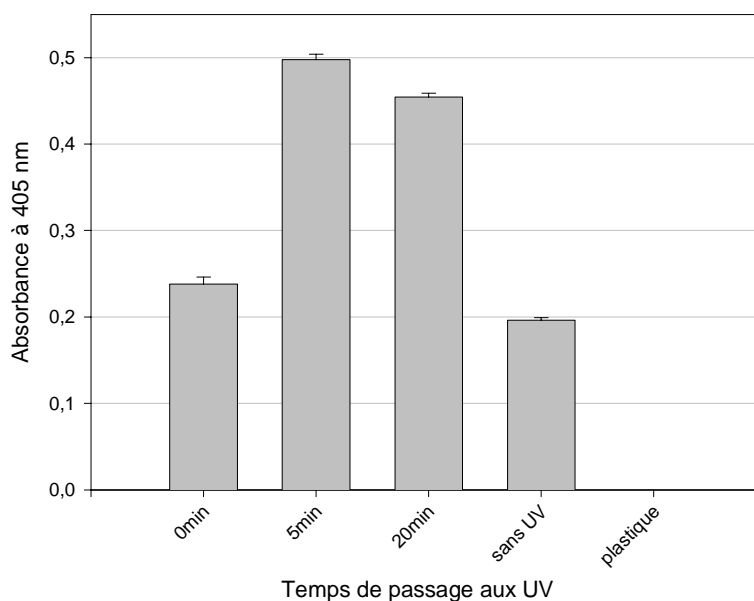


Figure III.19: Effet de la stérilisation aux UV sur le PGA- α -MSH. La stérilisation du milieu contenant le PGA- α -MSH est appliquée sur des temps de 0 (sans UV), 5 et 20 min. Pour la condition " 0 min ", seul le milieu de culture est passé aux UV pendant 20 min. Les cellules B16-F1 sont ensuiteensemencées à une concentration de $2,5 \times 10^4$ cellules/mL. Le dosage de la mélanine dans le surnageant se fait au 4^{ème} jour de culture. Chaque résultat est normalisé pour 10^4 cellules (comptage au bleu de trypan). Les barres d'erreur représentent les écart-types calculés sur 3 échantillons différents.

Selon la figure III.19, il apparaît que les UV ont un effet important sur l'activité du peptide couplé au PGA. L'effet observé correspond à une augmentation nette de l'activité. Les UV

induisent peut-être une rupture homolytique de la liaison entre le PGA et l'analogue de l' α -MSH. L' α -MSH serait plus facilement reconnue par les récepteurs MCRs présents sur les mélanocytes que le PGA- α -MSH. D'autre part, l' α -MSH libre, hydrophobe, pourrait alors diffuser à travers le PLGA et activer les mélanocytesensemencés sur l'édifice.

Pour essayer d'étayer l'hypothèse de la libération de la molécule α -MSH, nous allons imager le système composé de PLGA 100/0 par microscopie confocale. Un des intérêts de l'évaluation de l'activité de l' α -MSH avec les cellules B16-F1 est que ce procédé laisse les cellules parfaitement viables. En effet, les mélanocytes B16-F1 sécrètent la mélanine ce qui permet de doser la mélanine dans le surnageant en laissant intactes les cellules. Il est ensuite possible d'imager ces mêmes cellules par microscopie confocale en utilisant la molécule PGA- α -MSH^{FITC} (PGA- α -MSH dont le peptide α -MSH est couplé à la FITC). Pour ces expériences, une couche de PL ℓ^{Rho} sera déposée sur le PLGA 100/0 afin de délimiter la barrière et de visualiser les cellules puisqu'elles intègrent la PL ℓ^{Rho} en surface du système.

Nous aurions ainsi une explication raisonnable aux activités cellulaires observées qui ne correspondent pas à un comportement attendu selon les études préliminaires de dégradation des films de PLGA. En effet, la couche de PLGA 100/0 n'est normalement pas sujette à une dégradation rapide et donc ne laisse pas accès au film réservoir sous-jacent.

Afin de mener cette étude, une observation à 1 jour a tout d'abord été réalisée (figure III.20).

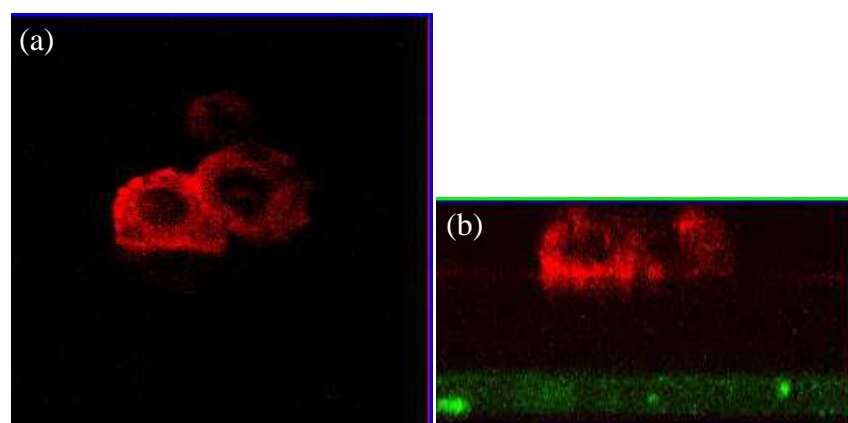


Figure III.20: Observation par microscopie confocale à balayage laser de cellules B16-F1 ensemencées pendant 1 jour sur $(\text{PL}\ell\text{-HA})_{20}\text{-PL}\ell\text{-PGA-}\alpha\text{-MSH}^{\text{FITC}}\text{-PL}\ell\text{-PLGA 100/0-PL}\ell^{\text{Rho}}$ suivant les plans (x,y) (a) et (x,z) (b). Le PLGA est construit par " spray casting " en nébulisant un volume de 1 mL. Les cellules sont ensemencées à raison de 5×10^5 cellules/mL. Les images correspondent à la somme des canaux rouge et vert. L'image horizontale (a) a pour dimension $76,78 \times 76,78 \mu\text{m}^2$. La taille de la section verticale (b) est de $76,78 \times 40,77 \mu\text{m}^2$.

Les cellules apparaissent non marquées en vert mais marquées en rouge suite à l'intégration de la PL ℓ^{Rho} après un jour d'ensemencement. Le PGA- α -MSH^{FITC} n'a donc pas atteint le

surnageant ou les cellules ne sont pas rentrées en contact avec le film réservoir. Cependant la présence dans le film sous-jacent $(PLl-HA)_{20}$ de $PGA-\alpha-MSH^{FITC}$ est matérialisée par le marquage fluorescent vert homogène. Ce marquage vert n'est nullement visible à une autre position de la section du film.

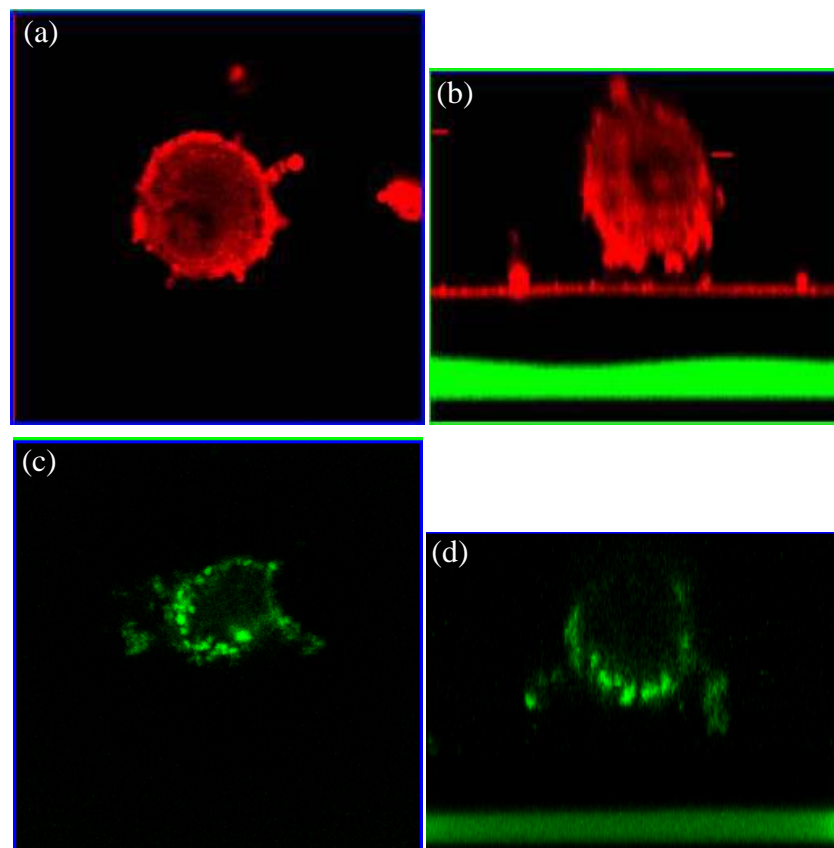


Figure III.21: Observation par microscopie confocale à balayage laser de cellules B16-F1 après 6 jours d'ensemencement sur $(PLl-HA)_{20}$ - PLl - $PGA-\alpha-MSH^{FITC}$ - PLl - $PLGA$ 100/0- PLl^{Rho} suivant les plans (x,y) (a et c) et (x,z) (b et d). Les cellules sont ensemencées à 5×10^5 cellules/mL. Le PLGA est construit par " spray casting " en nébulisant un volume de 1 mL. Les images (a et b) sont composées des canaux rouge et vert alors que les images (c et d) sont composées uniquement du canal vert. Les images horizontales (a et c) ont pour dimension $46,07 \times 46,07 \mu m^2$. La section verticale (b) a pour taille $46,07 \times 38,98 \mu m^2$. La section verticale (d) a pour taille $46,07 \times 35,27 \mu m^2$.

Au 6^{ème} jour de culture, le PLGA ne semble pas avoir subi de dégradation majeure suite à l'ensemencement des mélanocytes. En effet des cellules B16-F1 rouges se distinguent précisément en bordure de la couche de PLGA intacte (figure III.21 (b)). Cependant, si l'on s'intéresse uniquement au canal vert (figures III.21 (c et d)), on s'aperçoit que le cytoplasme des cellules se révèle marqué en vert. Les mélanocytes ont donc intégrés du $PGA-\alpha-MSH^{FITC}$ ou de l' $\alpha-MSH^{FITC}$, ce qui corrobore les résultats du dosage de la mélanine. La surface de

PLGA n'apparaît pourtant pas dégradée par les cellules au bout de ces 6 jours, conformément aux variations de la masse de PLGA 100/0 après 6 jours constatées précédemment (figure III.15). Sur les figures III.21 (b et d), les cellules développent clairement des prolongements cellulaires de type pseudopodes formés par chimiotaxisme qui devraient leur permettre d'accéder à la molécule active. On peut enfin remarquer sur les images la présence au niveau des cellules de zones vertes plus fluorescentes situées aux abords de la membrane plasmique et du côté cytoplasmique. Ces zones semblent correspondre à des vésicules d'endocytose contenant de l' α -MSH^{FITC} ou du PGA- α -MSH^{FITC}.

La molécule active α -MSH^{FITC}, sous une forme qui reste à définir, semble donc avoir la capacité de traverser le PLGA. Ce phénomène pourrait s'expliquer de la manière suivante : si l' α -MSH^{FITC} est bien découplée du PGA hydrophile sous l'action des rayonnements UV, cette molécule devient hydrophobe et beaucoup plus petite. Une diffusion de l' α -MSH est alors envisageable à travers le PLGA jusqu'à la surface. Une objection à cette hypothèse est que le PLGA n'apparaît pas fluorescent dans les images confocale.

Une autre hypothèse peut être considérée. Une dégradation locale peut avoir lieu et permettre le passage des pseudopodes au travers de la couche de PLGA. Cependant nous n'observons pas de pseudopodes qui traversent complètement le PLGA dans les images confocales. Ou le PLGA peut présenter des microfractures qui permettent un contact entre les cellules et le peptide resté dans le film ou libéré du réservoir.

Aux vues de tous ces phénomènes, le PGA- α -MSH ne semble pas constituer un bon modèle pour évaluer l'efficacité du système construit puisqu'il semble diffuser à travers la " barrière " de PLGA ou passer au travers de microfractures du film de PLGA vers les cellules.

III.3.7.3. Comportement des cellules B16-F1 ensemencées sur les constructions

D'autres passages cellulaires des B16-F1 ainsi que des mélanocytes humains ont été testés sur la construction. Les résultats sont identiques. Ainsi, les cellules ne sont pas directement à mettre en cause. Il ne semble pas y avoir de problèmes phénotypiques tels une dédifférenciation ou une sur-activation cellulaire.

Il faut signaler ici un problème latent rencontré lors des expériences avec les mélanocytes murins. Ces cellules sont fragiles en culture. Elles prolifèrent très vite et se décrochent des plaques de culture dès qu'elles ont atteint la confluence. Il faut donc ensemencer les cellules en conséquence pour se trouver à confluence le jour désiré.

En s'appuyant sur des observations en microscopie à fluorescence après marquage du noyau et plus particulièrement de l'ADN au Hoechst et à des tests de viabilité détectant la phosphatase acide, nous avons évalué la viabilité cellulaire sur les constructions s'achevant par PLGA-PL ℓ . Une première expérience a consisté à regarder l'ADN des cellules grâce à la coloration Hoechst, pour essayer de mettre en évidence des faibles viabilités sur les différentes structures (figure III.22).

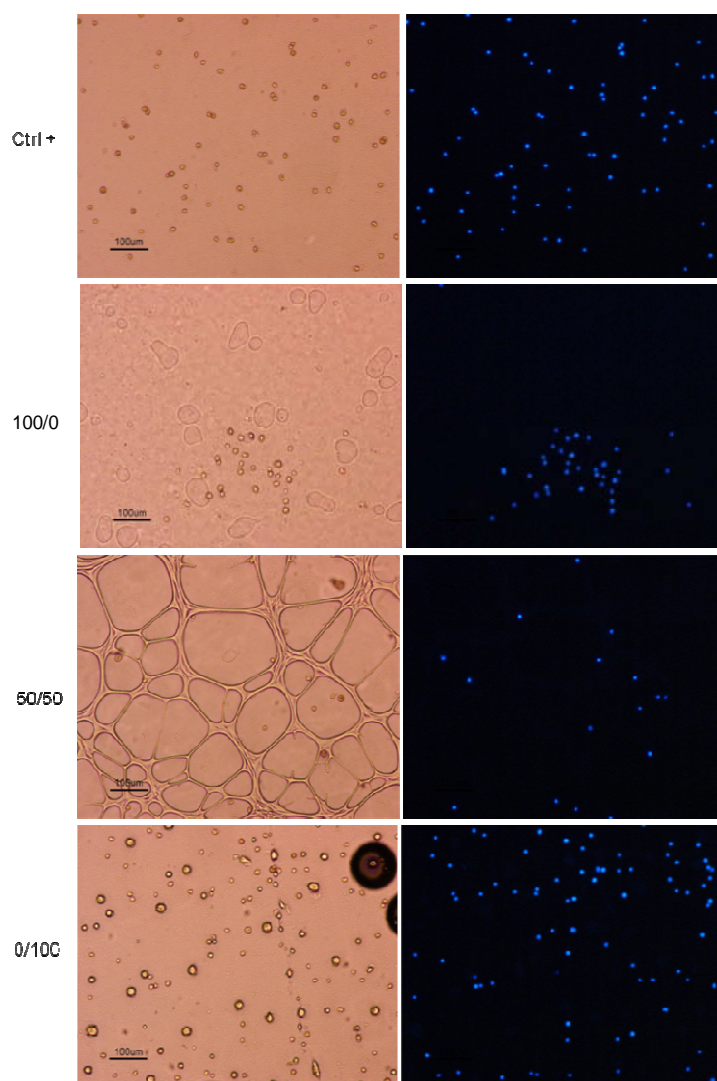


Figure III.22: Observations en microscopie inverse à fluorescence de cellules B16-F1 sur différentes constructions de type $(PL\ell-HA)_{20}-PL\ell-PGA-\alpha-MSH-PL\ell-PLGA\ x/y-PL\ell$ après 5 jours d'ensemencement. Les cellules sont ensemencées à $2,5 \times 10^4$ cellules/mL. Le marquage est réalisé par coloration avec du Hoechst, fluorescent bleu, qui met en évidence l'ADN.

Les différentes dégradations des mélanges de PLGA sont encore clairement mises en évidence grâce aux images en champs claire. Le PLGA 100/0 présente quelques cavités alors que le PLGA 50/50 est très dégradé. Enfin, le film de PLGA 0/100 ne persiste que sous forme de fragments.

Les cellules présentent toujours la même morphologie sur n'importe quelle structure. Elles sont punctiformes avec un noyau pycnotique caractéristique de l'apoptose. Ainsi elles doivent être peu actives suite à l'ensemencement sur les constructions. Les tests de viabilité effectués à 5 jours confortent ces premières observations (figure III.23).

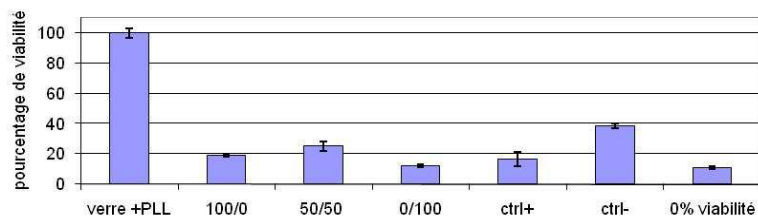


Figure III.23: Test de viabilité à la phosphatase acide des cellules B16-F1 après 5 jours d'ensemencement.

Les cellules sont cultivées sur différentes constructions de type $(PLl-HA)_{20}-PLl-PGA-\alpha-MSH-PLl-PLGA\ x/y-PLl$. Le contrôle positif correspond au film multicouche bioactif sans barrière de PLGA. Le contrôle négatif consiste en une construction complète 100/0 mais sans la molécule active. Enfin le 0 % de viabilité correspond à des cellules ensemencées dans du PBS seul. Les cellules sont ensemencées à $2,5 \times 10^4$ cellules/mL.

Un pourcentage de viabilité de seulement 20 % est mesuré dans le cas de nos systèmes complexes en comparaison aux expériences de référence réalisées sur verre recouvert d'une couche de PLl. Seule la construction $(PLl-HA)_{20}-PLl-PLGA\ 100/0-PLl$ (ctrl-) aboutit à une viabilité de 40 %. Le point commun à toutes ces viabilités faibles est la présence de $PGA-\alpha-MSH$ intégré dans un film multicouche. Or, si les cellules meurent par apoptose ou par nécrose après avoir été activées par l'hormone, la libération de la mélanine résultante à partir du cytoplasme cellulaire va fortement fausser les résultats d'activation correspondant à la sécrétion de mélanine. La présence importante de mélanine dans le surnageant serait alors due à une sécrétion puis à la libération du contenu cytoplasmique dans le surnageant suite à la mort cellulaire.

III.3.7.4. Conclusion des études avec le $PGA-\alpha-MSH$

En conclusion de cette première partie expérimentale, les cellules B16-F1 présentent une viabilité faible sur les divers édifices. Cette faible viabilité et la présence de nombreuses cellules apoptotiques pourraient entraîner des artefacts dans la réponse à la molécule $PGA-\alpha-MSH$. Leur activité constitutive de sécrétion de la mélanine pourrait aussi poser un problème de reproductibilité voire occulter les réactions dues à l'activation par l' $\alpha-MSH$.

Par ailleurs, le $PGA-\alpha-MSH$ active les cellules quelque soit la structure d'ensemencement et le type de barrière de PLGA. Ce phénomène pourrait avoir pour origines soit la dégradation

par les cellules B16-F1 de la barrière de PLGA, soit la présence de fissures dans le PLGA qui permet le passage de pseudopodes, soit enfin le mode de stérilisation de l'édifice. Ainsi, le PGA- α -MSH pourrait être dégradé par la stérilisation UV.

L' α -MSH libérée sous sa forme de tridécapeptide diffuserait alors au travers du PLGA. En effet, la molécule a alors un volume fortement réduit ainsi qu'un caractère hydrophobe qui pourrait favoriser la diffusion. Elle accède ainsi à l'extérieur de l'édifice au niveau des cellules pour les activer.

Des expériences complémentaires en spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier pourraient permettre de détecter la mobilité des molécules actives dans le film multicouche (PL ℓ -HA)₂₀ et de matérialiser leur départ vers les couches supérieures après un traitement aux UV ou non. Une autre expérience pourrait consister à utiliser la forme libre du peptide pour l'insérer directement lors de la construction du réservoir et étudier par la suite la diffusion à travers le PLGA.

III.3.8. Réservoirs fonctionnalisés par le Taxol

III.3.8.1. Choix de la composition en polyélectrolytes du film réservoir

La poursuite de l'évaluation du concept nous a amené à étudier un deuxième système cellulaire. Il doit être plus résistant, moins prolifératif, et avoir une activité cellulaire nette sans contribution d'éventuels artéfacts. Les cellules d'adénocarcinome humain HT29 ont donc été retenues ainsi que la molécule active Taxol® (Tx), un antinéoplasique, pour tester la structure multicouche de polyélectrolytes/barrière de PLGA. La réponse des HT29 ayant internalisé le Tx sera une mort cellulaire en opposition à une prolifération cellulaire si le Tx n'agit pas. Des contrôles " négatifs " où le Tx ne sera pas inséré dans la construction serviront à détecter si le film présente en lui-même une toxicité aux HT29. Le système retenu sera constitué d'un film multicouche à croissance exponentielle PL ℓ -HA recouvert par une couche de PSS comme précédemment décrit dans l'article de Vodouhê *et al.* (Vodouhê et al. 2006). Ce type de film assure une bonne viabilité cellulaire de base et la couche de PSS seule n'a pas d'effet " barrière " marqué. Ce choix a été fait suite à une étude préliminaire dans laquelle différents systèmes de multicouches ont été évalués (figure III.24).

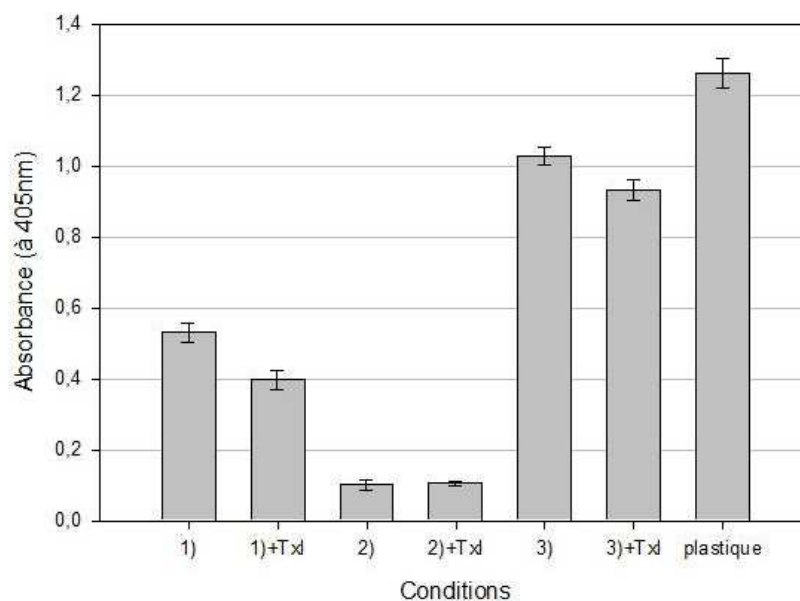


Figure III.24: Test de viabilité des cellules HT29 cultivées sur différents types de films multicouches pour la mise en réserve de Tx. La viabilité est observée à 48 heures par un test à la phosphatase acide. Les conditions sont : 1) $(PL\ell-HA)_{30}$ -+/- Tx-PSS, 2) $(PL\ell-PGA)_5$ -+/- Tx-PGA- $PL\ell$ et 3) $(PAH-PSS)_5$ -+/- Tx-PSS. Les cellules HT29 sontensemencées à 10^5 cellules/mL.

Le test de viabilité figure III.24 donne des informations sur le comportement des cellules HT29 mises en culture sur différents types de multicouches. Les cellules HT29 sont peu viables sur un film constitué des polyélectrolytes $PL\ell$ et PGA (2) qui n'a donc pas été retenu.

En comparaison, le film non biodégradable mais biocompatible PSS-PAH peut paraître intéressant, les cellules HT29 proliférant beaucoup sur cette structure (3). Cependant, la diminution de viabilité observée suite à l'insertion de Tx est faible (10 %). Les films à croissance linéaire donc denses et fins ne peuvent pas stocker autant de molécules que les films à croissance exponentielle qui agissent comme réservoir. Egalement, les cellules ne seront peut-être pas capables d'entrer en contact et d'internaliser la biomolécule contenue dans ce type de film non dégradé.

Le film multicouche $(PL\ell-HA)_{30}$ -PSS (1) semble donc un bon compromis : il permet d'atteindre une viabilité d'environ 50 % par rapport à celle observée sur un support plastique et d'obtenir une diminution de la viabilité de 25 % après intégration du Tx. L'ajout d'un film de PLGA sur la multicouche $PL\ell$ -HA permettra sans doute d'augmenter encore la viabilité avant l'action du Tx puisqu'elle entraînera une rigidification de la surface.

L'intégration de Tx dans le film multicouche $(PL\ell-HA)_{90}$ a été précisément étudiée préalablement par microscopie confocale. Il apparaît que le $Tx^{Green488}$ diffuse dans l'ensemble du film et s'y maintient car la fluorescence causée par le $Tx^{Green488}$ persiste après stockage du

film 4 jours, à température ambiante, dans une solution de NaCl à 0,15 M, pH=7,5. De plus, la multicouche agit comme une éponge pour la molécule active. La concentration finale en Tx dans le film multicouche est bien supérieure à celle de la solution de dépôt (chapitre III.1 et (Vodouhê et al. 2006)).

La construction couche par couche des films de polyélectrolytes constitués de PL ℓ et HA a été suivie par microbalance à cristal de quartz (QCM-D) (figure III.25 (a)). Plus précisément, l'architecture (PL ℓ -HA) $_5$ -Tx-(PSS-PAH) $_2$ est évaluée. La technique de QCM-D permet d'accéder à la masse déposée lors de chaque cycle de la construction couche par couche du film et aussi à la masse ajoutée au film suite au dépôt de la solution de Tx sur le film. Il faut souligner que toutes les études cellulaires sont réalisées avec des films formés de 30 paires de couches PL ℓ -HA et non de 5 comme présenté sur la figure III.25. La technique de QCM-D ne permet cependant pas de suivre la construction d'un film trop épais. Dans le cas des films PL ℓ -HA, il est difficile d'aller au delà de 5 paires de couches. La masse de Tx ℓ déposée sera donc sous évaluée par rapport à celle déposée sur un film (PL ℓ -HA) $_{30}$ -Tx-PSS.

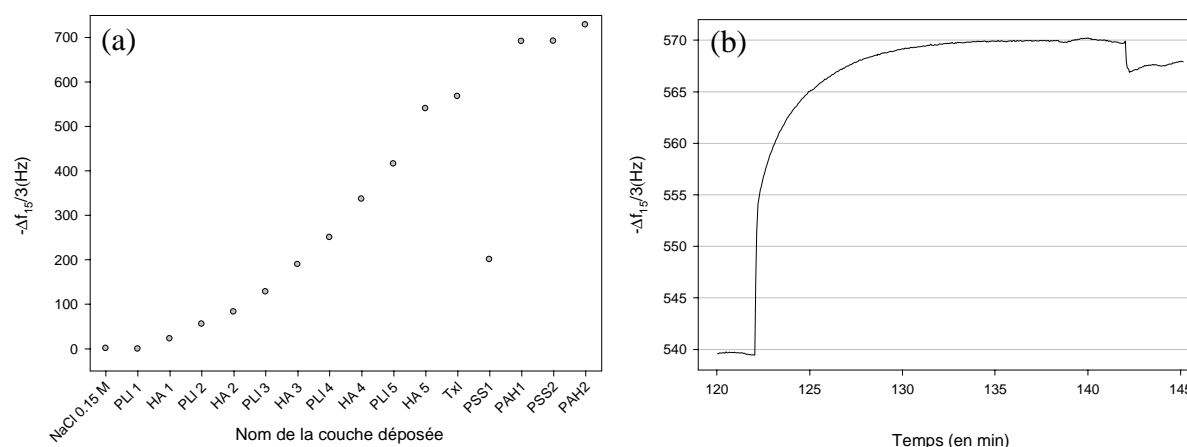


Figure III.25: Incréments des variations de fréquences normalisées ($-\Delta f/\nu$) mesurées à la fréquence de résonance de 15 MHz et obtenues par la technique de QCM-D. (a) : mesures lors de la construction d'un film (PL ℓ -HA) $_5$ -Tx ℓ -PSS. (b) : suivi de la cinétique de dépôt du Tx sur le film (PL ℓ -HA) $_5$. Le Taxol est déposé pendant 20 min à 50 μ g/mL sur la construction.

Les résultats de QCM-D (figure III.25) montrent la construction couche par couche du film (PL ℓ -HA) $_5$ ainsi que la croissance de type exponentielle comme décrits précédemment (Picart et al. 2001; Picart et al. 2002). Quand le film (PL ℓ -HA) $_5$ est mis en contact avec une solution de Tx, la variation du signal de 30 Hz en 20 min semble correspondre à une adsorption du Taxol sur et/ou à l'intérieur du film (PL ℓ -HA) $_5$. L'évaluation de l'épaisseur du film (calculée

suivant le modèle de Voinova (Voinova et al. 1999)) consécutive au dépôt des molécules est présentée sur la figure III.26.

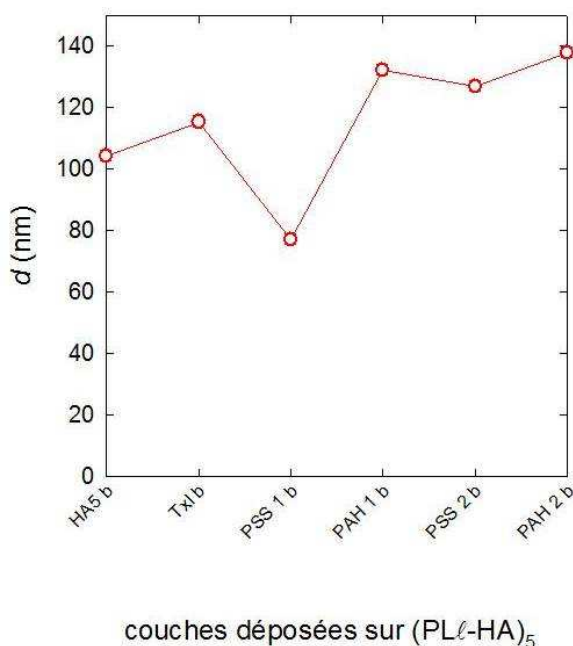


Figure III.26: Evolution de l'épaisseur du film multicouche de structure (PLℓ-HA)₅-Tx-(PSS-PAH)₂ déterminée par QCM-D selon le modèle de Voinova (Voinova et al. 1999).

L'évolution de l'épaisseur du film de 11 nm semble confirmer l'adsorption du Tx sur et dans le film, entraînant une augmentation de son épaisseur. Par contre, l'addition de PSS perturbe la construction, l'épaisseur se réduisant de 40 nm environ. Cette réduction pourrait être due à un échange et/ou une dissolution partielle du film préalablement déposé. Une diffusion de PSS dans la partie haute du film PLℓ-HA peut aussi être envisagée et pourrait alors s'accompagner d'une sortie d'eau du film et donc d'une perte d'épaisseur. Cette capacité du polyélectrolyte PSS à perturber la structure des films multicouches sur lequel il est déposé a déjà été démontrée. Ainsi, la déposition d'un film multicouche PSS-PAH sur un film PLℓ-PGA perturbe fortement la structure (composition en hélices α et feuilletts β) du film sous-jacent PLℓ-PGA (Boulmedais et al. 2003; Zhang et al. 2005). Cependant ces phénomènes ne représentent par une question majeure de la présente étude. Nous avons déjà noté que le PSS ne déplaçait pas de façon détectable le Tx dans les études précédentes et le film reste donc fonctionnalisé par le Tx malgré le dépôt de PSS (Vodouhê et al. 2006).

A partir des mesures de QCM-D, il est aussi possible d'estimer la masse de Tx intégrée dans le film (PLℓ-HA)₅ suite à 20 min de dépôt à une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$. L'estimation est

faite par le biais de la relation de Sauerbrey (présentée chapitre II.2.4.) d'où découle la relation (2):

$$\Delta m_0 = - C \Delta f,$$

où m_0 représente la masse et C une constante de valeur $17,7 \text{ ng/cm}^2\text{Hz}$.

Cette relation s'applique pour un dépôt au contact avec le vide. Il a été démontré qu'elle s'applique également, de façon approchée, à un dépôt solide au contact d'un liquide (Rodahl and Kasemo 1996a).

La masse de Tx est de $492,4 \text{ ng/cm}^2$ soit une répartition des molécules de $3,47 \text{ molécules/nm}^2$ alors que le taux de Tx intégré dans un film de $(\text{PAH-PSS})_5$ par exemple est seulement de $0,66 \text{ molécules/nm}^2$ (valeur déterminée d'après des expériences en QCM-D sur les 3 types de films présentés figure III.23).

Les résultats sont néanmoins à considérer avec une certaine prudence à cause des limites d'utilisation de la relation pour nos architectures utilisées. En effet un film $\text{PL}\ell\text{-HA}$ est viscoélastique alors que la relation de Sauerbrey pour corrélérer la variation de fréquence à la masse n'est exacte que pour des structures rigides. Cependant l'intérêt de l'étude ne porte pas sur l'intégration du Tx dans les réservoirs et nous n'avons donc pas poussé plus loin cette détermination.

III.3.8.2. Test par fluorimétrie de la libération du $\text{Tx}^{\text{Green488}}$ dans la structure $(\text{PL}\ell\text{-HA})_{30}\text{-Tx}^{\text{Green488}}\text{-PSS-PLGA } x/y\text{-PL}\ell$

Du $\text{Tx}^{\text{Green488}}$ est utilisé pour les études en fluorimétrie. La libération du $\text{Tx}^{\text{Green488}}$ à partir des différentes constructions $(\text{PL}\ell\text{-HA})_{30}\text{-Tx}^{\text{Green488}}\text{-PSS}$ recouvertes par du PLGA 100/0, 50/50 et 25/75 et de la $\text{PL}\ell$ peut ainsi être suivie. Les films sont placés dans du milieu de culture MEM pendant 21 jours dans un incubateur à CO_2 .

L'intérêt de la fluorimétrie est de permettre la détection de traces de $\text{Tx}^{\text{Green488}}$ (à partir de 3 ng/mL , voir chapitre III.2.2. p.111 et 112), dans le surnageant avant que la molécule ne soit toxique pour les cultures cellulaires (EC_{50} entre 5 et $10 \text{ }\mu\text{g/mL}$). Le dépôt de $\text{Tx}^{\text{Green488}}$ a été réalisé avec une solution de $5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ qui conduit à une concentration finale dans le film de $250 \text{ }\mu\text{g/mL}$ selon l'isotherme d'adsorption du Taxol figure III.2 p.96.

Les résultats de fluorimétrie sur 21 jours démontrent clairement l'absence de libération de $\text{Tx}^{\text{Green488}}$ durant cet intervalle de temps. Le Tx ne diffuse donc pas hors du film même sur le contrôle positif (sans barrière de PLGA). Le Tx est stocké de façon permanente dans le film multicouche. Par conséquent, si une mortalité cellulaire est constatée, elle ne pourra résulter

que de l'interaction entre les cellules et le film contenant le Tx à une concentration supérieure au seuil de toxicité.

III.3.8.3. Observations en microscopie confocale des cellules HT29 sur le système $(PL\ell\text{-HA})_{30}\text{-Tx}^{\text{Green488}}\text{-PSS-PLGA}_{x/y}\text{-PL}\ell^{\text{Rho}}$

La molécule de $\text{Tx}^{\text{Green488}}$ conserve son activité biologique malgré le marquage avec l'analogue de la FITC (Krouglova et al. 2004). Cette molécule peut donc être utilisée dans le cadre d'expériences en microscopie confocale. L'intérêt est de suivre l'internalisation du Tx par les cellules grâce au marquage fluorescent. La $\text{PL}\ell^{\text{Rho}}$ (fluorescence rouge) est à nouveau déposée sur le PLGA pour délimiter la partie supérieure du film. Les multicouches sont marquées par une coloration verte grâce à la présence de $\text{Tx}^{\text{Green488}}$. De plus, un marquage de l'ADN par la coloration Hoechst (excitation dans l'UV, émission dans le bleu) va permettre de mettre en évidence l'état des noyaux cellulaires et les phénomènes d'apoptose dus au contact avec l'antimitotique. Un des signes d'une cellule apoptotique est un noyau condensé, pycnotique. Il sera alors marqué fortement grâce à la coloration à la bisbenzimidazole (Hoechst). Ce colorant se fixe aux régions riches en bases adénine/thymine dans le petit sillon de l'ADN. Si l'ADN est compacté, le marquage sera plus concentré que dans des cellules viables et proliférant d'une façon normale.

Les cellules HT29 sontensemencées 48 heures à une densité de 5×10^4 cellules/mL pour cette expérience. La coloration Hoechst est réalisée pendant 10 min après une première visualisation des échantillons sans besoin de fixation préalable.

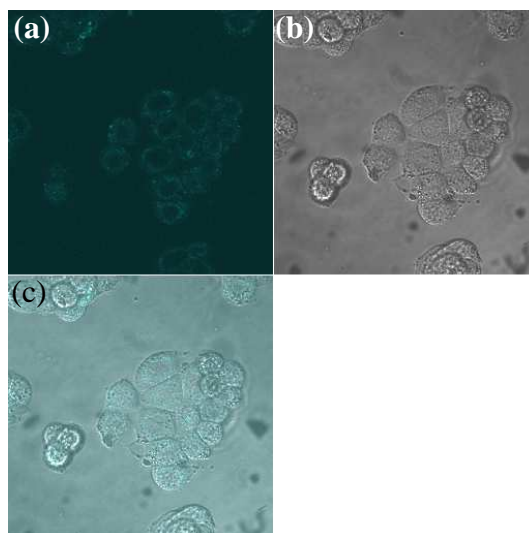


Figure III.27: Observation par microscopie confocale de cellules HT29 cultivées sur une lamelle de verre pendant 48 heures. Les cellules sont marquées en bleu par une coloration au Hoechst. Les images (x,y) ont pour dimension $142,9 \times 142,9 \mu\text{m}^2$. (a) canal bleu sélectionné, (b) champ clair, et (c) sommation des 2 images a et b.

Les cellules semblent correctement étalées sur les surfaces et forment des tapis cellulaires continus comme déterminé sur la figure III.27 correspondant à la culture de cellules HT29 sur une surface de verre contrôle après 48H. Cependant il faut noter ici que la coloration Hoechst marque les membranes cellulaires dans notre cas de figure et non le noyau, ce qui se vérifiera dans toute la suite de l'expérience. Ceci pourrait s'expliquer par un marquage trop faible par la coloration Hoechst à 20 ng/mL. Les cellules ont étéensemencées en parallèle sur différentes architectures de type $(\text{PL}\ell\text{-HA})_{30}\text{-Tx}^{\text{Green488}}\text{-PSS-PLGA } x/y\text{-PL}\ell^{\text{Rho}}$.

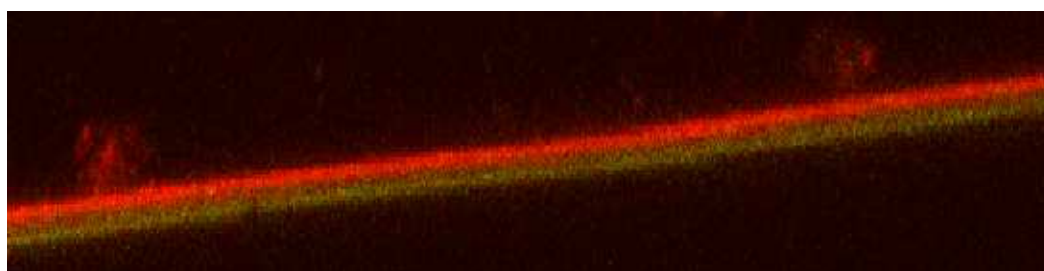


Figure III.28: Observation par microscopie confocale de cellules HT29 cultivées sur un film $(\text{PL}\ell\text{-HA})_{30}\text{-Tx}^{\text{Green488}}\text{-PSS-PLGA } 100/0\text{-PL}\ell^{\text{Rho}}$ pendant 48h. La taille de l'image (x,z) est de $142,86 \times 35,41 \mu\text{m}^2$. La coloration Hoechst n'a pas été visualisée. L'échantillon s'est décollé pendant la première observation qui précède la coloration Hoechst.

Sur l'architecture recouverte d'un film de PLGA de haut poids moléculaire, les cellules HT29 apparaissent sous une coloration légèrement rouge au niveau membranaire et ne présentent aucune trace de fluorescence verte (figure III.28). Elles n'ont donc intégré que la $\text{PL}\ell^{\text{Rho}}$ en

surface mais pas de Tx^{Green488} enfoui dans le film multicouche. D'autre part, comme déjà démontré plus haut, l'intégrité du film de PLGA 100/0 ne semble pas perturbée. Une délimitation nette est notée entre le film multicouche vert et la couche de PL ℓ ^{Rho} rouge recouvrant le PLGA.

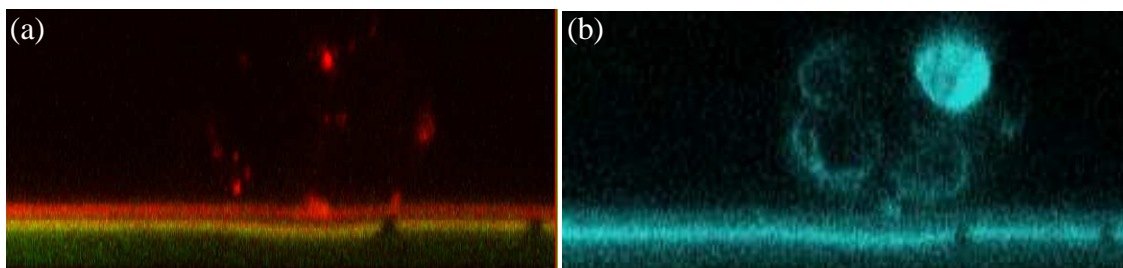


Figure III.29: Observation par microscopie confocale de cellules HT29 cultivées sur un film (PL ℓ -HA)₃₀-Tx^{Green488}-PSS-PLGA 50/50-PL ℓ ^{Rho} pendant 48h. L'image (a) intègre les canaux vert et rouge. En (b), seul le canal bleu est sélectionné. La tailles des images (x,z) est de $71,43 \times 34,07 \mu\text{m}^2$.

Selon la figure III.29, la barrière de PLGA 50/50 n'est pas endommagée après 48 heures de vieillissement. Les cellules n'accèdent pas à la multicouche sous-jacente et n'ont donc pas internalisé de Tx^{Green488}. Cependant, une des cellules est rentrée en apoptose selon le marquage au Hoecht. Ce phénomène n'est pas relié à la construction mais à la localisation de la cellule qui n'est pas en contact direct avec la surface mais qui est positionnée sur d'autres cellules, alors que les HT29 ne peuvent former que des monocouches jusqu'à atteindre la confluence.

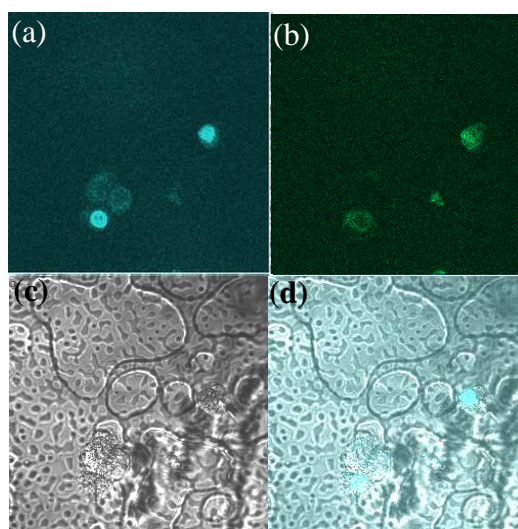


Figure III.30: Observation par microscopie confocale à balayage laser de cellules HT29 cultivées sur un film (PL ℓ -HA)₃₀-Tx^{Green488}-PSS-PLGA 25/75-PL ℓ ^{Rho} pendant 48h. Les canaux bleu (a), vert (b), et en champs clair (c) sont présentés séparément puis additionnés sur l'image (d). Les images (x,y) ont pour dimensions $142,9 \times 142,9 \mu\text{m}^2$.

L'image obtenue en champ clair sélectionné permet de visualiser la surface en PLGA (figure III.30, image (c)). La construction PLGA 25/75 apparaît poreuse et/ou granuleuse après 48 heures. Les cellules se retrouvent alors en contact direct avec le film multicouche et le $\text{Tx}^{\text{Green488}}$ réparti dans l'architecture est internalisé (image (b)). De nombreuses cellules rentrent en apoptose suite à ce contact et présentent un noyau pycnotique, fortement fluorescent lors de la coloration avec du Hoechst (figure III.30, image (a)).

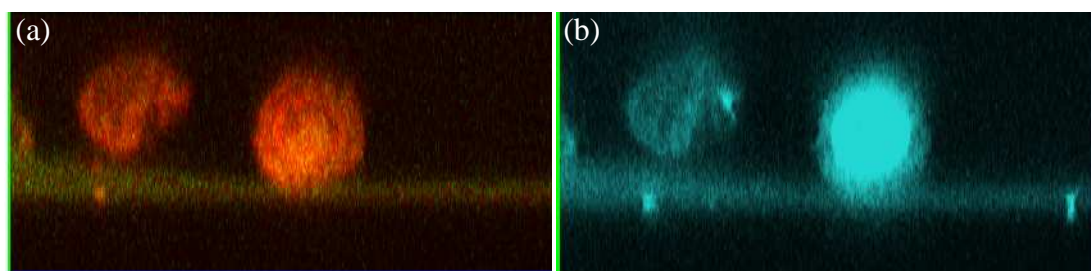


Figure III.31: Observation par microscopie confocale de cellules HT29 cultivées sur un film $(\text{PL}\ell\text{-HA})_{30}\text{-Tx}^{\text{Green488}}\text{-PSS-PLGA 0/100-PL}\ell^{\text{Rho}}$ pendant 48h. Les images (x,z) ont pour dimensions $53,15 \times 27,34 \mu\text{m}^2$. La section (a) montre les canaux vert et rouge. Le canal bleu est sélectionné sur l'image (b).

La figure III.31 montre des cellules HT29ensemencées sur une construction constituée d'une barrière PLGA 0/100 (de bas poids moléculaire). Sur la section (a) intégrant le canal vert et rouge, les cellules sont jaunes suite à l'internalisation de $\text{PL}\ell^{\text{Rho}}$ et du $\text{Tx}^{\text{Green488}}$. A 48 heures, il ne persiste apparemment plus de PLGA et les fluorophores verts et rouges se retrouvent colocalisés. Par conséquent, la viabilité sur cette structure semble faible à 48 heures. La plupart des cellules restantes ont leur noyau marqué fortement par la coloration Hoechst, signe de cellules apoptotiques.

III.3.8.4. Tests de viabilité sur le système $(\text{PL}\ell\text{-HA})_{30}\text{-Tx-PSS-PLGA } x/y\text{-PL}\ell$

Afin de quantifier plus précisément les résultats observés par microscopie confocale, des tests de viabilité par dosage de la phosphatase acide avec le substrat pNPP (para-nitro-phényl phosphate) ont été menés après différents temps d'ensemencement (1, 4 et 7 jours). L'objectif de ces mesures était de préciser le temps au bout duquel la barrière de PLGA n'empêche plus l'accès des cellules aux films multicouches, pour conduire à la mort cellulaire par apoptose suite à l'internalisation du Taxol. Les observations sont faites sur une semaine puisqu'il a été constaté que le film de PLGA 100/0 présentait une certaine rugosité à 7 jours (rugosité moyenne RMS = 150 nm, voir figure III.15) et le temps de 4 jours a été retenu en se basant

sur les expériences présentées paragraphe II.2.13.. Trois types de composition en PLGA ont été testés : 100/0, 50/50 et 25/75. Le film de PLGA 0/100 n'a pas été sélectionné. En effet, aucun résultat n'a pu être obtenu avec le film de PLGA 0/100, celui-ci se morcelant en 1 jour. Les cellules doivent adhérer à cette structure qui se dégrade rapidement. Elles se retrouvent donc dans le surnageant avant d'avoir pu former un tapis cellulaire. Les cellules persistantes qui ont réussi à adhérer au film multicouche sous-jacent sont alors peu nombreuses. Par conséquent, les résultats avec PLGA 0/100 sont difficilement reproductibles du fait de l'étape initiale d'adhésion variable.

Une première détermination de la viabilité cellulaire est réalisée après 24 heures d'ensemencement (figure III.32).

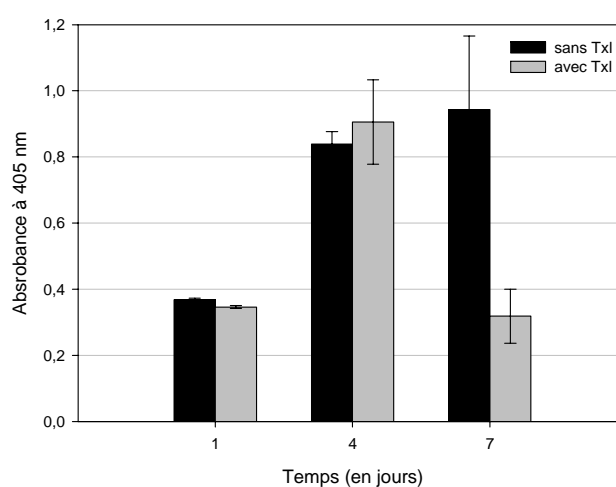


Figure III.32: Activité de la phosphatase acide de cellules HT29 cultivées sur une construction (PL ℓ -HA) $_{30}$ +/-Tx-PSS-PLGA 100/0-PL ℓ . La viabilité est déterminée à 1, 4 et 7 jours dans des conditions sans Tx (barres noires) ou avec Tx (barres grises) adsorbé dans le film. Les cellules sont ensemencées à une densité de 5×10^4 cellules/mL. Le Tx est déposé sur le film (PL ℓ -HA) $_{30}$ à une concentration de $5 \mu\text{g/mL}$. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types déterminés sur 3 échantillons identiques.

Comme indiqué par l'analyse en microscopie confocale au paragraphe précédent, les films de PLGA 100/0 ne présentent pas de signes de dégradation importante sur une période de temps de 4 jours. Ainsi les cellules prolifèrent de façon équivalente sur les constructions contenant ou non du Tx. Au bout d'une semaine de culture, les cellules continuent à proliférer sur la construction témoin (sans Tx) mais subissent les effets du Tx sur les systèmes fonctionnalisés. Les cellules internalisent donc le Tx intégré dans le film (PL ℓ -HA) $_{30}$. L'architecture doit présenter des zones de PLGA dégradées et/ou poreuses permettant une interaction des cellules avec le film de polyélectrolytes fonctionnalisé sous-jacent. On peut donc envisager la

formation de pores permettant aux cellules de communiquer avec le réservoir fonctionnalisé. Cette dégradation du PLGA serait due à l'hydrolyse mais aussi à la culture des cellules HT29 sur la couche de PLGA qui pourrait aussi jouer un rôle non négligeable. Les cellules pourraient ainsi induire une destruction plus rapide du copolymère suite à la libération d'enzymes ou à l'endocytose de fragments de PLGA. Enfin, la dégradation accélérée pourrait aussi être due à un changement du pH du milieu sur une semaine, le milieu n'étant pas renouvelé au cours de l'expérience. En effet, il est connu que la dégradation du PLGA est acide et base-dépendante (voir chapitre I.3.1., (Sykes 1975)). Or il n'a pas été nécessaire de changer le milieu de culture lors de l'expérience en raison du volume de 1 mL utilisé au départ (au lieu des 500 μ L employés habituellement) et de la présence de phénol rouge dans le milieu permettant de constater qu'il n'y avait pas un saut de pH suffisant pour entraîner un changement de l'indicateur coloré.

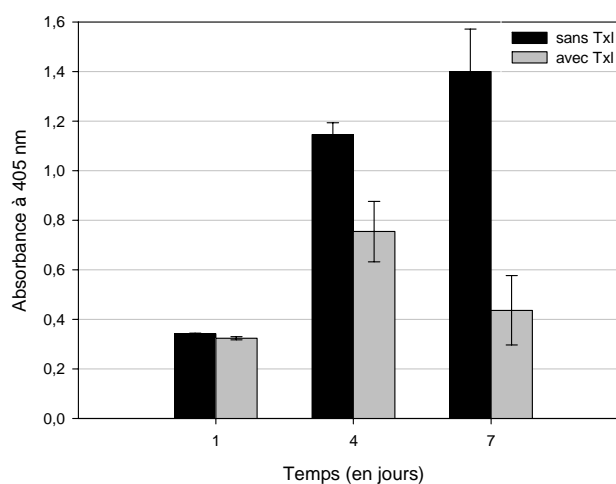


Figure III.33: Activité de la phosphatase acide de cellules HT29 cultivées sur une construction (PLl-HA)₃₀+/-Tx-PSS-PLGA 50/50-PLl déterminée à 1, 4 et 7 jours dans des conditions sans Tx (barres noires) ou avec Tx (barres grises) adsorbé dans le film.

Pour les cellules cultivées sur l'architecture composée d'un film de PLGA 50/50, une différence significative est constatée en comparaison des résultats avec le PLGA 100/0 (figure III.33). Ainsi, à 4 jours de culture, la viabilité cellulaire sur les structures avec Tx est plus faible que celle mesurée sur la structure sans Tx. Le PLGA 50/50 n'agit plus comme une barrière à 4 jours de dégradation. Si une corrélation est faite avec les expériences de détermination de masse et de microscopie confocale, il semblait pourtant que le film de PLGA soit peu dégradé à 4 jours. La dégradation peut être plus importante dans ces expériences du fait de l'ensemencement des cellules sur la surface. Les cellules arrivent à accéder au film au travers de fissures par de pseudopodes soit par des zones découvertes plus étendues. A 7

jours, le processus est encore plus marqué puisque la viabilité cellulaire chute à seulement 30 % de la viabilité mesurée sur des films non fonctionnalisés par le Tx.

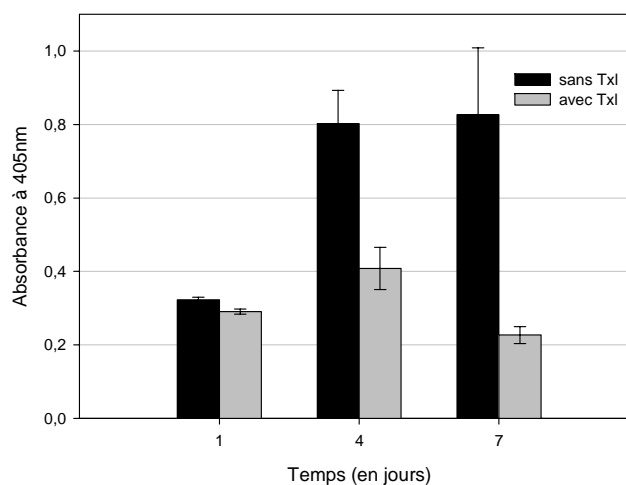


Figure III.34: Activité de la phosphatase acide de cellules HT29 cultivées sur une construction (PL l -HA) $_{30}$ +/-Tx-PSS-PLGA 25/75-PL l déterminée à 1, 4 et 7 jours dans des conditions sans Tx (barres noires) ou avec Tx (barres grises) adsorbé dans le film.

L'intégrité de la couche de PLGA 25/75 est insuffisante pour bloquer l'accessibilité des cellules au film dès le 4^{ème} jour comme avec la barrière de PLGA 50/50 (figure III.34). Cependant, les effets sont plus importants puisqu'une baisse de la viabilité cellulaire de 50 % est observée à 4 jours et la viabilité cellulaire a diminué de 75 % à 7 jours de culture.

III.3.9. Conclusions et perspectives

La figure III.35 permet de faire un bilan précis des réductions de la viabilité cellulaire obtenues avec les différents systèmes fonctionnalisés selon la durée d'ensemencement des cellules HT29.

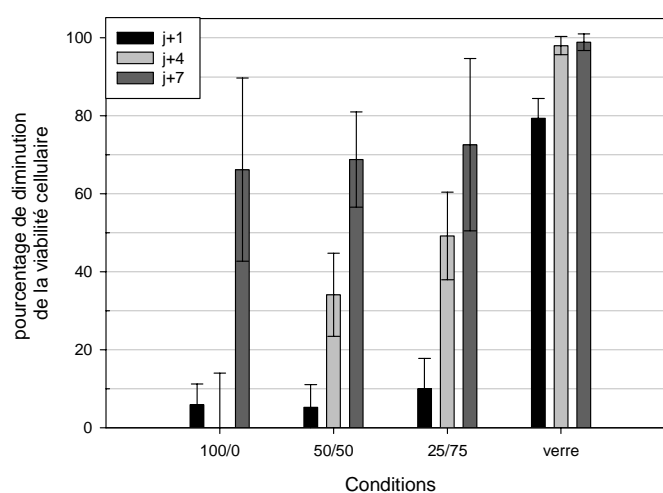


Figure III.35: Pourcentage de diminution de la viabilité cellulaire selon le temps de contact entre les cellules HT29 et les constructions $(PL\ell-HA)_{30}$ -Tx-PSS-PLGA x/y -PL ℓ . Les cellules sont ensemencées à une densité de 5×10^4 cellules/mL. Le Tx est déposé sur le film $(PL\ell-HA)_{30}$ à une concentration de $5 \mu\text{g/mL}$. Les pourcentages de diminution sont calculés en prenant comme valeur de référence (100 %) les cultures sur des constructions $(PL\ell-HA)_{30}$ -PSS-PLGA x/y -PL ℓ sans Taxol aux jours 1, 4 ou 7. Comme contrôle de 0 % de viabilité, les cellules HT29 sont cultivées sur du verre avec un milieu contenant $5 \mu\text{g/mL}$ de Tx1 en solution.

Le mélange de deux poids moléculaires du copolymère PLGA permet de construire des barrières qui se dégradent en des temps variables. Le dépôt d'une telle couche sur un film multicouche de polyélectrolytes réservoir permet de moduler dans le temps l'activité biologique d'une surface fonctionnalisée par une molécule active. Le Taxol, entraînant la mort cellulaire d'adénocarcinomes de côlon HT29, a été choisi ici comme principe actif tandis que le film PL ℓ -HA a été sélectionné pour obtenir des édifices suffisamment épais ce qui permet une charge notable en molécules actives. Les cellules HT29 cultivées sur les différentes constructions film multicouche réservoir-PLGA x/y barrière ont clairement mis en évidence des temps d'internalisation du Taxol qui dépendaient de la composition x/y en PLGA de haut et bas poids moléculaire. En particulier, une augmentation du PLGA de faible

poids moléculaire dans le mélange permet de réduire grandement le temps de dégradation de la barrière de PLGA et donc d'accélérer l'accès au Taxol dans le film réservoir sous-jacent.

Par conséquent, nous avons développé des revêtements de biomatériaux permettant de moduler l'accessibilité des cellules à des principes actifs enfouis, et ainsi nous avons créé un système à activité biologique contrôlée. L'avantage de cette approche résulte de la grande flexibilité de la structure apportée, d'une part, par la méthode de dépôt couche par couche pour construire des films multicouches réservoir et, d'autre part, par les films de mélanges de copolymères.

Notre système se rapproche de celui décrit par le groupe du Professeur P. Hammond (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA) (Wood et al. 2006). Ces auteurs ont mis au point un film multicouche délivrant différentes molécules actives à des temps échelonnés selon leur profondeur d'enfouissement dans le film. Nos constructions peuvent aussi jouer un rôle similaire si le PLGA est recouvert d'un autre film réservoir fonctionnalisé avec un second principe actif. On obtiendrait ainsi un premier réservoir dont les molécules actives seraient directement accessibles par les cellules puis un second réservoir qui serait accessible seulement à la suite de la dégradation du PLGA entre 1 et 7 jours. Ce système de libération contrôlée multifonctionnel pourrait avoir des applications dans le cadre de programmes thérapeutiques complexes.

Une première application potentielle concerne le recouvrement de prothèses vasculaires (*stents* ou vaisseaux artificiels par exemple). Le PLGA pourrait être recouvert d'une couche de PLL-PEG antiadhésive pour empêcher la réaction à un corps étranger dès l'implantation. Ensuite l'édifice agirait en tant que système à libération contrôlée de principes actifs tels le Tx antinéoplasique, le nitroprusside sodique (Thierry et al. 2003a; Thierry et al. 2005) dont l'action est expliquée chapitre I.2.3.4., ou encore le sirolimus immunosuppresseur (*stent* CYPHER®, Cordis Corporation, société Johnson & Johnson) pour empêcher une resténose.

Une autre application dans le domaine cardio-vasculaire et l'ingénierie tissulaire est l'utilisation de facteurs de croissance. Les facteurs de croissance spécifiques des tissus à reconstruire (VEGF, vascular endothelial growth factor par exemple) pourraient favoriser le développement des cellules endothéliales au niveau de la lumière du vaisseau artificiel plutôt que des cellules musculaires lisses (voir paragraphe I.2.3.4.). Ils seraient intégrés dans le réservoir multicouche et libérés à des temps bien définis grâce à la barrière de PLGA.

Une dégradation différée dans le temps des films de PLGA présente un autre avantage. Après l'implantation, une réaction inflammatoire apparaît rapidement qui empêche la régénération tissulaire. Après 2 jours d'implantation, le phénomène est moins important et des cellules

commencent à coloniser l'implant. Ainsi, dans des modèles animaux avec des *stents* implantés, la ré-endothélisation débute 2 à 7 jours après implantation (Swanson et al. 2003). Il serait donc intéressant de libérer seulement après ce laps de temps le VEGF afin de favoriser la ré-endothélisation. Un film de PLGA adapté pourrait permettre le contrôle d'une telle libération.

La stratégie développée par Grayson *et al.*, présentée chapitre III.3.3., basée également sur le PLGA, n'est pas comparable à la présente approche (Grayson et al. 2003). En effet, les molécules intégrées dans les puits scellés par du PLGA sont libérées de manière pulsatile au cours de la dégradation du système ce qui permettra de maintenir une concentration stable dans le corps malgré le métabolisme des molécules actives. Un tel résultat pourrait être atteint par notre approche en utilisant les nanoparticules (Gref et al. 1994; Ravivarapu et al. 2000). Ainsi, si plusieurs types de nanoparticules étaient injectés avec des compositions de différents mélanges de PLGA entourant des multicouches réservoirs, la molécule active intégrée dans le réservoir pourrait être libérée petit à petit. Le film multicouche permettrait ici l'intégration de n'importe quel type de molécules. On obtiendrait alors un allongement de la durée de vie de la molécule dans l'organisme. Ce système de libération prolongée ("sustained release device") de médicaments pourrait se concevoir pour différents traitements chroniques, par exemple : le traitement à l'insuline pour le diabète de type I, le traitement par des psychotropes dans le cas de la schizophrénie, ou encore les traitements hormonaux.

III.4. Films multicouches PL-PGA construits à partir de mélanges d'énantiomères des polyélectrolytes PL et PGA : étude par dichroïsme circulaire

III.4.1. Chiralité des molécules

Les films multicouches de polyélectrolytes peuvent être construits avec des mélanges de polyanions et/ou de polycations au lieu d'un composé unique pour chacun des deux types de polyions (Leporatti et al. 2001; Hübsch et al. 2004). Dans ce cas, les différents polyélectrolytes dans les mélanges sont incorporés simultanément dans la multicouche lors de chaque étape de dépôt successif. Les propriétés des films résultants sont alors modulables en variant les proportions des différents polycations ou polyanions des mélanges en solution (Hübsch et al. 2004).

Après enfouissement de la protéine A dans un film multicouche de polypeptides cationiques et anioniques, tous deux d'énantiométrie *d*, une disparition complète de l'activité biologique du film est observée contrairement à l'activité inflammatoire importante obtenue avec des films formés des énantiomères *l* de ces mêmes polypeptides (Jessel et al. 2003). L'activité biologique du film poly(lysine)-poly(acide glutamique) (PL-PGA) peut être ainsi modulée dans le temps en utilisant des mélanges d'énantiomères *l* et *d* à différents ratios. Des films multicouches de polyélectrolytes sont réalisés à partir d'une solution composée d'un mélange polycationique de poly(*l*-lysine), PL l , et de poly(*d*-lysine), PL d , et d'une solution composée d'un mélange polyanionique de poly(acide *l*-glutamique), PGA l , et de poly(acide *d*-glutamique), PGA d . Le ratio l/d des nombres de monomères est identique dans les deux solutions de polypeptides ainsi que le poids moléculaire de chaque espèce de polypeptides. Il est démontré que l'activité cellulaire (production d'IL-10 (interleukines 10) par des monocytes) est induite par la protéine A seulement sur des films constitués à partir de solutions contenant plus de 50 % d'énantiomères *l* et qu'elle devient maximale quand la composition des solutions dépasse 80 % en énantiomères *l* (Benkirane-Jessel et al. 2005).

Cependant, aucune corrélation n'a été établie entre la réponse biologique et la composition intrinsèque du film en énantiomères, qui semble ne pas suivre la composition des solutions. En effet, dans le cas des mélanges, plusieurs études démontrent que la composition du film multicouche de polyélectrolytes n'est pas similaire à celle des solutions de polyélectrolytes

utilisées. Ainsi Sui et Schlenoff ont construit des multicouches sensibles au pH en alternant le PSS (poly(styrène sulfonate) et un mélange de PDADMA (poly(diallyldiméthylammonium)) et d'un copolymère de diallyldiméthylammonium et d'acide acrylique à faible pH. Ils ont constaté une incorporation préférentielle du copolymère par rapport au PDADMA dans le film (Sui and Schlenoff 2003). En utilisant un mélange polyanionique de poly(acide *l*-lactique) (PLA) et de PGA ℓ , Debreczeny *et al.* ont mis en évidence l'incorporation préférentielle du PLA par rapport au PGA ℓ lors de la construction couche par couche (Debreczeny et al. 2003).

Dans un film de type PAH-PSS/ADN simple brin, il a été prouvé que l'intégration de PSS était favorisée quand les polyions étaient dissouts dans une solution de NaCl, mais qu'une augmentation de l'incorporation d'ADN dans le film multicouche était obtenue avec une solution d'éthanol/eau (20/80 v/v) (Quinn et al. 2004).

D'autre part, une séparation entre deux molécules chirales : l'acide *l*-ascorbique et l'acide *d*-ascorbique a été réalisée en utilisant comme membrane de séparation des films multicouches composés de PL ℓ -PGA ℓ ou de PL d -PGA d (Rmaile and Schlenoff 2003). Aucune sélectivité n'a été obtenue si les multicouches sont formées uniquement de polyélectrolytes optiquement inactifs. Ceci prouve que les films PL ℓ -PGA ℓ ou PL d -PGA d ont des affinités différentes.

Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons à la composition finale d'un film multicouche construit à partir de solutions de (PL d_x , PL ℓ_{1-x}) et (PGA d_x , PGA ℓ_{1-x}), où x est la proportion en monomères des énantiomères d . Le poids moléculaire de chaque polyélectrolyte est proche de 45000 Da.

Le film PL ℓ -PGA ℓ est un film à croissance exponentielle en épaisseur où les deux espèces de polyélectrolytes diffusent " dans " et " hors " du film (Lavalle et al. 2004a). La PL ℓ interagit avec le PGA ℓ non seulement par des interactions électrostatiques mais aussi en formant des structures secondaires de type feuillet β (Boulmedais et al. 2002). Ces structures se retrouvent dans les films multicouches (PL d -PGA ℓ) $_n$. Cependant l'épaisseur de ces films évolue plus lentement avec le nombre de paires de couches, n , que celle des films (PL ℓ -PGA ℓ) $_n$ en sachant que la PL ℓ et la PL d ont des poids moléculaires proches de 30000 Da environ (Boulmedais et al. 2003). Ceci suggère une différence d'interaction entre la PL ℓ et le PGA ℓ comparativement au couple PL d et PGA ℓ .

L'objectif de l'étude présentée ci-dessous consiste à étayer cette hypothèse et à vérifier s'il existe des affinités différentes entre les polyélectrolytes selon leur chiralité.

III.4.2. Résultats obtenus par QCM-D

L'évolution de l'épaisseur des films PL-PGA en fonction de la composition des solutions de polyélectrolytes en énantiomères ℓ et d est déterminée par QCM-D avec la méthode de Voinova (Voinova et al. 1999). La figure III.36 montre que l'épaisseur du film $(PGA d_x, PGA \ell_{1-x} - PL d_x, PL \ell_{1-x})_6$ passe par un minimum situé à $x = 0,5$ et est maximale pour $x = 0$ et $x = 1$, c'est-à-dire pour des films constitués exclusivement d'énantiomères ℓ ou d respectivement (Benkirane-Jessel et al. 2005). Ainsi, il s'avère que l'épaisseur des films est sensible à la composition des mélanges servant à les construire. L'évolution de l'épaisseur, $L(x)$, avec la teneur des solutions en énantiomères d peut être grossièrement approximée par une équation du second degré en x :

$$L(x) = L_0 + bx(x - 1),$$

où L_0 est l'épaisseur pour $x = 0$ et $x = 1$, soit 70,4 nm, et b une constante (117 nm). Il peut être utile de souligner que la superposition d'une parabole symétrique par rapport à $x = 0,5$ aux points expérimentaux repose implicitement sur les hypothèses que i) les interactions ℓ - ℓ et d - d sont de même intensité (même épaisseur en $x = 0$ et $x = 1$), ii) que les interactions ℓ - d sont différentes des interactions ℓ - ℓ et d - d (épaisseur minimale en $x = 0,5$) et iii) que l'épaisseur correspondant à x devrait être égale à l'épaisseur correspondant à $1 - x$.

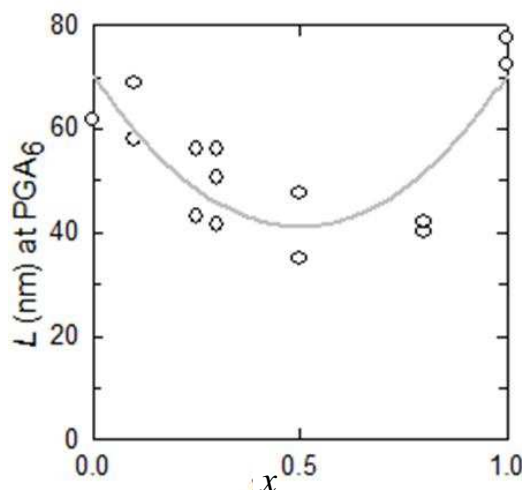


Figure III.36: Evolution de l'épaisseur du film $(PGA d_x, PGA \ell_{1-x} - PL d_x, PL \ell_{1-x})_6$ en fonction de la teneur x en énantiomères d des solutions de mélanges de polyélectrolytes déterminée par QCM-D.

Tous les commentaires donnés ci-dessus rapportaient l'épaisseur à x , c'est-à-dire à une caractéristique des solutions d'énantiomères utilisées pour construire le film. Il serait toutefois plus intéressant d'établir la relation entre l'épaisseur des films et leur composition propre dont

il est impossible d'affirmer *a priori* qu'elle est identique à celle des solutions. Il nous a donc semblé opportun d'examiner la composition des films en énantiomères l et d en comparaison de celle des solutions.

III.4.3. Mesures par dichroïsme circulaire

III.4.3.1. Corrélation entre la composition en énantiomères des mélanges et la composition du film multicouche

Le dichroïsme circulaire est une technique de spectroscopie d'absorption sensible au degré de symétrie d'un chromophore. Dans le cas des protéines, les chromophores sont les liaisons peptidiques entre 190 et 250 nm.

Ici, le dichroïsme circulaire (DC) permettra de déterminer la composition relative des films en énantiomères l et d (voir paragraphe II.2.9.). En effet, la méthode des combinaisons linéaires des structures pures permet la quantification des énantiomères présents au sein des multicouches des polyélectrolytes.

Selon la figure III.37, le spectre de DC d'une solution d'énantiomères d ($x = 1$) est symétrique du spectre d'une solution d'énantiomères l du même polyélectrolyte ($x = 0$), quelle que soit la nature du composé (PL ou PGA).

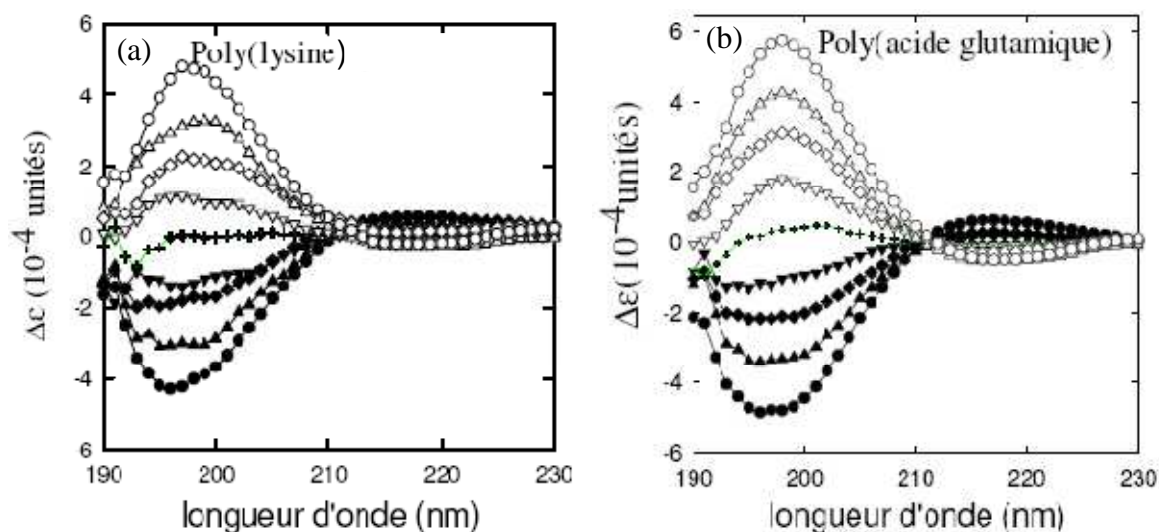


Figure III.37: Spectres de DC ($\Delta\epsilon$) pour différentes valeurs de x dans une solution de (PLd_x, PLl_{1-x}) (a) ou une solution de $(PGAd_x, PGAl_{1-x})$ (b) : $x = 0$ (●); $x = 0,12$ (▲); $x = 0,25$ (◆); $x = 0,33$ (▼); $x = 0,5$ (+); $x = 0,67$ (∇); $x = 0,75$ (◇); $x = 0,88$ (Δ); $x = 1$ (○).

Les spectres $f_s(x)$ des solutions mixtes se situent entre les deux spectres limites correspondant à $x = 0$ et $x = 1$. Ils peuvent être exprimés par la combinaison linéaire des spectres des solutions pures en ℓ , soit $f_s(x = 0)$ et pures en d , soit $f_s(x = 1)$, suivant l'équation :

$$f_s(x) = (1 - \alpha)f_s(x = 0) + \alpha f_s(x = 1)$$

où α est un paramètre compris entre 0 et 1.

Selon les spectres de DC, les énantiomères ℓ et d ne semblent pas interagir dans les solutions de polycations ou de polyanions ou leurs interactions sont suffisamment faibles pour ne pas affecter les spectres.

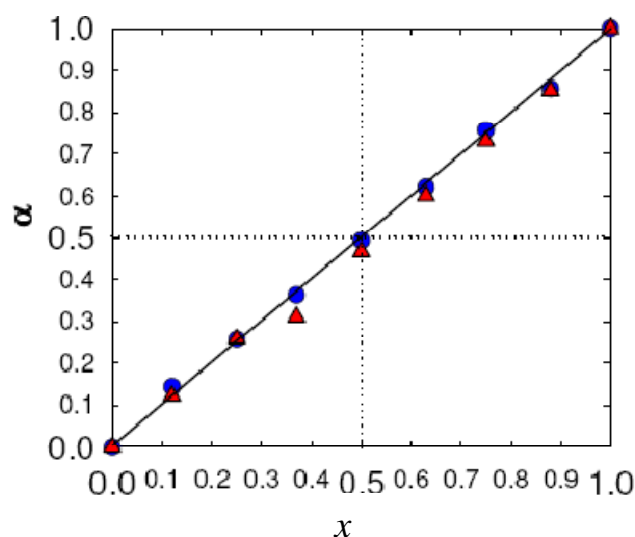


Figure III.38: Evolution du paramètre α en fonction de x pour les différentes solutions de polyelectrolytes.

● correspond à la solution $(PL\ell_{1-x}, PLd_x)$ et ▲ correspond à la solution de $(PGA\ell_{1-x}, PGAd_x)$

L'évolution de α en fonction de x pour les solutions de PL et de PGA est présentée sur la figure III.38. La régression linéaire s'adapte parfaitement aux résultats expérimentaux en solution et conduit à $\alpha = x$.

A la suite de ces expériences de contrôle, les spectres de DC des films $(PGAd_x, PGA\ell_{1-x}-PLd_x, PL\ell_{1-x})_6$ ont été mesurés (figure III.39).

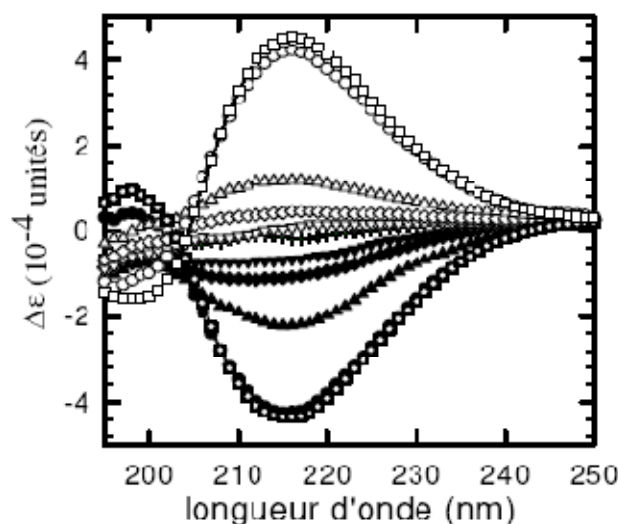


Figure III.39: Spectre de dichroïsme circulaire de films $(PGAd_x,PGA\ell_{1-x}-PLd_x,PL\ell_{1-x})_6$ pour différentes valeurs de x : $x = 0$ (○ et ●); $x = 0,12$ (◐ et ◑); $x = 0,25$ (◒ et ◓); $x = 0,33$ (◔ et ◕); $x = 0,5$ (⊕); $x = 0,67$ (∇); $x = 0,75$ (◇); $x = 0,88$ (Δ); $x = 1$ (o et □).

Là encore, le spectre du film $(PGAd-PLd)_6$ où $x = 1$ est symétrique du spectre caractérisant le film $(PGA\ell-PL\ell)_6$ pour lequel $x = 0$, et les spectres des mélanges se situent dans le domaine délimité par les spectres des films exclusivement formés à l'aide d'énantiomères ℓ ou d , que nous appellerons " films purs ". Cependant les spectres de ces films ne peuvent s'exprimer seulement comme une combinaison linéaire des spectres relatifs aux solutions de $PGA\ell$ et de $PL\ell$ (ou de $PGAd$ et de PLd). Cette observation est à relier à la formation de nouvelles structures secondaires dans le film lors de la construction couche par couche. Il a été démontré précédemment que les polyélectrolytes $PGA\ell$ ou $PL\ell$ présentaient des structures en coudes et des hélices α à $pH = 7,4$ et interagissaient entre eux en formant des feuilletts β intermoléculaires et des hélices α (Boulmedais et al. 2003). Or, ces structures organisées affectent les spectres de dichroïsme circulaire entre 180 et 240 nm et sont mises en évidence par DC. Ainsi, le DC permet par exemple de remarquer les changements drastiques de structure durant le processus de repliement des protéines (Kelly and Price 2000). L'apparition de feuilletts β suite à la construction du film multicouche PL-PGA et la variation du taux d'hélices α expliquent le déplacement des extrema normalement observés en solution ainsi que l'apparition d'un signal avec un extremum vers $\lambda = 200$ nm. (Figure 8 (Kelly and Price 2000)). Les extrema des spectres de DC dans les solutions devraient correspondre à la forme en hélice α et se retrouvent ainsi décalés de $\lambda = 197$ nm à $\lambda = 215$ nm pour les films, où l'extremum résulte alors de plusieurs types de structures organisées (hélice α , feuillet β , coudes...) et non seulement des hélices α . Cependant, le but de cette étude n'est pas de

déterminer la composition exacte des films en hélices α , feuillets β et en structures aléatoires. De plus, les peptides synthétiques sont en général de mauvais modèles pour définir un spectre de référence pour une structure secondaire.

Pour les spectres de DC des films obtenus à partir des mélanges d'énantiomères, une combinaison linéaire des spectres des films purs en ℓ , soit $f_m(x=0)$, et purs en d , soit $f_m(x=1)$, et non plus des spectres des solutions, $f_s(x)$, peut être utilisée pour ajuster les résultats expérimentaux. L'intensité des spectres est proportionnelle à l'épaisseur des films qui est déterminée au préalable par QCM-D. Par conséquent, il faut introduire un facteur correctif dans la relation linéaire. Les différents spectres peuvent donc se décrire par une somme pondérée d'une composante ℓ et d'une composante d :

$$f_m(x) = \frac{L(x)}{L_0} [(1-\alpha)f_m(x=0) + \alpha f_m(x=1)]$$

où $L(x)$ représente l'épaisseur du film correspondant à x (confère la parabole sur la figure III.35 paragraphe III.4.2.) et L_0 l'épaisseur pour $x=0$ ou 1 , soit 70,39 nm.

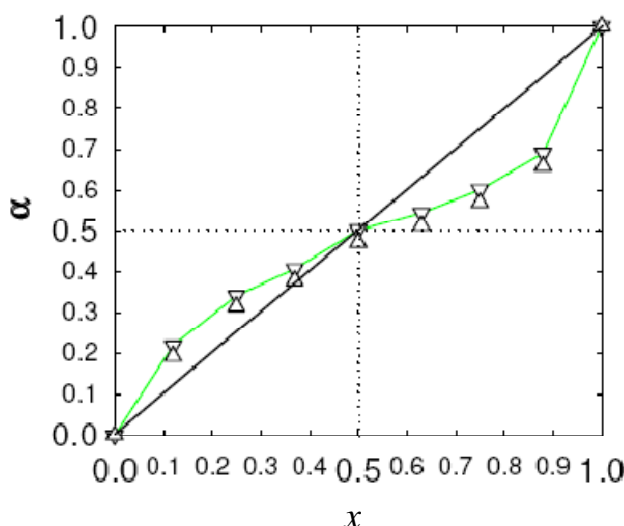


Figure III.40: Evolution du taux α d'énantiomères d dans les films $(PGAd_x, PGA\ell_{1-x}-PLd_x, PL\ell_{1-x})_6$ en fonction de x , la proportion d'énantiomères d présents dans les solutions de mélanges de polyélectrolytes. La droite correspond à $\alpha = x$. Les 2 symboles Δ et ∇ correspondent à 2 manipulations indépendantes.

La figure III.40 représente l'évolution du paramètre α (taux d'énantiomères d dans le film) en fonction de la proportion x en énantiomères d dans les solutions. La valeur de α tend à s'approcher de 0,5 quand un mélange d'énantiomères est utilisé pour former le film. Plus précisément, quand $x > 0,5$ alors $0,5 < \alpha < x$, et quand $x < 0,5$ on obtient $0,5 > \alpha > x$. Lors de la construction du film multicouche de polyélectrolytes, il y aurait donc une tendance à la

racémisation des énantiomères de polyélectrolytes, ce qui signifierait une incorporation préférentielle dans le film de l'espèce qui est minoritaire dans les solutions.

En observant à nouveau la figure III.39, on remarque que ce phénomène se traduit par une forte diminution des aires sous les courbes (notées AUC) représentative des spectres de DC des mélanges quand x croît de 0 à 0,12 ou décroît de 1 à 0,88. Ainsi, dès que x est différent de 1 ou 0, la composition en énantiomères d'un film mixte tend à se rapprocher de celle d'un film racémique auquel correspondrait idéalement un spectre plat d'ordonnée nulle sur la figure III.39.

Ces résultats pourraient expliquer les variations d'activité biologique constatées avec des films contenant la protéine A (Benkirane-Jessel et al. 2005). L'activité des monocytes stagnait malgré l'augmentation du taux d'énantiomères l , biodégradables, tant que le taux x d'énantiomères d en solution, restait supérieur à 0,2 (figure III.41).

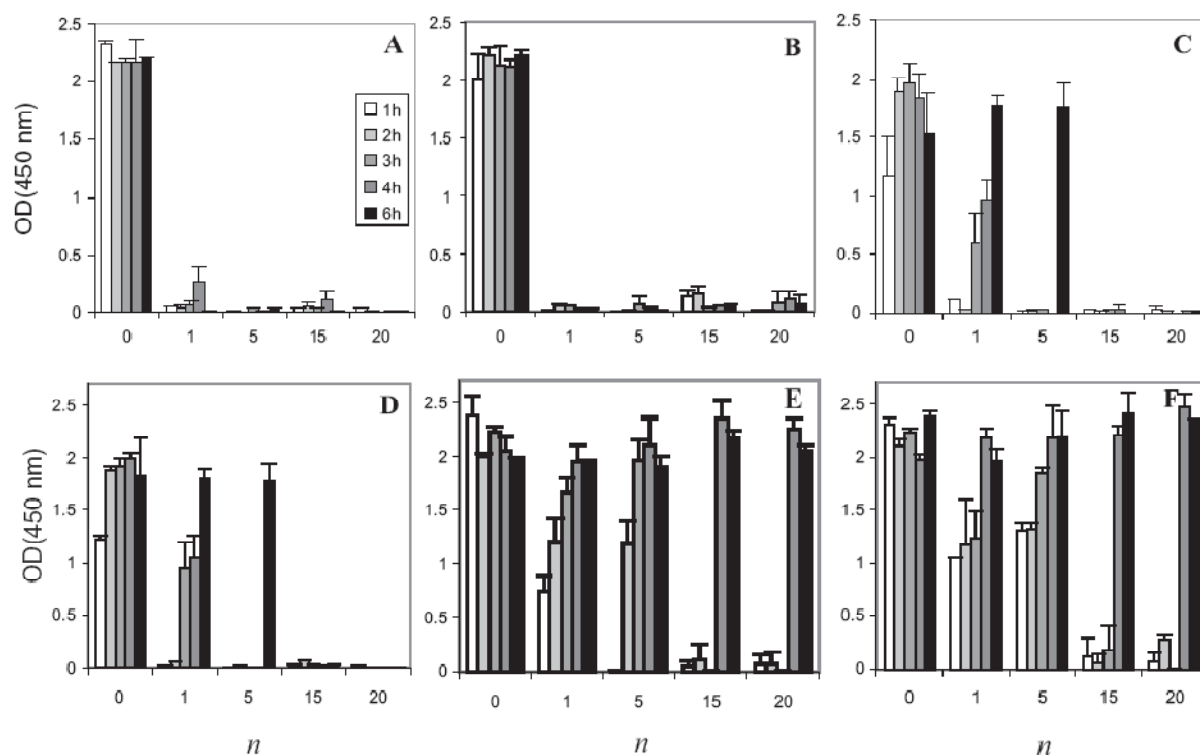


Figure III.41: Sécrétion de TNF- α par les macrophages cultivés sur des films ($PLd_x, PLl_{1-x}-PGAd_x, PGA l_{1-x}$)-Protéine A- $(PLd_x, PLl_{1-x}-PGAd_x, PGA l_{1-x})_n$ -PL avec A) $x=100\%$, B) $x=50\%$, C) $x=40\%$, D) $x=30\%$, E) $x=20\%$ et F) $x=10\%$. Les cellules sont incubées 1, 2, 3, 4, ou 6 heures. Les différents types de films sont : $n=0$, $n=1$, $n=2$, $n=5$, $n=15$, et $n=20$. La hauteur de chaque barre correspond à l'absorbance à 450 nm, moyenne de 2 manipulations indépendantes. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

La présente étude montre que la composition du film en énantiomères d tend à rester proche de 0,5 jusqu'à ce que x devienne inférieur à 0,2. Le contenu en espèces ℓ dans le film augmente sensiblement seulement quand x continue à tendre vers 0, ce qui permet la dégradation du film par les monocytes et leur activation par la protéine A enfouie.

Une hypothèse pour expliquer cette adsorption préférentielle pourrait être que l'interaction entre deux polyélectrolytes de nature énantiomérique opposée est plus forte que l'interaction entre polyélectrolytes de même nature.

Nous allons maintenant vérifier si un phénomène d'échange entre les deux énantiomères d'un même polyélectrolyte existe et si celui-ci conduirait à une racémisation dans le film. L'échange découlerait alors d'une différence d'affinité dans un couple polyanion-polycation selon la chiralité de ces molécules.

III.4.3.2. Mise en évidence de l'échange entre les énantiomères ℓ et d de PL et PGA

Pour mettre en évidence d'éventuels phénomènes d'échanges, des films PEI-(PGAd_x,PGA ℓ_{1-x} -PLd_x,PL ℓ_{1-x})₆ ou PEI-(PGAd_x,PGA ℓ_{1-x} -PLd_x,PL ℓ_{1-x})₅-PGAd_x,PGA ℓ_{1-x} sont construits sur des surfaces de quartz. Après avoir déterminé leur spectre en DC, les films sont placés dans des solutions du même polyélectrolyte que celui constituant la couche finale, mais d'énantiométrie opposée (ou égale lorsqu'il s'agit d'une expérience " témoin "). La cinétique d'échange est déterminée sur une durée allant jusqu'à 22 jours. Les mesures de DC permettent d'obtenir les spectres présentés sur la figure III.42.

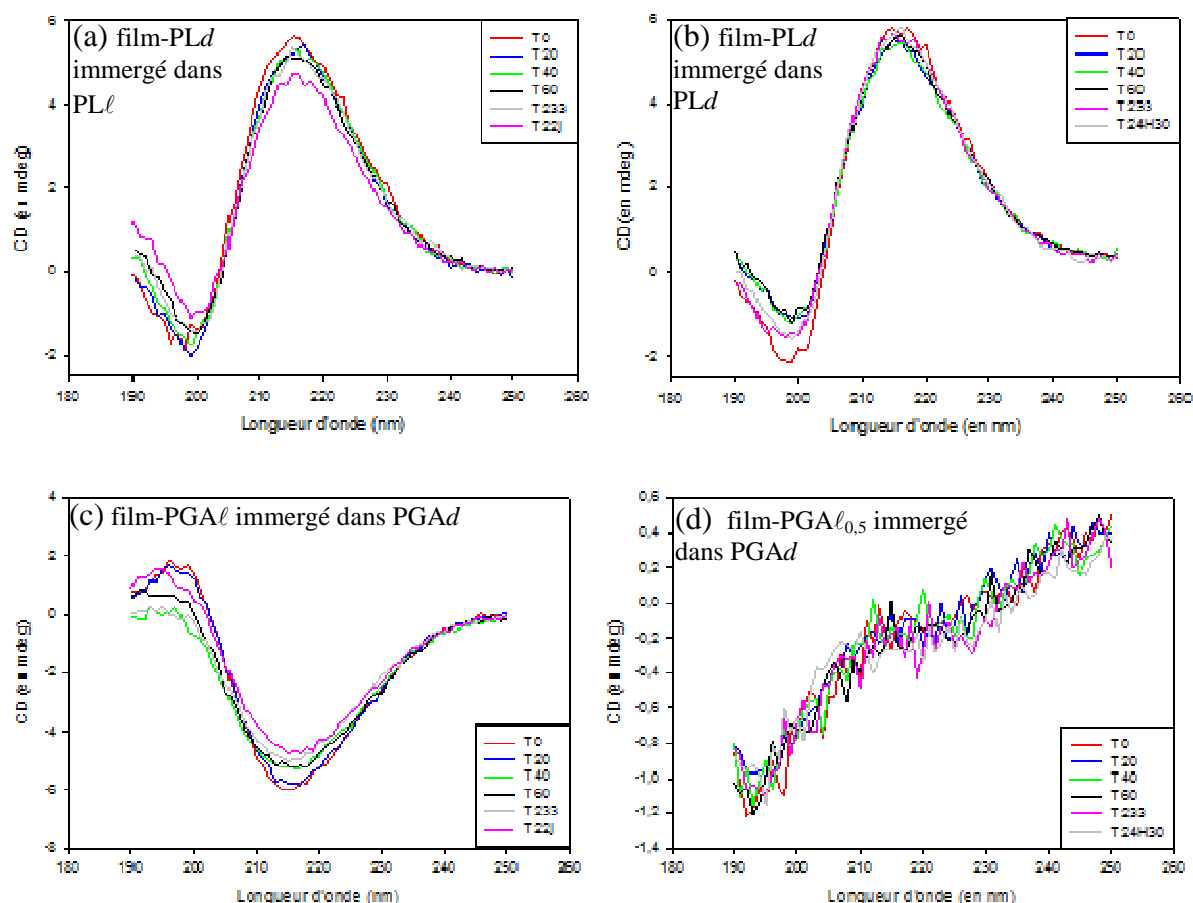


Figure III.42: Cinétique d'échange de polyélectrolytes d'énantioméries similaires ou opposées suivie par dichroïsme circulaire. Les films multicouches sont immergés dans une solution de polyélectrolytes d'énantiométrie égale ou opposée à l'énantiométrie des polyélectrolytes constituant la couche terminale du film : (a) PEI-(PGAd-PLd)₆ immergé dans PLℓ (b) PEI-(PGAd-PLd)₆ immergé dans PLd (comme témoin), (c) PEI-(PGAℓ-PLℓ)₅ immergé dans PGAd et (d) PEI-(PGAd_{0,5},PGAℓ_{0,5}-PLd_{0,5},PLℓ_{0,5})₅-PGAd_{0,5} immergé dans PGAd.

Les aires sous les courbes (AUC) sont déterminées entre $\lambda = 205$ et $\lambda = 225$ nm, afin de mettre en évidence d'éventuelles différences engendrées par l'échange et d'éviter de prendre en compte le spectre causé par la présence de feuillets β dont l'extremum se situe en dessous de 200 nm (figure III.43 (a)).

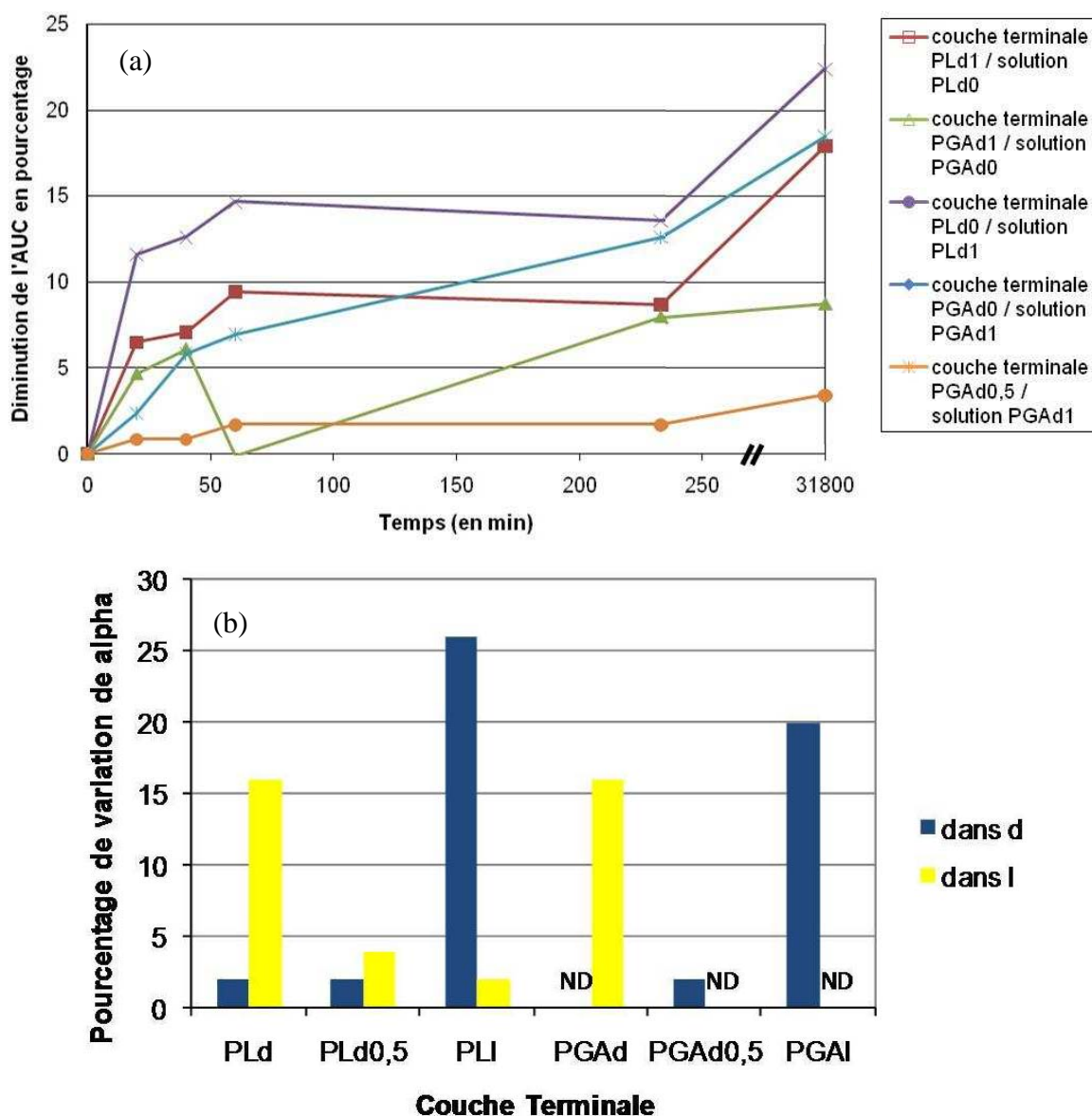


Figure III.43: Evolution des AUC de spectres de dichroïsme circulaire (a) et de α (b) de films multicouches immergés dans des solutions de polyélectrolytes sur une durée de 22 jours. Les films sont de type PEI-(PGAd_x,PGA_{l_{1-x}}-PLd_x,PL_{l_{1-x}})₆ soit PLd_x en couche terminale ou PEI-(PGAd_x,PGA_{l_{1-x}}-PLd_x,PL_{l_{1-x}})₅-PGAd_x,PGA_{l_{1-x}} soit PGAd_x en couche terminale.

Les contrôles " témoin " ayant pour couche finale PLd immergée dans une solution de PLd (figure III.42 (b)) ou PLl immergée dans une solution de PLl restent stables d'un point de vue spectre de DC. Les AUC restent donc constantes. Par conséquent, les AUC pour ces différentes conditions ne sont pas représentées figure III.43 (a), celles-ci restant stables. Pour les films PEI-(PGAd_{0,5},PGA_{l_{0,5}}-PLd_{0,5},PL_{l_{0,5}})₅-PGAd_{0,5}, le fait de les placer dans PGAd ou PGAl modifie peu l'allure du spectre de DC (et inversement avec PL_{l_{0,5}} en couche finale,

trempe dans $PL\ell$ ou PLd) (figure III.43 (a)). La valeur de α résultante ne varie pas de façon significative en 22 jours (figure III.43 (b)).

Le fait de placer le film pur d terminé par PLd dans une solution pure de $PL\ell$ entraîne une diminution de l'AUC du spectre de DC du film pur d (figure III.42 (a)). Pour des films purs ℓ terminé par $PL\ell$ et immergé dans une solution pure de PLd , une diminution est aussi observée. Cet échange se produit également dans le cas des polyélectrolytes PGA. Une diminution des AUC est constatée lors de l'immersion de films dans une solution de polyélectrolytes de chiralité opposée au polyélectrolyte constituant la couche terminale du film. Par conséquent, il existerait bien un échange de polyélectrolytes possible qui tendrait vers une racémisation dans la composition énantiomérique des films multicouches de polyélectrolytes.

Dans la figure III.39, nous avons noté qu'un fort amortissement des AUC était induit par un mélange en énantiomères avec $x \geq 0,88$ ou $x \leq 0,12$. Cependant, une détermination de α est nécessaire afin d'éviter des erreurs d'interprétation. En effet, une forte diminution de l'AUC observée sur les spectres de DC, de 72,5 % pour des films mixtes avec $x = 0,88$, et de 50,6 % pour $x = 0,12$, correspond à une variation de α de 41,2 % ou 16,9 % respectivement (figure III.40).

Ainsi α varie de 16 % suite à l'échange d'énantiomères d ($x = 1$) du film par des énantiomères ℓ de la solution pendant 22 jours alors qu'il varie de 26 % si un film pur ℓ ($x = 0$) est immergé dans une solution d'énantiomères d pendant le même temps (Figure III.43 (b)). Ces différences semblent significatives d'un échange potentiel de polyélectrolytes chiraux mais elles sont déterminées après un processus d'échange de 22 jours alors qu'un film se construit par étapes de 5 minutes généralement. Ces différences ne permettent donc pas de conclure catégoriquement sur un réel échange des énantiomères vers une racémisation du film ($d-d$ vers $\ell-d$ ou $\ell-\ell$ vers $\ell-d$).

Néanmoins, ces premières expériences permettent de penser qu'un échange entre les polyélectrolytes de chiralité opposée existe. Il y aurait donc une affinité plus élevée entre un polycation d'une espèce chirale et le polyanion de chiralité opposée comparativement à l'affinité d'un couple avec la même énantiométrie. Ces résultats doivent cependant être complétés et étayés, basés sur des études en DC sur les films mixtes en énantiomères.

III.4.4. Discussion et perspectives

Au stade actuel, nous avons uniquement réalisé des expériences sur les films purs ℓ et d ou avec $x = 0,5$ pour étudier l'échange énantiomérique. En effet, nous espérons qu'un film construit avec des énantiomères d et immergé dans une solution de polyélectrolytes ℓ nous permettrait d'observer de fortes variations comparables à celles des figures III.39 et III.40 dès que x est différent de 1. Cependant, seules de faibles variations de α ont été mises en évidence.

Selon nos résultats préliminaires, il y aurait pourtant une tendance vers un enrichissement dans le film de l'énantiomère minoritaire en solution, aboutissant à la racémisation en formes ℓ et d . Des échanges entre polyélectrolytes de même nature mais de chiralité opposée pourraient en être à l'origine. Ainsi, pour des films avec $x = 0,5$, α ne semble pas évoluer en présence de solutions de PL d ou PL ℓ , alors que α est modifié suite au contact prolongé des films purs ($x = 1$ ou $x = 0$) avec des solutions de polyélectrolytes d'énantiométrie opposée à l'énantiométrie des polyélectrolytes constituant la couche terminale des films.

Des expériences en dichroïsme circulaire restent à mener sur des films mixtes en énantiomères immergés dans une solution pure en énantiomères opposés ou dans une solution mixte pour confirmer ces premiers résultats. L'objectif serait de démontrer l'échange préférentiel de polyélectrolytes selon leur chiralité afin d'obtenir des films racémiques en énantiomères ℓ et d . Cependant le phénomène est lent puisqu'il faut 22 jours d'expérience pour obtenir 16 à 26 % de variation sur α en partant d'un film pur où $x = \alpha = 1$ ou $x = \alpha = 0$. Il faut noter que ce phénomène d'échange n'est donc pas comparable à celui qui a lieu lors de la construction où les dépôts successifs se font en 5 minutes et où une construction complète est réalisée en 5 heures environ.

La QCM-D pourrait nous permettre d'évaluer en temps réel le phénomène d'échange lors de la construction couche par couche de films mixtes en énantiomères. Deux expériences seraient à mener. Il faut réaliser la même expérience d'échanges qu'en DC sur des films mis en contact avec des solutions de polyélectrolytes de même nature mais d'énantiométries opposés que les polyélectrolytes placés en couche terminale. La détermination en QCM-D pourrait consister en une augmentation de $-\Delta f/\nu$, donc de la masse du film, suite à l'apport de polyélectrolytes de charge et d'énantiométrie opposé aux polyélectrolytes déposés en couche finale. En effet, si l'affinité entre les polyélectrolytes est très différente, nous aurions alors

nous seulement un échange mais aussi une masse de polyélectrolytes supplémentaire dans le film.

D'autre part, il serait intéressant de déterminer les interactions différentes entre PL et PGA selon leurs énantioméries égales ou opposées. Lors de la construction couche par couche, une sélection directe des polyélectrolytes d'énantioméries minoritaires en solution a lieu qui tend vers une racémisation du film. De plus, selon la figure III.36, l'épaisseur du film, obtenue par des expériences en QCM-D, est plus importante à $x = 0$ et $x = 1$ qu'à $x = 0,5$. L'architecture des films racémiques semble donc être structurée différemment que celle des films purs. Les interactions entre les polyélectrolytes d'énantioméries opposées seraient plus fortes que celles entre des polyélectrolytes de même nature chirale et pourraient alors expliquer cette différence de structuration. D'un point de vue énergétique, l'intégration de polyélectrolytes d'énantioméries opposés serait donc favorisée et aboutirait à une racémisation.

Des expériences de microcalorimétrie pourraient être aussi envisagées afin de déterminer si les changements d'enthalpie lors de la complexation varient selon les polyélectrolytes chiraux placés en solution (Laugel et al. 2006).

Chapitre IV : Les films multicouches comme biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire : induction du tissu osseux à partir de cellules souches et de facteurs de croissance incorporés dans des films multicouches

*Pemp munud yec'hed a ra vad d'un den klañv.
(Cinq minutes de santé font du bien au malade.)*

Chapitre IV : Les films multicouches comme biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire : induction du tissu osseux à partir de cellules souches et de facteurs de croissance incorporés dans des films multicouches

IV.1. Résultats obtenus par les travaux précédents et objectifs

Lors de mon travail de thèse, un autre projet consistait à améliorer la fonctionnalité de biomatériaux implantables en leur conférant la capacité de stimuler leur environnement biologique, c'est-à-dire en les rendant " bioactifs ", par l'intermédiaire de revêtements adaptés.

Les travaux entrepris au sein de l'unité INSERM 595 dirigée par J.-C. Voegel ont pour ambition essentielle de développer des assemblages à activité anti-inflammatoire, antibactérienne, anticancéreuse voire anti-métastatique destinés au recouvrement de biomatériaux. La construction d'assemblages de polyélectrolytes représente une voie originale dans le développement d'interfaces fonctionnalisées, une des thématiques principale actuelle du laboratoire. Les assemblages de polyélectrolytes se construisent par adsorptions alternées de polyélectrolytes de charges opposées (polycations et polyanions). Cette construction est simple à réaliser et s'adapte à n'importe quelle surface, quelles que soient la topologie et la forme du substrat. Ces assemblages constituent une trame dans laquelle peuvent être incorporés des particules, des macromolécules, des protéines ou des peptides. Par exemple il a été montré que des peptides couplés à la poly(*l*-lysine) et inclus ou exposés à la surface d'assemblages de polyélectrolytes conservent leur biofonctionnalité (Chluba et al. 2001).

Grâce à cette technologie, l'activité proinflammatoire de la protéine A, une protéine membranaire de *staphylococcus aureus* déclenchant la réaction inflammatoire mais ayant aussi d'autres activités biologiques (antitumorale, anticarcinogénique (Ray et al. 2000), antifongique (Srivastava et al. 1997), antiparasite (Ghose et al. 1999)) a été conservée suite à son enfouissement dans un assemblage de polyélectrolytes (Jessel et al. 2003). Le peptide α -MSH à activité anti-inflammatoire conserve aussi son activité suite à l'intégration dans un film multicouche (Benkirane-Jessel et al. 2004a; Schultz et al. 2005).

Cependant, toutes les molécules actives ne s'intègrent pas automatiquement dans un film multicouche (molécules hydrophobes, apolaires...). Les cyclodextrines sont des molécules organiques qui présentent dans ce cadre de nombreux avantages: (i) elles possèdent une cavité

hydrophobe qui peut encapsuler des molécules, (ii) on peut leur appliquer des modifications chimiques sélectives et insérer des groupes fonctionnels variés tant au bord primaire qu'au bord secondaire, et (iii) leur production peut se faire à l'échelle industrielle (Frömring and Szejtli 1994). Les cyclodextrines (CD) et leurs dérivés sont employés pour augmenter la solubilité aqueuse, le taux de dissolution et la biodisponibilité des médicaments lipophiles. Les CD ont une structure en tore avec ses groupements hydroxyles hydrophiles orientés vers l'extérieur. Ainsi elles présentent une surface hydrophile et une cavité interne hydrophobe où des principes actifs hydrophobes vont pouvoir se complexer. Les cyclodextrines forment donc des complexes d'inclusion avec toutes sortes de molécules organiques et sont déjà utilisées pour la mise au point de systèmes de transport et de solubilisation de médicaments, plus précisément de molécules thérapeutiques peu solubles en milieu aqueux, avec des modes d'administration très variés (Irie and Uekama 1999). La solubilité du Taxol est augmentée de 99000 fois par complexation avec des cyclodextrines (Loftsson and Brewster 1996). Plus la solubilité de la molécule active dans l'eau est faible, plus l'augmentation de la solubilité relative suite à la complexation avec les CD est importante. De nombreuses formulations pharmaceutiques contiennent des cyclodextrines dont le Mopral® (oméprazole, inhibiteur de la pompe à protons) ou le Brexin® (piroxicam, un anti-inflammatoire).

L'utilisation des cyclodextrines ouvre de nombreuses perspectives dans le domaine thérapeutique, notamment dans l'élaboration d'interfaces bioactives utilisables en thérapie génique et en diagnostic (O'Keeffe et al. 1997). Bien qu'elles permettent d'encapsuler ou de greffer en surface un facteur biologique actif et ainsi de le protéger et de le libérer de façon contrôlée, les cyclodextrines n'ont jamais été utilisées dans des interfaces fonctionnalisées à visée thérapeutique. Ce type d'association devrait protéger les molécules bioactives d'une dégradation enzymatique rapide et, par conséquent, générer une réponse plus stable dans le temps. Ces résultats prometteurs permettent, non seulement d'envisager l'application de cette technique à la réalisation de revêtements bioactifs, mais aussi, dans une certaine mesure, d'anticiper les complications médicales qui peuvent résulter de l'implantation d'un élément exogène.

Dans le cadre des films multicouches de polyélectrolytes, il est donc envisageable d'utiliser les CD lors de la construction tout en profitant de leur fonction de complexant chimique. Un dérivé de la β -cyclodextrine monocarboxylée sera utilisé dans cette étude noté cCD.

Du lipopolysaccharide bactérien (LPS) a déjà été inséré dans des films multicouches PL ℓ -PGA après complexation avec de la β -cyclodextrine (Jessel et al. 2004). La présence de cCD

permet la conservation de l'activité inflammatoire du LPS qui seul interagit avec la poly(*l*-lysine) et devient de ce fait inactif. De plus, le contrôle de la vitesse d'action de la protéine est possible en enfouissant plus ou moins le complexe dans la multicouche. Les cellules atteignent plus ou moins rapidement la protéine et la sécrétion résultante en TNF- α (Tumoral Growth Factor- α), une cytokine pro-inflammatoire, est donc différée selon l'endroit où a été placé le LPS. Une meilleure stabilité de la réponse dans le temps est ainsi obtenue.

De façon similaire, le piroxicam, un anti-inflammatoire non stéroïdien, conserve son activité dans des films multicouches PL ℓ -PGA grâce aux complexes piroxicam/cCD (Benkirane-Jessel et al. 2004b) et une modulation de la réponse est réalisée en enfouissant l'anti-inflammatoire plus ou moins profondément dans le film multicouche. De l'ADN a aussi pu être intégré et servir pour le transfert de gènes. Le transfert se trouve potentialisé grâce à l'immobilisation de l'ADN (Jessel et al. 2006). Enfin, un antagoniste du lipide A a été intégré avec de la cCD pour créer un système qui antagonise l'activité du LPS (Gangloff et al. 2006). L'utilisation de ces assemblages multicouches-cCD est très prometteuse du fait de leur non toxicité. De plus, leur structure permet d'associer des molécules actives soit par encapsulation, soit par greffage covalent (multi-fonctionnalisation). Ce type d'association devrait protéger les molécules bioactives d'une dégradation enzymatique rapide et par conséquent générer une réponse plus stable dans le temps. Les objectifs spécifiques sont : (i) de produire des polyélectrolytes ou des cyclodextrines fonctionnalisés, par couplage covalent des polyélectrolytes à un peptide anti-inflammatoire ou par encapsulation des médicaments dans la cavité hydrophobe de la cyclodextrine ; (ii) d'incorporer ces constructions dans des films de polyélectrolytes; (iii) de caractériser ces assemblages *in vitro* et *in vivo* selon le médicament incorporé soit pour leur effet anti-inflammatoire, leur capacité à inhiber l'invasion cellulaire tumorale ou encore l'induction de la différenciation cellulaire.

La mise au point de ces revêtements bioactifs et la maîtrise de leur bioactivité pourraient alors constituer un outil modulable et adapté aux exigences spécifiques de la plupart des matériaux implantables. Du point de vue clinique, ces nouveaux matériaux devraient permettre une diminution du taux d'échec des implantations et une réduction du temps de guérison et d'immobilisation des patients. Grâce à cette stratégie, les implants ne seraient plus seulement utilisés comme support mécanique, mais également comme des systèmes à libération contrôlée de médicaments (" drug delivery systems ").

La régénération tissulaire s'appuie en général sur trois facteurs : les cellules, les matrices et les facteurs de croissance. Le contingent cellulaire peut aussi bien inclure des cellules primaires, progénitrices, voire des cellules souches. Les différents types cellulaires sont alors évalués en termes de développement, de différenciation et de prolifération. Les matrices, quant à elles, sont déterminantes, car elles doivent à la fois permettre la différenciation et une prolifération structurée. D'autre part, différentes macromolécules ont été utilisées seules et/ou en association : le collagène, du poly(acide lactique) ou du poly(acide glycolique), voire certains polymères biodégradables comme les acides hydrocinnamique ou lactique ou des polysaccharides.

Il est cependant très difficile de bien contrôler les fonctions cellulaires uniquement par voie physico-chimique par le biais du support ou de la matrice, et l'apport de facteurs de croissance bio-inducteurs est souvent très utile. Des facteurs tels que le facteur dérivé des plaquettes (PDGF) (Gaismaier et al. 2005), le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) (Bau et al. 2004) ou du fibroblaste (FGF-2) (Stevens et al. 2004) ont été employés pour favoriser la régénération tissulaire.

L'ingénierie tissulaire consiste, par ces différents moyens, à faciliter la formation de nouveaux tissus à partir de cellules différenciées voire de cellules souches adultes pour remplacer idéalement des organes déficients ou inopérants, notamment le cartilage.

Vis-à-vis des cellules résidentes, le biomatériau doit permettre à la fois l'attachement, la migration cellulaire à la surface puis à l'intérieur de la structure, puis la prolifération et la différenciation cellulaires. Il doit également fournir un environnement propice au maintien du phénotype cellulaire et à l'activité synthétique des cellules (Drury and Mooney 2003; Goessler et al. 2004) tout en apportant si possible un effet biologique afin de permettre une synthèse matricielle accélérée et de bonne qualité. De ce fait, ce biomatériau doit répondre à un cahier des charges strict : il doit être non toxique, biocompatible, biodégradable, posséder une bonne porosité et permettre une bio-intégration avec le tissu environnant. Au cours du processus de réparation, le biomatériau devrait être capable de se dégrader en même temps que la matrice se forme pour lui céder la place et finalement aboutir à une reconstruction d'un néo tissu (sans traces résiduelles du biomatériau).

Plus spécifiquement, l'os et le cartilage font partie des rares tissus du corps à ne pas pouvoir se régénérer complètement. Ainsi l'os ne se régénère pas suite à une lésion traumatique large. De plus, dans des conditions pathologiques telles un cancer ou l'ostéoporose, une reconstruction tissulaire s'impose (Hing 2004). A l'heure actuelle, la prothèse orthopédique reste le traitement majoritaire et les nombreux biomatériaux testés pour remplacer l'os telles

des échafaudages en soie (Meinel et al. 2005), en apatite (Legeros et al. 2003), ou en polymères synthétiques (Leiggener et al. 2006) sont limités au traitement de lésions peu étendues (Hing 2004) voire à des régions subissant seulement de faible pression (Jagur-Grodzinski 2006).

En ce qui concerne le cartilage, il présente de faibles capacités de régénération puisqu'il est avascularisé (Buckwalter and Mankin 1997; Cancedda et al. 2003). Lors de maladies auto-immunes, telles l'arthrose, ou la polyarthrite rhumatoïde ou simplement suite au vieillissement, les articulations se détériorent donc de manière irréversible. Les traitements courants servent à stopper la douleur, et/ou l'inflammation, mais jamais à réparer l'articulation.

Concernant le chondrocyte, cellule principale du cartilage, la culture 3D est une étape majeure, indispensable pour maintenir le phénotype souhaité, puisqu'en monocouche, les chondrocytes se différencient et deviennent fibroblastiques (Lee et al. 2003).

Le biomatériau " échafaudage ", par son rôle à la fois structurant et bio-inducteur, permet non seulement de former un réseau tridimensionnel dans lequel le chondrocyte pourra maintenir son phénotype et synthétiser une matrice composée de collagènes de type II et de protéoglycanes (caractéristiques d'un cartilage hyalin), mais aussi de déposer des cellules souches sur cette architecture avec la possibilité d'inclure des facteurs de croissance dans la même construction tridimensionnelle.

L'ingénierie tissulaire combinée aux échafaudages représente ici une avancée thérapeutique majeure pour substituer les prothèses artificielles. Ainsi, des cellules sont placées dans ou sur le matériau fonctionnalisé par des facteurs de croissance. Elles colonisent la structure et, dans un cas idéal, un tissu régénéré différencié se substitue à l'échafaudage qui se sera décomposé pendant le processus de guérison. Des nouveaux traitements consistent ainsi à injecter des chondrocytes autologues sur des échafaudages 3D tel le Hyalograft® (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italie) (Tognana et al. 2007). Cette autogreffe de chondrocytes permet de guérir une articulation mais pose souvent des problèmes d'approvisionnement en cellules autologues (Tay et al. 2004), de différenciation, et de prolifération faible (Kuo et al. 2006).

Les cellules souches embryonnaires ou mésenchymateuses vont permettre de contourner ces problèmes car elles sont faciles à prélever, elles prolifèrent aisément et surtout elles peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires selon les facteurs de croissance ou des substances actives définies (Mayhall et al. 2004).

Pour reconstruire du cartilage par ingénierie tissulaire, des molécules actives peuvent aider à la différenciation des cellules souches pour éviter les fibroses et/ou pour faciliter la guérison. Le facteur TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1) permet une différenciation des cellules en chondrocytes (Park et al. 2007a). Au niveau de l'os, la protéine BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2) a démontré une grande faculté à stimuler une croissance osseuse (Woo et al. 2001; Lee and Shin 2007), l'os et le cartilage n'ayant pas la capacité de se régénérer seul.

Au sein de ce laboratoire, différents types cellulaires ont déjà été cultivés à la surface de polyélectrolytes : en particulier une lignée ostéoblastique (SaOS-2), des ostéoblastes primaires, des fibroblastes du ligament alvéolo-dentaire (PDL-Fs) et des monocytes (THP-1). Sur de la poly(*l*-lysine) (PL l), de la poly(allylamine hydrochloride) (PAH), du poly(acide *l*-glutamique) (PGA l), et du poly(styrène sulfonate) (PSS), les quatre types cellulaires sont viables et ne montrent pas de variations phénotypiques (Tryoen-Toth et al. 2002).

L'idée de notre étude est de combiner les deux protéines BMP-2 et TGF- β 1 et les cellules souches embryonnaires grâce à la technologie des films multicouches de polyélectrolytes. Le film multicouche va permettre de placer ces deux molécules en réserve dans le même environnement tout en fournissant une structure adhérente aux cellules. Des cellules souches embryonnaires de souris vont être cultivées sur les films afin de vérifier si les protéines sont toujours actives malgré l'adsorption en observant l'induction de la formation osseuse en fonction du temps. Ainsi on obtiendrait un nouveau biomatériau pour greffer des cellules osseuses dans des zones ciblées à traiter.

IV.2. Résultats

Tout d'abord, une particularité de cette étude se situe dans la composition des films multicouches de polyélectrolytes. En effet, le film (PL l -PGA l)₁₆ est non adhésif pour les corps embryonnaires. Le fait d'échanger la PL l dans les 5 dernières paires de couches du film par de la PL l succinylée (PL l s) soit un film (PL l -PGA l)₁₀-PL l -(PGA l - PL l s)₅ favorise l'adhésion des corps embryonnaires. La PL l s est un intermédiaire utilisé pour le couplage de la PL l à des protéines dont l'angiotensine pour la rendre antigénique (Stason et al. 1967). Ce polyélectrolyte est un polyanion avec une faible densité de charges.

La construction couche par couche du film (PGA ℓ -PL ℓ s) $_5$ a été suivie en microbalance à cristal de quartz afin de vérifier s'il y avait un dépôt de couches de polyélectrolytes à chaque étape (figure IV.1).

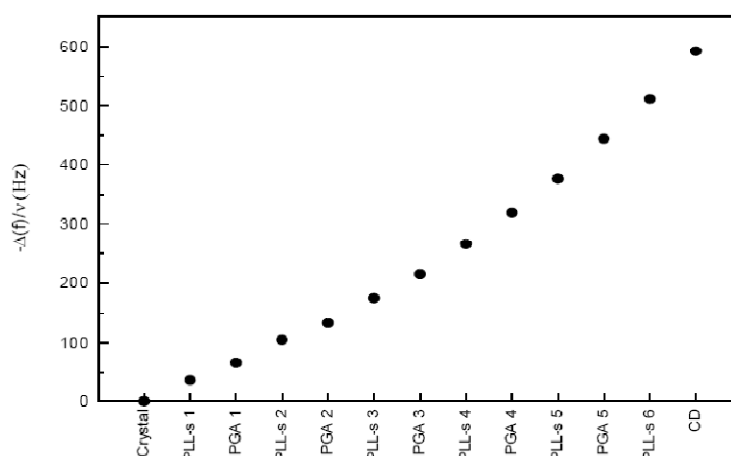


Figure IV.1: Evolution en microbalance à cristal de quartz des fréquences normalisées ($-\Delta(f)/\nu$) lors de la construction couche par couche d'un film (PL ℓ s-PGA ℓ) $_5$ -PL ℓ s-cCD. Les valeurs sont déterminées après le dépôt du polyélectrolyte ou de la cCD et un rinçage avec la solution tampon de NaCl 0,15M. Les variations sont déterminées à une fréquence de résonance de 15 MHz (fréquence fondamentale de 5 MHz, $\nu=3$).

L'augmentation de $-\Delta(f)/\nu$ en fonction de la couche terminale déposée lors de la construction du film (PL ℓ s-PGA ℓ) $_5$ -PL ℓ s-cCD démontre qu'il y a bien formation d'un film multicouche avec une croissance en masse et en épaisseur de type linéaire (voir paragraphe I.2.2.4.1). Pour expliquer la différence d'adhésion rencontrée entre les films composés de PL ℓ ou de PL ℓ s, il est possible que le module d'Young de ces deux structures diffère. En effet, une augmentation du module d'Young au niveau du film composé de PL ℓ s aboutirait à une augmentation de l'adhésion cellulaire en raison de la durotaxie (voir paragraphe III.2.1.).

Suite à ces études préliminaires pour déterminer quel type de film multicouche est adhésif aux cellules, nous avons testé quelle était la meilleure architecture pour induire l'ostéogenèse de corps embryonnaires. Les corps embryonnaires D3 sont cultivés pendant 10 ou 21 jours sur des films multicouches fonctionnalisés avec BMP-2 et/ou TGF- β 1 en présence d'acide ascorbique et d'insuline.

La coloration au bleu Alcian marque de façon spécifique en bleu les protéoglycanes acides qui constituent le cartilage comme présenté figure IV.2 (voir paragraphe II.2.14.). Les résultats montrent clairement une induction de l'expression chondrogénique au bout de 10 jours de culture.

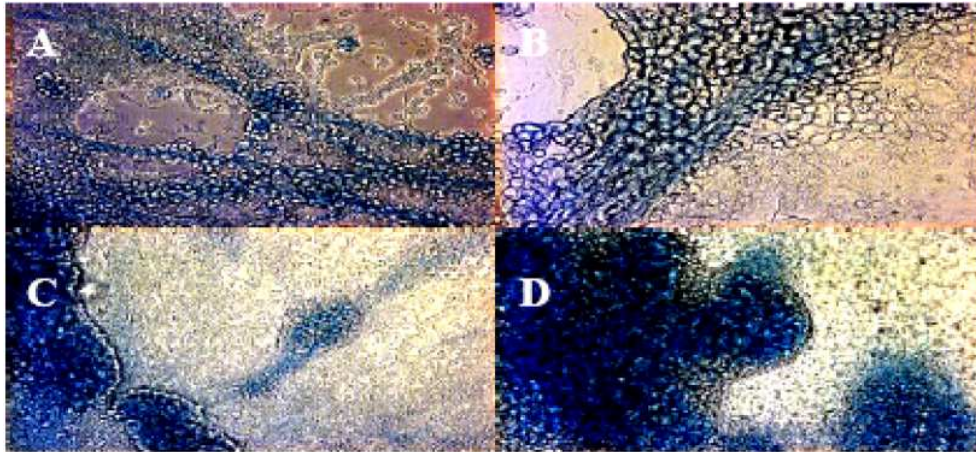


Figure IV.2: Coloration au bleu Alcian pour marquer les protéoglycanes acides sécrétés par les chondrocytes dérivés des cellules souches. La présence de chondrocytes est estimée au 10^{ème} jour de culture des corps embryonnaires cultivés sur des films multicouches : sans BMP-2 ni TGF- β 1 (A) = (PLL-PGAL)₁₀-PLL-(PGAL-PLl)₅, avec BMP-2 seule (B) = (PLL-PGAL)₁₀-PLL-**BMP2**-PLL-(PGAL-PLl)₅, avec TGF- β 1 et BMP-2 (C) = (PLL-PGAL)₅-PLL-**cCD-TGF β 1-cCD**-PLL-(PGAL-PLl)₅-**BMP2**-PLL-(PGAL-PLl)₅, et (D) = (PLL-PGAL)₅-PLL-**BMP2**-PLL-(PGAL-PLl)₅-**cCD-TGF β 1-cCD**-PLL-(PGAL-PLl)₅. L'observation est menée avec un microscope à contraste de phase (20x).

Grâce à la coloration au bleu Alcian, il est mis en évidence que seule l'architecture contenant les deux protéines (figure IV.2 C et D) permet d'obtenir une coloration bleue donc une différenciation des corps embryonnaires en chondroblastes. En absence de molécules actives dans le film (figure IV.2 A), les corps embryonnaires restent à un stade indifférencié. Enfin, si seule la protéine BMP-2 (figure IV.2 B) [ou le TGF- β 1, données non montrées] est intégrée dans le film, elle ne suffit pas à induire une différenciation des corps embryonnaires dérivés des cellules souches. Il semblerait donc que la présence de BMP-2 soit nécessaire pour que le TGF- β 1 puisse agir et inversement. Ces deux facteurs ont donc un effet synergétique. Cet effet n'avait jamais été mis en évidence auparavant dans le cas de la fonctionnalisation des films multicouches de polyélectrolytes.

Lors du développement embryonnaire, le stade cartilage se poursuit par une minéralisation et donc une ossification de la structure. Le marquage Von Kossa au 21^{ème} jour de culture met en évidence les structures minéralisées en noir (voir paragraphe II.2.14.).



Figure IV.3: Coloration Von Kossa pour visualiser la différenciation en os des corps embryonnaires après 21 jours de culture sur un film multicouche non fonctionnalisé (A) = $(\text{PLl-PGAl})_{10}\text{-PLl-(PGAl-PLl)}_5$, ou fonctionnalisé par la BMP-2 et le TGF- β 1 (B et C, deux zones différentes) = $(\text{PLl-PGAl})_5\text{-PLl-BMP2-PLl-(PGAl-PLl)}_5\text{-cCD-TGF}\beta_1\text{-cCD-PLl-(PGAl-PLl)}_5$.

La figure IV.3 présente les résultats suite à la coloration au Von Kossa. Le film seul (figure IV.3 A) n'induit pas la différenciation des corps embryonnaires en os comme déjà démontré auparavant puisque les cellules n'accédaient même pas au stade de cartilage. Seul le film constitué des deux protéines (figure IV.3 B et C) aboutit à des ostéoblastes exprimant de l'ostéocalcine minéralisée à partir des corps embryonnaires.

La commutation entre les cellules cartilagineuses et les cellules osseuses prend donc place entre le 10^{ème} et le 21^{ème} jour de culture des corps embryonnaires seulement sur un film contenant les deux protéines simultanément.

Pour vérifier cette hypothèse, une analyse de l'expression de l'ostéopontine, une protéine spécifique des lignées ostéoblastiques est réalisée par immunocytochimie (figure IV.4).

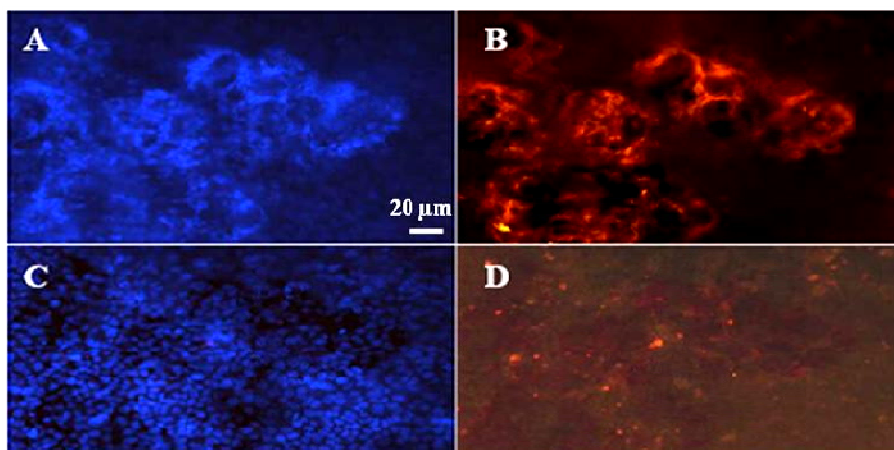


Figure IV.4: Immunocytochimie des corps embryonnaires avec l'anticorps anti-ostéopontine en parallèle avec une coloration des noyaux cellulaires par marquage Hoechst. B et D Immunomarquage pour les cellules exprimant l'ostéopontine (en rouge), A et C : Coloration Hoechst (en bleu). Les corps embryonnaires sont cultivés pendant 21 jours sur un film multicouche fonctionnalisé avec TGF- β 1 et BMP-2 (A et B) = $(\text{PlL-PlGA})_5\text{-PlL-cCD-TGF}\beta_1\text{-cCD-PlL-(PlGA-PlL)}_5\text{-BMP}_2\text{-PlL-(PlGA-PlL)}_5$ ou sans protéine (C et D) = $(\text{PlLs-PlGA})_{10}\text{-PlL-(PlGA-PlL)}_5$.

Les résultats d'immunocytochimie confirment les résultats précédemment obtenus avec la coloration spécifique Von Kossa. Des ostéoblastes synthétisent de l'ostéopontine après 21 jours de culture seulement sur le film fonctionnalisé avec les deux protéines. L'emplacement d'une protéine par rapport à l'autre lors de l'enfouissement ne semble pas avoir d'importance puisque dans les deux cas la synthèse d'ostéopontine et une calcification apparaissent, deux éléments caractéristiques du phénotype ostéoblastique.

Ces résultats ont été confirmés par RTPCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) par une analyse non seulement de l'expression d'aggrécane et de collagène types II, molécules spécifiques du cartilage au bout de 10 jours de différenciation, mais aussi par l'expression de l'ostéopontine et de l'ostéocalcine, molécules spécifiques de l'induction osseuse au bout de 21 jours de différenciation (figure IV.5).

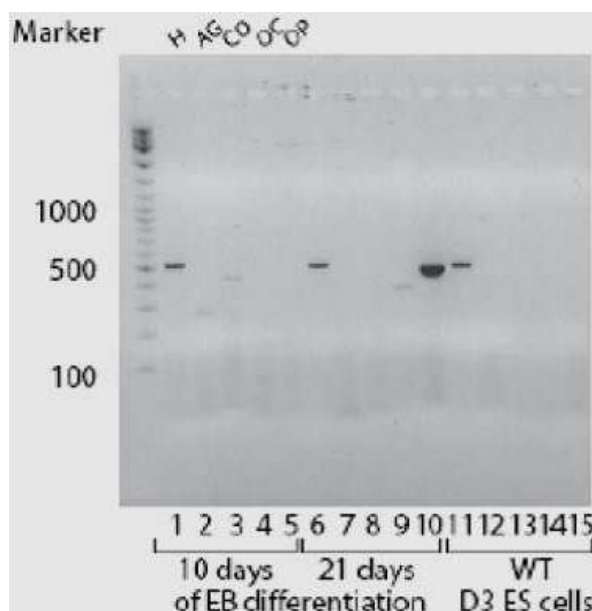


Figure IV.5: Analyse RT-PCR de l'expression de composants de la matrice extracellulaire. Les ARN sont extraits des corps embryonnaires D3 différenciés sur les films multicouches fonctionnalisés avec BMP-2 et TGF- β 1 en présence d'acide ascorbique et d'insuline après 10 ou 21 jours de culture (respectivement lignes 1 à 5 et lignes 6 à 10) en comparaison avec des cellules souches embryonnaires D3 " wild type " (lignes 11 à 15). Les amorces servent à cibler : l'Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transférane (HPRT) : **H** = 507bp (lignes 1, 6, 11); l'Aggrécane : **AG** = 270bp (lignes 2, 7, 12); le Collagène type II : **CO** = 432bp (lignes 3, 8, 13); l'Ostéocalcine : **OC** = 370bp (lignes 4, 9, 14); et l'Ostéopontine : **OP** = 460bp (lignes 5, 10, 15). Le gène de l'HPRT correspond au " housekeeping gene " pour contrôler la qualité de la RT-PCR. L'AG et le CO sont des marqueurs du cartilage alors que l'OC et l'OP marquent la présence d'os.

Nous avons aussi pu observer en microscopie à balayage une induction du réseau de collagène au bout de 10 jours de différenciation spécifique d'une induction chondrogénique (figure IV.6).

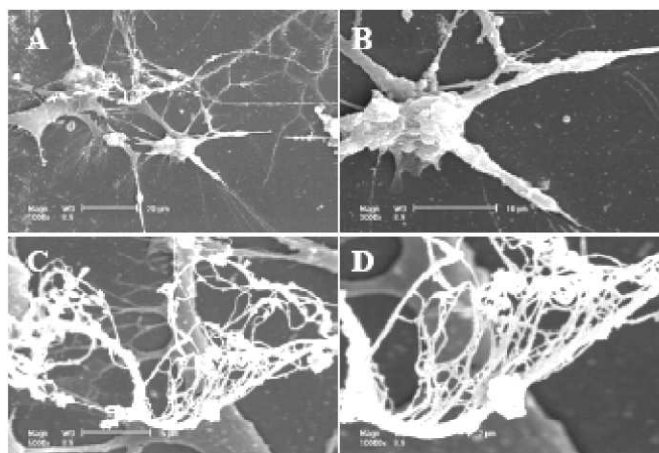


Figure IV.6: Observations en MEB (microscopie électronique à balayage) de l'induction du cartilage (induction de la synthèse de collagène) par des corps embryonnaires cultivés sur des films $(PLl-PGAl)_5-PLl-cCD-TGF\beta_1-cCD-PLl-(PGAl-PLl)_5-BMP_2-PLl-(PGAl-PLl)_5$ (A: 20 μm , B: 10 μm , C: 5 μm , D: 2 μm).

Par ailleurs, une observation en microscopie à transmission au bout de 21 jours de différenciation montre clairement une minéralisation de ce réseau collagène, une induction de la vésicule de l'os et une présence d'ostéoblastes signant l'induction osseuse (figure IV.7).

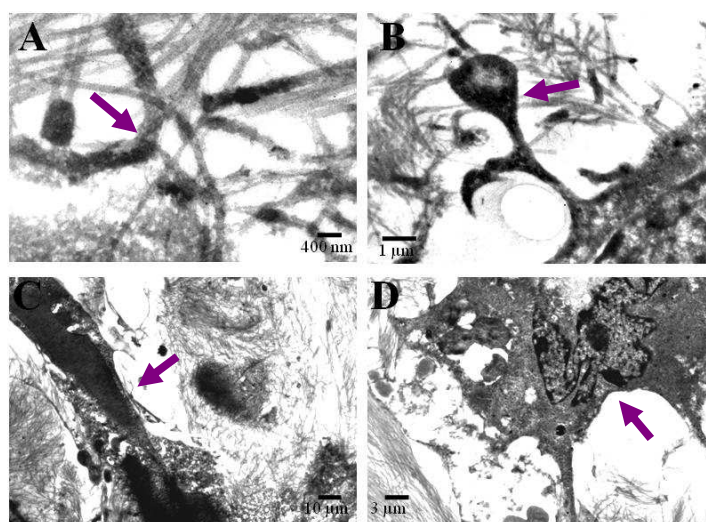


Figure IV.7: Observations en MET (microscopie électronique en transmission) de l'induction osseuse sur des corps embryonnaires cultivés sur des films $(PLl-PGAl)_5-PLl-cCD-TGF\beta_1-cCD-PLl-(PGAl-PLl)_5-BMP_2-PLl-(PGAl-PLl)_5$. A et C : Ossification visualisée en noir sur des fibres de collagène; B: Induction de vésicules osseuses; D: Visualisation d'un ostéoblaste.

Une observation importante est à discuter : la position des molécules dans la multicouche n'est pas primordiale puisque si la position dans le film de la BMP-2 et du TGF- β 1 est inversée, les cellules se différencient toujours en chondrocytes puis en ostéoblastes. Etant donné que les cellules ne distinguent pas les deux types de films en fonction du degré d'enfouissement, une hypothèse serait que ces deux molécules sont libérées dans le milieu et interagissent directement avec les cellules. Une autre possibilité est que ces principes actifs peuvent diffuser au travers du film multicouche de façon à rentrer en contact avec les cellules aux abords de la surface. Une troisième explication pourrait être que les cellules forment des pseudopodes et/ou dégradent le film multicouche pour aboutir à la couche protéique insérée dans le film.

Afin de pousser le raisonnement, les corps embryonnaires ont été mis en contact avec le surnageant des films fonctionnalisés. Aucune différenciation n'a été révélée suite à ce traitement. Les corps embryonnaires ont aussi été cultivés avec les facteurs de croissance libres dans le surnageant. Dans ce cas de figure, la différenciation est peu marquée en comparaison à celle obtenue suite à l'immobilisation des facteurs dans le film multicouche.

Les cellules rentreraient donc en contact avec les facteurs de croissance au travers des films de polyélectrolytes ou en surface. L'adsorption des protéines amplifie la réponse cellulaire à ces facteurs. Néanmoins, le mécanisme d'interaction entre ces facteurs de croissance incorporés dans le film multicouche et les cellules reste à déterminer clairement.

Les protéines pourraient diffuser vers la surface du film et rentrer en contact avec les cellules ayant formées des pseudopodes. L'hypothèse n'est pas à rejeter étant donné que la masse moléculaire du BMP-2 est deux fois moins grande que celle de la PL ℓ (26000 Da en comparaison de 50000 Da). Cependant, le TGF- β 1 est déposé entre 2 couches de cCD et semble donc difficilement pouvoir se comporter comme une espèce diffusive. Par conséquent, les cellules atteindraient les molécules au travers de la multicouche par formation de pseudopodes et/ou dégradation du film. Elles seraient alors en contact avec le TGF- β 1 immobilisé au niveau d'une couche précise du film et en même temps en contact avec la protéine BMP-2 qui aurait diffusé dans l'intégralité du film. Cette hypothèse permet de corroborer l'effet synergétique révélé dans cette étude où les deux protéines doivent être en présence afin d'induire l'ostéogénèse.

IV.3. Conclusions et perspectives

Sur des films multicouches bioactifs formés de PLL, PGA et PLs, les corps embryonnaires se différencient en cellules du cartilage puis de l'os grâce respectivement au TGF- β 1 et à la BMP-2 insérés dans le film. Il est mis en évidence un effet synergétique de ces deux composés. En effet, si le film contient un des deux facteurs, il n'induit pas une différenciation au niveau des corps embryonnaires.

Les applications de cet édifice contenant tous les éléments nécessaires pour la reconstruction osseuse à partir de cellules souches sont nombreuses. En effet, les tissus cartilagineux et osseux ne peuvent se régénérer entièrement suite à une large lésion. Les pathologies entraînant des lésions articulaires sont par exemple la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrose ou l'ostéochondrite disséquante. Ce système induisant l'ostéogenèse pourrait être envisagé dans le traitement de ces pathologies à la place de la pose d'une prothèse. Il faudrait cependant réussir à arrêter les cellules au stade du cartilage.

D'autre part, des médecins suédois ont réussi à reformer un nouveau cartilage en injectant des cellules cartilagineuses directement dans l'articulation (greffe autogène) (Brittberg et al. 1994; Peterson et al. 2003). Ce procédé thérapeutique pourrait être amélioré grâce aux films multicouches puisque les cellules auraient alors une surface fonctionnalisée pour proliférer et coloniser la zone à traiter et surtout pour se différencier spécifiquement en présence des facteurs de croissance en chondrocytes voire en ostéoblastes.

IV.4. Article, (Dierich et al. 2007)

[Signalement bibliographique ajouté par :
SICD Strasbourg - Département de la Documentation électronique
Service des thèses électroniques]

Bone formation mediated by synergy-acting growth factors embedded in a polyelectrolyte multilayer film

A. DIETRICH, E. LE GUEN, N. MESSADECQ, J.-F. STOLTZ, P. NETTER, P. SCHAAF, J.-C. VOEGEL, N. BENKIRANE-JESSEL

Advanced Materials, 2007, Vol. 19, N° 5, Pages 693-697

Pages 190-194 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1002/adma.200601271>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

*Gant pasianted hag amzer
a-benn eus pep tra e teuer.
(Avec patience et temps on vient à bout de tout.)*

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La construction couche par couche de films multicouches de polyélectrolytes présente de nombreux avantages : la facilité de préparation, le contrôle précis des structures, la capacité à intégrer divers types de biomolécules en quantités modulables et en les maintenant actives.

Cette technologie encore très prometteuse intéresse de nombreux domaines d'application. Le thème général de cette thèse concernait les biomatériaux. Les multicouches de polyélectrolytes ont permis de développer sur les surfaces de ces biomatériaux des réservoirs de molécules actives diverses ainsi que des structures pour l'ingénierie tissulaire.

Quatre types d'édifices fonctionnalisables ont été développés et étudiés au cours de nos recherches pour créer des systèmes à libération contrôlée de principes actifs. Ils se composent toujours d'un film multicouche de polyélectrolytes épais et fortement hydraté. Ce type de film autorise la mise en réserve de molécules actives très variables comme le diclofénac, le Taxol®, la protéine A, ou le piroxicam (Le Guen et al. 2007), à des concentrations pouvant être très importantes. Il a ainsi été démontré lors du dépôt de Taxol que la concentration finale dans le film était environ vingt fois plus élevée que la concentration en solution. Les concentrations finales dans le film se révèlent ainsi modulables selon la concentration de la solution de dépôt. De plus, la concentration dans le film en principes actifs peut dépendre du nombre de paires de couche constituant le film, c'est-à-dire de l'épaisseur du film multicouche, si la molécule diffuse dans l'intégralité du film (exemples avec le diclofénac et le Taxol) au lieu de rester immobile au niveau de la couche de dépôt (protéine A).

Ces films réservoirs sont ensuite modifiés suivant différentes stratégies. Ils sont soit réticulés chimiquement, soit recouverts par un film multicouche de polyélectrolytes non dégradables, ou par une couche de polyester qui bloque la diffusion des principes actifs vers le milieu extérieur. Enfin une dernière stratégie a visé à utiliser des mélanges de polyélectrolytes dégradables et non dégradables pour construire les films.

La première méthode pour former un réservoir a consisté à réticuler un film multicouche puis à le fonctionnaliser. La réticulation permet d'améliorer la viabilité cellulaire sur des films PL ℓ -PGA ℓ normalement trop mous pour permettre l'adhésion de certaines cellules puisqu'elle rigidifie la structure. Du diclofénac et du Taxol déposés alors sur ces films réticulés diffusent

de façon passive. Une libération lente pendant plusieurs dizaines d'heures des molécules de diclofénac est ensuite obtenue et permet de conserver une activité anti-inflammatoire sur un temps long. Le Taxol, agent antimétabolique, induit la mort cellulaire sur un temps prolongé de 3 jours suite à son intégration dans le film multicouche réticulé. Grâce à la réticulation des films de polyélectrolytes, il est donc possible de modifier leurs propriétés mécaniques ainsi que leur biodégradabilité et leur activité.

D'autre part, une barrière à la diffusion des polyélectrolytes et des molécules actives a été formée en déposant un film multicouche synthétique non dégradé sur le film réservoir dégradé. Selon le nombre de couches composant le film barrière, l'accès des cellules au Taxol placé dans le réservoir est modulé en termes de cinétique et la mort cellulaire est donc contrôlée.

Une autre stratégie a consisté à utiliser une couche de polyester, le poly(acide *l,d*-lactique-co-glycolique), PLGA, placée sur un film réservoir de Taxol. L'originalité de ce film de polyester provient de la composition en polyesters. En effet, un mélange variable de PLGA de haut et bas poids moléculaire est utilisé. Ces mélanges aboutissent à une dégradation variable selon le ratio utilisé pour construire le film. Plus le mélange est constitué de PLGA de bas poids moléculaire, plus il se dégrade rapidement en présence de cellules. Une fenêtre d'action de 1 à 7 jours est ainsi obtenue en fonction de la barrière utilisée. Le Taxol en réserve est internalisé par les cellules à des temps différés grâce à cette méthode.

Cet édifice pourrait être testé *in vivo* dans des études futures. En effet, il est envisageable de l'utiliser pour recouvrir des *stents* (prothèses vasculaires) et obtenir des *stents* libérant localement des médicaments utilisés déjà couramment lors d'angioplasties. D'autre part, il serait intéressant de tester ces structures sous forme 3D. Ainsi des microparticules pourraient être réalisées à partir de différents mélanges de PLGA et libérer des molécules à des temps variables. Ce système à libération contrôlée de molécules aurait pour avantage de maintenir une concentration du principe actif dans la fenêtre thérapeutique, c'est-à-dire en évitant notamment des seuils toxiques. De plus, les concentrations atteintes localement seraient plus élevées, augmentant l'efficacité de la thérapie alors que les concentrations systémiques seraient moins élevées que lors d'injections intraveineuses. Enfin les molécules instables (protéines) et/ou rapidement métabolisées (temps de demi-vie court) seraient protégées contre une dégradation précoce.

Le dernier système testé pour moduler la réponse est constitué d'un film multicouche de polyélectrolytes PL-PGA avec un ratio variable en énantiomères de forme ℓ et d . Les premières études permettent de penser qu'il existerait une interaction plus forte entre les polyanions et les polycations de chiralité opposée. Un échange entre polyélectrolytes de même nature mais de chiralité opposée aurait alors lieu si l'on place un film multicouche dans une solution de polyélectrolytes de chiralité différente. Il y aurait donc une préférence vers l'obtention d'un film racémique plutôt qu'un film pur en forme ℓ ou pur en forme d . Ces expériences demandent à être poursuivies en construisant des films mixtes et en les plaçant dans des solutions pures en énantiomères.

Une deuxième partie du travail de thèse a concerné le domaine de l'ingénierie tissulaire. Des cellules souches embryonnaires sont amenées au stade de chondrocytes puis d'ostéoblastes en les cultivant sur un film contenant deux facteurs de croissance de la différenciation osseuse : BMP-2 (bone morphogenetic protein-2) et TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1). Le TGF- β 1 maintient son activité une fois inséré dans le film grâce à l'utilisation de couches de β -cyclodextrine monocarboxylée. La présence simultanée des deux facteurs de croissance dans le film est nécessaire pour une différenciation en cartilage à 10 jours de culture et pour une induction de la formation de l'os au bout de 21 jours. Un effet synergétique est mis en évidence dans ces films multicouches bioactifs. Par cette structure composée d'un film multicouche de PL, PGA et PL succinylée, et fonctionnalisée avec deux facteurs de croissance, il est donc possible de reconstruire un tissu osseux à partir de corps embryonnaires.

L'intérêt maintenant est de tester le comportement de cet édifice *in vivo* chez la souris. Il pourrait permettre d'améliorer la consolidation au niveau d'un os : fracturé lors de l'implantation de broches ou dans l'ostéoporose, ou encore lésé suite à une maladie articulaire telle l'arthrose (avec des souris modèle). Dans ce cas, une implantation de cellules dans des zones très atteintes pourrait ainsi être envisagée en palliatif, avant la pose d'une prothèse.

ANNEXES

*Arabat lakaat peñsel burell ouzh limestra.
(Il ne faut pas mettre une pièce en bure sur de la couleur pourpre.)
Tout ne se mélange pas.*

Article n° 4

[*Signalement bibliographique ajouté par :*
SICD Strasbourg - Département de la Documentation électronique
Service des thèses électroniques]

Bioactive coatings based on polyelectrolyte multilayer architectures functionalized by embedded proteins, peptides or drugs

E. LE GUEN, A. CHASSEPOT, G. DECHER, P. SCHAAF, J.-C. VOEGEL, N. JESSEL

Biomolecular engineering, 2007, Vol. 24, N° 1, Pages 33-41

Pages 200-208 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.05.023>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

RÉFÉRENCES

*Etre an tre hag al lanv
E c'hall pep hini skrivañ e anv.
(Entre le reflux et le flux chacun peut écrire son nom.)*

RÉFÉRENCES

- Ai, H., M. Fang, S. A. Jones and Y. M. Lvov (2002). "Electrostatic layer-by-layer nanoassembly on biological microtemplates: platelets." Biomacromolecules **3**(3): 560-4.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. D. Watson (1998). Biologie moléculaire de la cellule, Troisième édition. Paris, Flammarion Médecine-Sciences.
- Alexis, F. (2005). "Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly(lactic acid) and poly[(lactic acid)-co-(glycolic acid)]." Polymer International **54**(1): 36-46.
- Ali, S. A., P. J. Doherty and D. F. Williams (1993). "Mechanisms of polymer degradation in implantable devices. 2. Poly(DL-lactic acid)." Journal of Biomedical Materials Research **27**(11): 1409-18.
- Alsberg, E., H. J. Kong, Y. Hirano, M. K. Smith, A. Albeiruti and D. J. Mooney (2003). "Regulating bone formation via controlled scaffold degradation." Journal of Dental Research **82**(11): 903-908.
- Anderson, J. M. (2001). "Biological responses to materials." Annual Review of Materials Research **31**: 81-110.
- Anderson, J. M. and M. S. Shive (1997). "Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres." Advanced Drug Delivery Reviews **28**(1): 5-24.
- Andrianov, A. K. and L. G. Payne (1998). "Polymeric carriers for oral uptake of microparticulates." Advanced Drug Delivery Reviews **34**(2-3): 155-170.
- Antipov, A. A., G. B. Sukhorukov and H. Möhwald (2003). "Influence of the ionic strength on the polyelectrolyte multilayers' permeability." Langmuir **19**(6): 2444-2448.
- Ariga, K., Y. Lvov and T. Kunitake (1997). "Assembling alternate dye-polyion molecular films by electrostatic layer-by-layer adsorption." Journal of the American Chemical Society **119**(9): 2224-2231.
- Aubert-Pouessel, A., M. C. Venier-Julienne, P. Saulnier, M. Sergent and J. P. Benoit (2004). "Preparation of PLGA microparticles by an emulsion-extraction process using glycofurol as polymer solvent." Pharmaceutical Research **21**(12): 2384-2391.
- Bala, I., S. Hariharan and M. N. V. R. Kumar (2004). "PLGA nanoparticles in drug delivery: The state of the art." Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems **21**(5): 387-422.

-
- Balabushevich, N. G., O. P. Tiourina, D. V. Volodkin, N. I. Larionova and G. B. Sukhorukov (2003). "Loading the Multilayer Dextran Sulfate/Protamine Microsized Capsules with Peroxidase." *Biomacromolecules* **4**(5): 1191-1197.
- Bau, B., L. A. McKenna, S. Soeder, Z. Y. Fan, A. Pecht and T. Aigner (2004). "Hepatocyte growth factor/scatter factor is not a potent regulator of anabolic and catabolic gene expression in adult human articular chondrocytes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **316**(4): 984-990.
- Benkirane-Jessel, N., P. Lavallo, E. Hübsch, V. Holl, B. Senger, Y. Haïkel, J.-C. Voegel, J. Ogier and P. Schaaf (2005). "Short-Time tuning of the biological activity of functionalized polyelectrolyte multilayers." *Advanced Functional Materials* **15**(4): 648-654.
- Benkirane-Jessel, N., P. Lavallo, F. Meyer, F. Audouin, B. Frisch, P. Schaaf, J. Ogier, G. Decher and J.-C. Voegel (2004a). "Control of monocyte morphology on and response to model surfaces for implants equipped with anti-inflammatory agents." *Advanced Materials* **16**(17): 1507-1511.
- Benkirane-Jessel, N., P. Schwinté, P. Falvey, R. Darcy, Y. Haïkel, P. Schaaf, J.-C. Voegel and J. Ogier (2004b). "Build-up of polypeptide multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxicam-cyclodextrin complexes." *Advanced Functional Materials* **14**(2): 174-182.
- Berg, M. C., S. Y. Yang, P. T. Hammond and M. F. Rubner (2004). "Controlling Mammalian Cell Interactions on Patterned Polyelectrolyte Multilayer Surfaces." *Langmuir* **20**(4): 1362-1368.
- Berg, M. C., L. Zhai, R. E. Cohen and M. F. Rubner (2006). "Controlled drug release from porous polyelectrolyte multilayers." *Biomacromolecules* **7**(1): 357-364.
- Binning, G., F. Quate and C. Gerber (1986). "Atomic Force Microscope." *Physical Review Letters* **56**(9): 930-933.
- Blodgett, K. B. and I. Langmuir (1937). "Buildup films of Barium stearate and their optical properties." *Physical Review* **51**: 964-982.
- Boontheekul, T., E. E. Hill, H. J. Kong and D. J. Mooney (2007). "Regulating myoblast phenotype through controlled gel stiffness and degradation." *Tissue Engineering* **13**(7): 1431-1442.
- Bouhadir, K. H., E. Alsberg and D. J. Mooney (2001). "Hydrogels for combination delivery of antineoplastic agents." *Biomaterials* **22**(19): 2625-33.
- Boulmedais, F., M. Bozonnet, P. Schwinté, J.-C. Voegel and P. Schaaf (2003). "Multilayered polypeptide films: secondary structures and effect of various stresses." *Langmuir* **19**: 9873-9882.

-
- Boulmedais, F., B. Frisch, O. Etienne, P. Lavalley, C. Picart, J. Ogier, J.-C. Voegel, P. Schaaf and C. Egles (2004). "Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of antimicrobial protection for biomaterials." Biomaterials **25**: 2003-2011.
- Boulmedais, F., P. Schwinté, C. Gergely, J.-C. Voegel and P. Schaaf (2002). "Secondary structure of polypeptide multilayer films: An example of locally ordered polyelectrolyte multilayers." Langmuir **18**(11): 4523-4525.
- Brittberg, M., A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson and L. Peterson (1994). "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation." New England Journal of Medicine **331**(14): 889-95.
- Buckwalter, J. A. and H. J. Mankin (1997). "Articular cartilage .2. Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation." Journal of Bone and Joint Surgery- Series A **79**(4): 612-632.
- Burke, S. E. and C. J. Barrett (2003). "Acid-Base Equilibria of Weak Polyelectrolytes in Multilayer Thin Films." Langmuir **19**(8): 3297-3303.
- Cancedda, R., B. Dozin, P. Giannoni and R. Quarto (2003). "Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone." Matrix Biology **22**(1): 81-91.
- Cao, G., H. G. Hong and T. E. Mallouk (1992). "Layered metal phosphates and phosphonates: from crystals to monolayers." Accounts of Chemical Research **25**(9): 420-427.
- Caruso, F., E. Donath and H. Möhwald (1998). "Influence of polyelectrolyte multilayer coatings on Förster resonance energy transfer between 6-carboxyfluorescein and rhodamine B-labeled particles in aqueous solution." Journal of Physical Chemistry B **102**(11): 2011-2016.
- Caruso, F. and H. Möhwald (1999). "Protein Multilayer Formation on Colloids through a Stepwise Self-Assembly Technique." Journal of the American Chemical Society **121**(25): 6039-6046.
- Caruso, F., K. Niikura, D. N. Furlong and Y. Okahata (1997). "Assembly of alternating polyelectrolyte and protein multilayer films for immunosensing .2." Langmuir **13**(13): 3427-3433.
- Ceraline, J., G. Deplanque, B. Duclos, J. M. Limacher, F. Vincent, S. Goldblum and J. P. Bergerat (1997). "[Relationships between p53 induction, cell cycle arrest and survival of normal human fibroblasts following DNA damage]." Bulletin du Cancer **84**(11): 1007-16.
- Chaki, N. K. and K. Vijayamohanan (2002). "Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications." Biosensors and Bioelectronics **17**(1-2): 1-12.
- Chen, W. Y. J. and G. Abatangelo (1999). "Functions of hyaluronan in wound repair." Wound Repair and Regeneration **7**(2): 79-89.

-
- Cheng, J. H., A. F. Fou and M. F. Rubner (1994). "Molecular self-assembly of conducting polymers." Thin Solid Films **244**(1-2): 985-989.
- Chluba, J., J. C. Voegel, G. Decher, P. Erbacher, P. Schaaf and J. Ogier (2001). "Peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity." Biomacromolecules **2**(3): 800-5.
- Cho, J., K. Char, J. D. Hong and K. B. Lee (2001). "Fabrication of highly ordered multilayer films using a spin self-assembly method." Advanced Materials **13**(14): 1076-+.
- Chu, P. K. (2004). "Recent developments and applications of plasma immersion ion implantation." Journal of Vacuum Science & Technology B **22**(1): 289-296.
- Chun, K. W., J. B. Lee, S. H. Kim and T. G. Park (2005). "Controlled release of plasmid DNA from photo-cross-linked pluronic hydrogels." Biomaterials **26**(16): 3319-3326.
- Chung, E. H., M. Gilbert, A. S. Viridi, K. Sena, D. R. Sumner and K. E. Healy (2006). "Biomimetic artificial ECMs stimulate bone regeneration." Journal of Biomedical Materials Research - Part A **79**(4): 815-826.
- Cohen, S., T. Yoshioka, M. Lucarelli, L. H. Hwang and R. Langer (1991). "Controlled delivery systems for proteins based on poly(lactic/glycolic acid) microspheres." Pharmaceutical Research **8**(6): 713-20.
- Collin, D., P. Lavalle, J. M. Garza, J. C. Voegel, P. Schaaf and P. Martinoty (2004). "Mechanical properties of cross-linked hyaluronic acid/poly-(L-lysine) multilayer films." Macromolecules **37**(26): 10195-10198.
- Cruise, G. M., D. S. Scharp and J. A. Hubbell (1998). "Characterization of permeability and network structure of interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels." Biomaterials **19**(14): 1287-1294.
- Cui, F., K. Shi, L. Q. Zhang, A. J. Tao and Y. Kawashima (2006). "Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: Preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation." Journal of Controlled Release **114**(2): 242-250.
- Dähne, L., S. Leporatti, E. Donath and H. Möhwald (2001). "Fabrication of micro reaction cages with tailored properties." Journal of the American Chemical Society **123**(23): 5431-6.
- Dalsin, J. L., B. H. Hu, B. P. Lee and P. B. Messersmith (2003). "Mussel adhesive protein mimetic polymers for the preparation of nonfouling surfaces." Journal of the American Chemical Society **125**(14): 4253-4258.
- Darnell, J., H. Lodish and D. Baltimore (1989). La cellule, biologie moléculaire. Paris, Vigot
- Debatosh, D., B. Akshay and C. Vidya (2001). "Lysine: Is it worth more?" Cytotechnology **36**(1): 3-32.
-

-
- Debreczeny, M., V. Ball, F. Boulmedais, B. Szalontai, J. C. Voegel and P. Schaaf (2003). "Multilayers Built from Two Component Polyanions and Single Component Polycation Solutions: A Way to Engineer Films with Desired Secondary Structure." Journal of Physical Chemistry B **107**(46): 12734-12739.
- Decher, G. (1996). Layered nanoarchitectures via directed assembly of anionic and cationic molecules. Comprehensive Supramol. Chem., "Templating, Self-Assembly and self organization", J.P.Sauvage and M.W. Hosseini eds. Oxford, Pergamon Press 9 : 507-528.
- Decher, G. (1997). "Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites." Science **277**(5330): 1232-1237.
- Decher, G., J. D. Hong and J. Schmitt (1992). "Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charges surface." Thin Solid Films **210**: 831-835.
- Decher, G. and J. B. Schlenoff (2003). Multilayer Thin Films - Sequential Assembly of Nanocomposite Materials, G. Decher and J.B. Schlenoff Eds. Weinheim, Wiley-VCH.
- Dechy-Cabaret, O., B. Martin-Vaca and D. Bourissou (2004). "Controlled Ring-Opening Polymerization of Lactide and Glycolide." Chemical Reviews **104**(12): 6147-6176.
- Dejugnat, C., D. Halozan and G. B. Sukhorukov (2005). "Defined picogram dose inclusion and release of macromolecules using polyelectrolyte microcapsules." Macromolecular Rapid Communications **26**(12): 961-967.
- Delcorte, A., P. Bertrand, E. Wischerhoff and A. Laschewsky (1997). "Adsorption of polyelectrolyte multilayers on polymer surfaces." Langmuir **13**(19): 5125-5136.
- DeScheerder, I., K. Wang, K. Wilczek, D. Meuleman, R. VanAmsterdam, G. Vogel, J. Piessens and F. VandeWerf (1997). "Experimental study of thrombogenicity and foreign body reaction induced by heparin-coated coronary stents." Circulation **95**(6): 1549-1553.
- Dewez, J.-L., A. Doren, Y.-J. Schneider and P. G. Rouxhet (1999). "Competitive adsorption of proteins: Key of the relationship between substratum surface properties and adhesion of epithelial cells." Biomaterials **20**(6): 547-559.
- Dhillon, W. S. and S. R. Bloom (2001). "Hypothalamic peptides as drug targets for obesity." Current Opinion in Pharmacology **1**(6): 651-655.
- Dierich, A., E. Le Guen, N. Messaddeq, J. F. Stoltz, P. Netter, P. Schaaf, J. C. Voegel and N. Benkirane-Jessel (2007). "Bone Formation Mediated by Synergy-Acting Growth Factors Embedded in a Polyelectrolyte Multilayer Film." Advanced Materials **19**(5): 693-697.
- Donatien, P., J. E. Surleve-Bazeille, A. J. Thody and A. Taieb (1993). "Growth and differentiation of normal human melanocytes in a TPA-free, cholera toxin-free, low-

-
- serum medium and influence of keratinocytes." Archives for Dermatological Research. Archiv fur Dermatologische Forschung **285**(7): 385-92.
- Drury, J. L. and D. J. Mooney (2003). "Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications." Biomaterials **24**(24): 4337-4351.
- Dubas, S. T. and J. B. Schlenoff (1999). "Factors controlling the growth of polyelectrolyte multilayers." Macromolecules **32**(24): 8153-8160.
- Dubas, S. T. and J. B. Schlenoff (2001). "Polyelectrolyte multilayers containing a weak polyacid: Construction and deconstruction." Macromolecules **34**(11): 3736-3740.
- Durrieu, M. C. (2005). "RGD modified materials: Biomaterials for improved cell adhesion." Conception, élaboration et caractérisation de matériaux bioactifs **26**(3): 229-237.
- Dzau, V. J., R. C. Braun-Dullaeus and D. G. Sedding (2002). "Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies." Nature Medicine **8**(11): 1249-56.
- Elbert, D. L., C. B. Herbert and J. A. Hubbell (1999). "Thin polymer layers formed by polyelectrolyte multilayer techniques on biological surfaces." Langmuir **15**(16): 5355-5362.
- Eriksson, M., A. Torgnysdotter and L. Wagberg (2006). "Surface modification of wood fibers using the polyelectrolyte multilayer technique: effects on fiber joint and paper strength properties." Industrial and Engineering Chemistry Research **45**(15): 5279-5286.
- Etienne, O., A. Schneider, C. Taddei, L. Richert, P. Schaaf, J. C. Voegel, C. Egles and C. Picart (2005). "Degradability of polysaccharides multilayer films in the oral environment: an in vitro and in vivo study." Biomacromolecules **6**(2): 726-733.
- Eves, P. C., S. MacNeil and J. W. Haycock (2006). "Alpha-melanocyte stimulating hormone, inflammation and human melanoma." Peptides **27**(2): 444-52.
- Farokhzad, O. C., J. J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie and R. Langer (2006). "Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(16): 6315-6320.
- Farrell, L.-L., J. Pepin, C. Kucharski, X. Lin, Z. Xu and H. Uludag (2007). "A comparison of the effectiveness of cationic polymers poly-L-lysine (PLL) and polyethylenimine (PEI) for non-viral delivery of plasmid DNA to bone marrow stromal cells (BMSC)." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **65**(3): 388-397.
- Favia, P. and R. d'Agostino (1998). "Plasma treatments and plasma deposition of polymers for biomedical applications." Surface and Coatings Technology **98**(1-3): 1102-1106.
- Ferreira, M., M. F. Rubner and B. R. Hsieh (1994). Luminescence behavior of self-assembled multilayer heterostructures of poly(phenylene vinylene). Materials Research Society Symposium Proceedings.
-

-
- Fou, A. C., O. Onitsuka, M. Ferreira, M. F. Rubner and B. R. Hsieh (1996). "Fabrication and properties of light-emitting diodes based on self-assembled multilayers of poly(phenylene vinylene)." Journal of Applied Physics **79**(10): 7501-7509.
- Francis Suh, J. K. and H. W. T. Matthew (2000). "Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review." Biomaterials **21**(24): 2589-2598.
- Francius, G., J. Hemmerle, V. Ball, P. Lavalley, C. Picart, J. C. Voegel, P. Schaaf and B. Senger (2007). "Stiffening of soft polyelectrolyte architectures by multilayer capping evidenced by viscoelastic analysis of AFM indentation measurements." Journal of Physical Chemistry C **111**(23): 8299-8306.
- Freed, L. E., J. C. Marquis, A. Nohria, J. Emmanuel, A. G. Mikos and R. Langer (1993). "Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers." Journal of Biomedical Materials Research **27**(1): 11-23.
- Freiberg, S. and X. X. Zhu (2004). "Polymer microspheres for controlled drug release." International Journal of Pharmaceutics **282**(1-2): 1-18.
- Fromherz, P. (1980). Electron Microscopy at Molecular Dimensions, Assembling of Proteins at Lipid Monolayers, W. Baumeister and W. Vogell eds. Berlin, Springer, p. 338-349.
- Frömring, K.-H. and J. Szejtli (1994). Cyclodextrins in pharmaceutical technology, Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
- Fu, J., J. Ji, W. Yuan and J. Shen (2005). "Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan." Biomaterials **26**(33): 6684-6692.
- Gaissmaier, C., J. Fritz, T. Krackhardt, I. Flesch, W. K. Aicher and N. Ashammakhi (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.
- Gangloff, S. C., G. Ladam, V. Dupray, K. Fukase, K. Brandenburg, M. Guenounou, P. Schaaf, J. C. Voegel and N. Jessel (2006). "Biologically active lipid A antagonist embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture." Biomaterials **27**(9): 1771-1777.
- Garg, H. and C. Hales (2004). Chemistry and biology of hyaluronan. H. Garg and C. Hales eds. Amsterdam, Elsevier Science.
- Garza, J. M., N. Jessel, G. Ladam, V. Dupray, S. Muller, J. F. Stoltz, P. Schaaf, J. C. Voegel and P. Lavalley (2005). "Polyelectrolyte multilayers and degradable polymer layers as multicompartment films." Langmuir **21**(26): 12372-12377.
- Garza, J. M., P. Schaaf, S. Muller, V. Ball, J. F. Stoltz, J. C. Voegel and P. Lavalley (2004). "Multicompartment films made of alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth." Langmuir **20**(17): 7298-302.
-

-
- Ghose, A. C., A. Mookerjee, K. Sengupta, A. K. Ghosh, S. Dasgupta and P. K. Ray (1999). "Therapeutic and prophylactic uses of Protein A in the control of *Leishmania donovani* infection in experimental animals." *Immunology Letters* **65**(3): 175-181.
- Gilbert, R. D., V. Stannett, C. G. Pitt and A. Schindler (1982). *The Design of Biodegradable Polymers: Two Approaches* (ed. N. Grassie). *Development in polymer degradation* London, Applied Science publishers.
- Girish, K. S. and K. Kemparaju (2007). "The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview." *Life Sciences* **80**(21): 1921-43.
- Glinel, K., M. Prevot, R. Krustev, G. B. Sukhorukov, A. M. Jonas and H. Möhwald (2004). "Control of the water permeability of polyelectrolyte multilayers by deposition of charged paraffin particles." *Langmuir* **20**(12): 4898-4902.
- Gobin, A. S. and J. L. West (2002). "Cell migration through defined, synthetic ECM analogs." *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**(7): 751-753.
- Goessler, U. R., K. Hormann and F. Riedel (2004). "Tissue engineering with chondrocytes and function of the extracellular matrix (review)." *International Journal of Molecular Medicine* **13**(4): 505-513.
- Golander, C. G., H. Arwin, J. C. Eriksson, I. Lundstrom and R. Larsson (1982). "Heparin surface film formation through adsorption of colloidal particles studied by ellipsometry and scanning electron microscopy." *Colloids and Surfaces* **5**(1): 1-16.
- Gopferich, A. (1996). "Mechanisms of polymer degradation and erosion." *Biomaterials* **17**(2): 103-14.
- Gray, D. S., J. Tien and C. S. Chen (2003). "Repositioning of cells by mechanotaxis on surfaces with micropatterned Young's modulus." *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **66**(3): 605-14.
- Grayson, A. C. R., I. S. Choi, B. M. Tyler, P. P. Wang, H. Brem, M. J. Cima and R. Langer (2003). "Multi-pulse drug delivery from a resorbable polymeric microchip device." *Nature Materials* **2**(11): 767-772.
- Gref, R., Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin and R. Langer (1994). "Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres." *Science* **263**(5153): 1600-3.
- Grigorij, K., Š. Ladislav, S. Robert and G. Peter (2007). "Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications." *Biotechnology Letters* **29**(1): 17-25.
- Guan, L. M. and J. E. Davies (2004). "Preparation and characterization of a highly macroporous biodegradable composite tissue engineering scaffold." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **71A**(3): 480-487.
-

-
- Guyomard, A., G. Muller and K. Glinel (2005). "Buildup of multilayers based on amphiphilic polyelectrolytes." Macromolecules **38**(13): 5737-5742.
- Harris, J. J., P. M. DeRose and M. L. Bruening (1999). "Synthesis of passivating, nylon-like coatings through cross-linking of ultrathin polyelectrolyte films." Journal of the American Chemical Society **121**(9): 1978-1979.
- Heflin, J. R., C. Figura, D. Marciu, Y. Liu and R. O. Claus (1999). "Thickness dependence of second-harmonic generation in thin films fabricated from ionically self-assembled monolayers." Applied Physics Letters **74**(4): 495-497.
- Hehrlein, C., A. Arab and C. Bode (2002). "Drug-eluting stent: the "magic bullet" for prevention of restenosis?" Basic Research in Cardiology **97**(6): 417-423.
- Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate techniques. G. T. Hermanson. San Diego, Academic Press: 169-176.
- Heublein, B., E. G. Evagorou, R. Rohde, S. Ohse, R. R. Meliss, S. Barlach and A. Haverich (2002). "Polymerized degradable hyaluronan--a platform for stent coating with inherent inhibitory effects on neointimal formation in a porcine coronary model." International Journal of Artificial Organs **25**(12): 1166-73.
- Hing, K. A. (2004). "Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?" Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences **362**(1825): 2821-2850.
- Hirsjarvi, S., L. Peltonen and J. Hirvonen (2006). "Layer-by-layer polyelectrolyte coating of low molecular weight poly(lactic acid) nanoparticles." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **49**(1): 93-99.
- Holmes, T. C., S. De Lacalle, X. Su, G. Liu, A. Rich and S. Zhang (2000). "Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(12): 6728-6733.
- Holst, B. and T. W. Schwartz (2003). "Molecular Mechanism of Agonism and Inverse Agonism in the Melanocortin Receptors. Zn²⁺ as a Structural and Functional Probe." Annals of the New York Academy of Sciences **994**(1): 1-11.
- Holy, C. E., C. Cheng, J. E. Davies and M. S. Shoichet (2001). "Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering." Biomaterials **22**(1): 25-31.
- Hoogeveen, N. G., M. A. Cohen Stuart, G. J. Fleer and M. R. Bohmer (1996). "Formation and Stability of Multilayers of Polyelectrolytes." Langmuir **12**(15): 3675-3681.
- Hubbell, J. A. (1999). "Bioactive biomaterials." Current Opinion in Biotechnology **10**(2): 123-9.
- Hübsch, E., V. Ball, B. Senger, G. Decher, J. C. Voegel and P. Schaaf (2004). "Controlling the Growth Regime of Polyelectrolyte Multilayer Films: Changing from Exponential

-
- to Linear Growth by Adjusting the Composition of Polyelectrolyte Mixtures." Langmuir **20**(5): 1980-1985.
- Huizing, M. T., H. Rosing, F. P. Koopmans and J. H. Beijnen (1998). "Influence of Cremophor EL on the quantification of paclitaxel in plasma using high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction as sample pretreatment." Journal of Chromatography B **709**(1): 161-165.
- Hwang, J. J., S. Jelacic, N. T. Samuel, R. V. Maier, C. T. Campbell, D. G. Castner, A. S. Hoffman and P. S. Stayton (2005). "Monocyte activation on polyelectrolyte multilayers." Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition **16**(2): 237-51.
- Hyung Park, J., S. Kwon, M. Lee, H. Chung, J.-H. Kim, Y.-S. Kim, R.-W. Park, I.-S. Kim, S. Bong Seo, I. C. Kwon and S. Young Jeong (2006). "Self-assembled nanoparticles based on glycol chitosan bearing hydrophobic moieties as carriers for doxorubicin: In vivo biodistribution and anti-tumor activity." Biomaterials **27**(1): 119-126.
- Ikinci, G., S. Senel, H. Akincibay, S. Kas, S. Ercis, C. G. Wilson and A. A. Hincal (2002). "Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*." International Journal of Pharmaceutics **235**(1-2): 121-7.
- Iler, R. K. (1966). "Multilayers of colloidal particles." Journal of Colloid and Interface Science **21**(6): 569-594.
- Indolfi, C., A. Mongiardo, A. Curcio and D. Torella (2003). "Molecular mechanisms of in-stent restenosis and approach to therapy with eluting stents." Trends in Cardiovascular Medicine **13**(4): 142-8.
- Inoue, H., K. Sato and J. I. Anzai (2005). "Disintegration of layer-by-layer assemblies composed of 2-iminobiotin-labeled poly(ethyleneimine) and avidin." Biomacromolecules **6**(1): 27-29.
- Irie, T. and K. Uekama (1999). "Cyclodextrins in peptide and protein delivery." Advanced Drug Delivery Reviews **36**(1): 101-123.
- Ishaug, S. L., G. M. Crane, M. J. Miller, A. W. Yasko, M. J. Yaszemski and A. G. Mikos (1997). "Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds." Journal of Biomedical Materials Research **36**(1): 17-28.
- Jacobson, B. S. and D. Branton (1977). "Plasma membrane: Rapid isolation and exposure of the cytoplasmic surface by use of positively charged beads." Science **195**(4275): 302-304.
- Jagur-Grodzinski, J. (2006). "Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. Concise general review of recent studies." Polymers for Advanced Technologies **17**(6): 395-418.
-

-
- Jessel, N., F. Atalar, P. Lavalley, J. Mutterer, G. Decher, P. Schaaf, J. C. Voegel and J. Ogier (2003). "Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins." Advanced Materials **15**(9): 692-695.
- Jessel, N., M. Oulad-Abdeighani, F. Meyer, P. Lavalley, Y. Haïkel, P. Schaaf and J. C. Voegel (2006). "Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by beta-cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(23): 8618-8621.
- Jessel, N. B., P. Schwinté, R. Donohue, P. Lavalley, F. Boulmedais, R. Darcy, B. Szalontai, J. C. Voegel and J. Ogier (2004). "Pyridylamino-beta-cyclodextrin as a molecular chaperone for lipopolysaccharide embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture." Advanced Functional Materials **14**(10): 963-969.
- Jiao, Y., N. Ubrich, M. Marchand-Arvier, C. Vigneron, M. Hoffman, T. Lecompte and P. Maincent (2002). "In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits." Circulation **105**(2): 230-235.
- Jisr, R. M., H. H. Rmaile and J. B. Schlenoff (2005). "Hydrophobic and ultrahydrophobic multilayer thin films from perfluorinated polyelectrolytes." Angewandte Chemie-International Edition **44**(5): 782-785.
- Jo, S. and K. Park (2000). "Surface modification using silanated poly(ethylene glycol)s." Biomaterials **21**(6): 605-616.
- Johnson, C. W. (1978). "Circular Dichroism Spectroscopy and the Vacuum Ultraviolet Region." Annual Review of Physical Chemistry **29**(1): 93-114.
- Jordan, S. W., K. M. Faucher, J. M. Caves, R. P. Apkarian, S. S. Rele, X.-L. Sun, S. R. Hanson and E. L. Chaikof (2006). "Fabrication of a phospholipid membrane-mimetic film on the luminal surface of an ePTFE vascular graft." Biomaterials **27**(18): 3473-3481.
- Jourdainne, L., Y. Arntz, B. Senger, C. Debry, J. C. Voegel, P. Schaaf and P. Lavalley (2007). "Multiple strata of exponentially growing polyelectrolyte multilayer films." Macromolecules **40**(2): 316-321.
- Jürgens, C., A. Schulz, T. Porté, M. Faschingbauer and K. Seide (2006). "Biodegradable Films in Trauma and Orthopedic Surgery." European Journal of Trauma **32**(2): 160-171.
- Kelly, S. M. and N. C. Price (2000). "The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function." Current Protein and Peptide Science **1**: 349-384.
- Kenausis, G. L., J. Voros, D. L. Elbert, N. P. Huang, R. Hofer, L. Ruiz-Taylor, M. Textor, J. A. Hubbell and N. D. Spencer (2000). "Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) layers on metal oxide surfaces: Attachment mechanism and effects of polymer architecture on resistance to protein adsorption." Journal of Physical Chemistry B **104**(14): 3298-3309.

-
- Kim, D. S., S. H. Park and K. C. Park (2004). "Transforming growth factor-beta1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation." International Journal of Biochemistry and Cell Biology **36**(8): 1482-91.
- Koktysh, D. S., X. R. Liang, B. G. Yun, I. Pastoriza-Santos, R. L. Matts, M. Giersig, C. Serra-Rodriguez, L. M. Liz-Marzan and N. A. Kotov (2002). "Biomaterials by design: Layer-by-layer assembled ion-selective and biocompatible films of TiO₂ nanoshells for neurochemical monitoring." Advanced Functional Materials **12**(4): 255-265.
- Koper, J. W., M. Lopes-Cardozo, H. J. Romijn and L. M. G. van Golde (1984). "Culture of rat cerebral oligodendrocytes in a serum-free, chemically defined medium." Journal of Neuroscience Methods **10**(2): 157-169.
- Kotov, N. A. (1999). "Layer-by-layer self-assembly: The contribution of hydrophobic interactions." Nanostructured Materials **12**(5-8): 789-796.
- Krouglova, T., J. Vercammen and Y. Engelborghs (2004). "Correct diffusion coefficients of proteins in fluorescence correlation spectroscopy. Application to tubulin oligomers induced by Mg²⁺ and paclitaxel." Biophysical Journal **87**(4): 2635-2646.
- Kumar, M. N. V. R., R. A. A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa and A. J. Domb (2004). "Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives." Chemical Reviews **104**(12): 6017-6084.
- Kuo, C. K., W. J. Li, R. L. Mauck and R. S. Tuan (2006). "Cartilage tissue engineering: its potential and uses." Current Opinion in Rheumatology **18**(1): 64-73.
- La Rocca, P. and S. Barker (1996). "Tissue culture surface treatments." The Cell Line **2**: 1-6.
- Ladam, G., P. Schaad, J. C. Voegel, P. Schaaf, G. Decher and F. Cuisinier (2000). "In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers." Langmuir **16**(3): 1249-1255.
- Ladam, G., P. Schaaf, F. J. G. Cuisinier, G. Decher and J.-C. Voegel (2001). "Protein Adsorption onto Auto-Assembled Polyelectrolyte Films." Langmuir **17**(3): 878-882.
- Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). "Tissue engineering." Science **260**(5110): 920-6.
- Langmuir, I. (1917). "The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. LIQUIDS." Journal of the American Chemical Society **39**(9): 1848-1906.
- Lapcik, L. J. a. L., L. Lapcik, S. De Smedt, J. Demeester and P. Chabreck (1998). "Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications." Chemical Reviews **98**(8): 2663-2684.
- Laugel, N., C. Betscha, M. Winterhalter, J. C. Voegel, P. Schaaf and V. Ball (2006). "Relationship between the growth regime of polyelectrolyte multilayers and the polyanion/polycation complexation enthalpy." Journal of Physical Chemistry B **110**(39): 19443-19449.
-

-
- Laurent, T. C. (1998). The chemistry, biology, and medical applications of hyaluronan and its derivatives. London, Portland Press.
- Lavalle, P., F. Boulmedais, V. Ball, J. Mutterer, P. Schaaf and J.-C. Voegel (2005). "Free standing membranes made of biocompatible polyelectrolytes using the layer by layer method." Journal of Membrane Science **253**: 49-56.
- Lavalle, P., C. Gergely, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, J. C. Voegel and C. Picart (2002). "Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: An in situ atomic force microscopy study." Macromolecules **35**(11): 4458-4465.
- Lavalle, P., C. Picart, J. Mutterer, C. Gergely, H. Reiss, J.-C. Voegel, B. Senger and P. Schaaf (2004a). "Modeling the build-up of polyelectrolyte multilayer films having exponential growth." Journal of Physical Chemistry B **108**(2): 636-648.
- Lavalle, P., V. Vivet, N. Jessel, G. Decher, J. C. Voegel, P. J. Mesini and P. Schaaf (2004b). "Direct evidence for vertical diffusion and exchange processes of polyanions and polycations in polyelectrolyte multilayer films." Macromolecules **37**(3): 1159-1162.
- Le Guen, E., A. Chassepot, G. Decher, P. Schaaf, J. C. Voegel and N. Jessel (2007). "Bioactive coatings based on polyelectrolyte multilayer architectures functionalized by embedded proteins, peptides or drugs." Biomolecular Engineering **24**(1): 33-41.
- Lee, D. A., T. Reisler and D. L. Bader (2003). "Expansion of chondrocytes for tissue engineering in alginate beads enhances chondrocytic phenotype compared to conventional monolayer techniques." Acta Orthopaedica Scandinavica **74**: 6-15.
- Lee, K.-H. and C. C. Chu (2000). "The role of superoxide ions in the degradation of synthetic absorbable sutures." Journal of Biomedical Materials Research **49**(1): 25-35.
- Lee, K. Y., K. H. Bouhadir and D. J. Mooney (2004). "Controlled degradation of hydrogels using multi-functional cross-linking molecules." Biomaterials **25**(13): 2461-6.
- Lee, K. Y. and D. J. Mooney (2001). "Hydrogels for Tissue Engineering." Chemical Reviews **101**(7): 1869-1880.
- Lee, S.-H. and H. Shin (2007). "Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering." Advanced Drug Delivery Reviews **59**(4-5): 339-359.
- Lee, S. S., J. D. Hong, C. H. Kim, K. Kim, J. P. Koo and K. B. Lee (2001). "Layer-by-Layer Deposited Multilayer Assemblies of Ionene-Type Polyelectrolytes Based on the Spin-Coating Method." Macromolecules **34**(16): 5358-5360.
- Legeros, R. Z., S. Lin, R. Rohanizadeh, D. Mijares and J. P. Legeros (2003). "Biphasic calcium phosphate bioceramics: Preparation, properties and applications." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **14**(3): 201-209.
-

-
- Leiggener, C. S., R. Curtis, A. A. Muller, D. Pfluger, S. Gogolewski and B. A. Rahn (2006). "Influence of copolymer composition of polylactide implants on cranial bone regeneration." Biomaterials **27**(2): 202-7.
- Leporatti, S., C. Gao, A. Voigt, E. Donath and H. Möhwald (2001). "Shrinking of ultrathin polyelectrolyte multilayer capsules upon annealing: A confocal laser scanning microscopy and scanning force microscopy study." European Physical Journal E **5**(1): 13-20.
- LeRoux, M. A., F. Guilak and L. A. Setton (1999). "Compressive and shear properties of alginate gel: Effects of sodium ions and alginate concentration." Journal of Biomedical Materials Research **47**(1): 46-53.
- Levenberg, S., J. S. Golub, M. Amit, J. Itskovitz-Eldor and R. Langer (2002). "Endothelial cells derived from human embryonic stem cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(7): 4391-6.
- Levenberg, S., N. F. Huang, E. Lavik, A. B. Rogers, J. Itskovitz-Eldor and R. Langer (2003). "Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(22): 12741-12746.
- Li, J., L. Li, H. Yu, H. Cao, C. Gao and Y. Gong (2006). "Growth and metabolism of human hepatocytes on biomodified collagen poly(lactic-co-glycolic acid) three-dimensional scaffold." ASAIO Journal **52**(3): 321-327.
- Li, S. M. (1999). "Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids." Journal of Biomedical Materials Research **48**(3): 342-353.
- Lipton, J. M. and A. Catania (1997). "Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator alpha-MSH." Immunology Today **18**(3): 140-145.
- Lo, C. M., H. B. Wang, M. Dembo and Y. L. Wang (2000). "Cell movement is guided by the rigidity of the substrate." Biophysical Journal **79**(1): 144-52.
- Loftsson, T. and M. E. Brewster (1996). "Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization." Journal of Pharmaceutical Sciences **85**(10): 1017-25.
- Loh, X. J. and J. Li (2007). "Biodegradable thermosensitive copolymer hydrogels for drug delivery." Expert Opinion on Therapeutic Patents **17**(8): 965-977.
- Lu, L., C. A. Garcia and A. G. Mikos (1999). "In vitro degradation of thin poly(DL-lactic-co-glycolic acid) films." Journal of Biomedical Materials Research **46**(2): 236-44.
- Lu, L., S. J. Peter, M. D. Lyman, H. L. Lai, S. M. Leite, J. A. Tamada, S. Uyama, J. P. Vacanti, R. Langer and A. G. Mikos (2000). "In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams." Biomaterials **21**(18): 1837-1845.

-
- Lu, L. C., M. J. Yaszemski and A. G. Mikos (2001). "Retinal pigment epithelium engineering using synthetic biodegradable polymers." Biomaterials **22**(24): 3345-3355.
- Luo, Y., K. R. Kirker and G. D. Prestwich (2000). "Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery." Journal of Controlled Release **69**(1): 169-184.
- Lvov, Y., A. A. Antipov, A. Mamedov, H. Möhwald and G. B. Sukhorukov (2001). "Urease Encapsulation in Nanoorganized Microshells." Nano Letters **1**(3): 125-128.
- Lvov, Y., K. Ariga, I. Ichinose and T. Kunitake (1995). "Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption." Journal of the American Chemical Society **117**(22): 6117-6123.
- Lvov, Y., K. Ariga, M. Onda, I. Ichinose and T. Kunitake (1999). "A careful examination of the adsorption step in the alternate layer-by-layer assembly of linear polyanion and polycation." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **146**(1-3): 337-346.
- Lvov, Y., G. Decher and H. Möhwald (1993). "Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine)." Langmuir **9**(2): 481-486.
- Lvov, Y., H. Haas, G. Decher, H. Möhwald, A. Mikhailov, B. Mtchedlishvily, E. Morgunova and B. Vainshtein (1994). "Successive deposition of alternate layers of polyelectrolytes and a charged virus." Langmuir **10**(11): 4232-4236.
- Mallwitz, F. and A. Laschewsky (2005). "Direct access to stable, freestanding polymer membranes by layer-by-layer assembly of polyelectrolytes." Advanced Materials **17**(10): 1296-1299.
- Mamedov, A. A., N. A. Kotov, M. Prato, D. M. Guldi, J. P. Wicksted and A. Hirsch (2002). "Molecular design of strong single-wall carbon nanotube/polyelectrolyte multilayer composites." Nature Materials **1**(3): 190-194.
- Mauduit, J., N. Bukh and M. Vert (1993). "Gentamycin/poly (lactic acid) blends aimed at sustained release local antibiotic therapy administered per-operatively. III. The case of gentamycin sulfate in films prepared from high and low molecular weight poly (DL-lactic acids)." Journal of Controlled Release **25**(1-2): 43-49.
- Mayhall, E. A., N. Paffett-Lugassy and L. I. Zon (2004). "The clinical potential of stem cells." Current Opinion in Cell Biology **16**(6): 713-20.
- Mazia, D., G. Schatten and W. Sale (1975). "Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy." Journal of Cell Biology **66**(1): 198-200.
- McAloney, R. A., M. Sinyor, V. Dudnik and M. C. Goh (2001). "Atomic force microscopy studies of salt effects on polyelectrolyte multilayer film morphology." Langmuir **17**(21): 6655-6663.
-

-
- McKeehan, W. L. (1984). Methods for preparation of media, supplements, and substrata for serum-free animal cell culture. New York, Alan R. Liss, Inc.
- McKeehan, W. L. and R. G. Ham (1976). "Stimulation of clonal growth of normal fibroblasts with substrata coated with basic polymers." Journal of Cell Biology **71**(3): 727-34.
- Meinel, L., R. Fajardo, S. Hofmann, R. Langer, J. Chen, B. Snyder, G. Vunjak-Novakovic and D. Kaplan (2005). "Silk implants for the healing of critical size bone defects." Bone **37**(5): 688-698.
- Mertz, D., J. Hemmerle, J. Mutterer, S. Ollivier, J. C. Voegel, P. Schaaf and P. Lavallo (2007). "Mechanically responding nanovalves based on polyelectrolyte multilayers." Nano Letters **7**(3): 657-662.
- Michel, M., D. Vautier, J.-C. Voegel, P. Schaaf and V. Ball (2004). "Layer by Layer Self-Assembled Polyelectrolyte Multilayers with Embedded Phospholipid Vesicles." Langmuir **20**(12): 4835-4839.
- Mikos, A. G., G. Sarakinos, S. M. Leite, J. P. Vacanti and R. Langer (1993). "Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering." Biomaterials **14**(5): 323-330.
- Milross, C. G., K. A. Mason, N. R. Hunter, W. K. Chung, L. J. Peters and L. Milas (1996). "Relationship of mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel." Journal of the National Cancer Institute **88**(18): 1308-14.
- Mollinedo, F. and C. Gajate (2003). "Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis." Apoptosis **8**(5): 413-50.
- Mooney, D. J., C. L. Mazzoni, C. Breuer, K. McNamara, D. Hern, J. P. Vacanti and R. Langer (1996). "Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering." Biomaterials **17**(2): 115-24.
- Netzer, L. and J. Sagiv (1983). "A new approach to construction of artificial monolayer assemblies." Journal of the American Chemical Society **105**(3): 674-676.
- Norris, P., M. Noble, I. Francolini, A. M. Vinogradov, P. S. Stewart, B. D. Ratner, J. W. Costerton and P. Stoodley (2005). "Ultrasonically controlled release of ciprofloxacin from self-assembled coatings on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm prevention." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **49**(10): 4272-9.
- O'Keeffe, F., S. A. Shamsi, R. Darcy, P. Schwinte and I. M. Warner (1997). "A persubstituted cationic beta-cyclodextrin for chiral separations." Analytical Chemistry **69**(23): 4773-82.
- Olabarrieta, I., D. Forsstrom, U. W. Gedde and M. S. Hedenqvist (2001). "Transport properties of chitosan and whey blended with poly(epsilon-caprolactone) assessed by standard permeability measurements and microcalorimetry." Polymer **42**(9): 4401-4408.
-

-
- Onda, M., K. Ariga and T. Kunitake (1999). "Activity and stability of glucose oxidase in molecular films assembled alternately with polyions." Journal of Bioscience and Bioengineering **87**(1): 69-75.
- Orive, G., S. K. Tam, J. L. Pedraz and J. P. Halle (2006). "Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy." Biomaterials **27**(20): 3691-3700.
- Oshima, Y., N. Watanabe, K.-i. Matsuda, S. Takai, M. Kawata and T. Kubo (2005). "Behavior of Transplanted Bone Marrow-derived GFP Mesenchymal Cells in Osteochondral Defect as a Simulation of Autologous Transplantation." Journal of Histochemistry and Cytochemistry **53**(2): 207-216.
- Pajulo, O. T., K. J. Pulkki, K. K. Lertola, M. S. Alanen, M. S. Reunanen, R. V. Virtanen, A. I. Mattila-Vuori and J. A. Viljanto (2001). "Hyaluronic acid in incision wound fluid: a clinical study with the Cellstick device in children." Wound Repair and Regeneration **9**(3): 200-4.
- Pargaonkar, N., Y. M. Lvov, N. Li, J. H. Steenekamp and M. M. de Villiers (2005). "Controlled release of dexamethasone from microcapsules produced by polyelectrolyte layer-by-layer nanoassembly." Pharmaceutical Research **22**(5): 826-835.
- Park, G. E., M. A. Pattison, K. Park and T. J. Webster (2005a). "Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds." Biomaterials **26**(16): 3075-3082.
- Park, H., J. S. Temenoff, Y. Tabata, A. I. Caplan and A. G. Mikos (2007a). "Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering." Biomaterials **28**(21): 3217-3227.
- Park, J. H., M. L. Ye and K. Park (2005b). "Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs." Molecules **10**(1): 146-161.
- Park, J. S., J. M. Kim, S. J. Lee, S. G. Lee, Y. K. Jeong, S. E. Kim and S. C. Lee (2007b). "Surface hydrolysis of fibrous poly(ϵ -caprolactone) scaffolds for enhanced osteoblast adhesion and proliferation." Macromolecular Research **15**(5): 424-429.
- Park, K. H., K. Na and H. M. Chung (2005c). "Enhancement of the adhesion of fibroblasts by peptide containing an Arg-Gly-Asp sequence with poly(ethylene glycol) into a thermo-reversible hydrogel as a synthetic extracellular matrix." Biotechnology Letters **27**(4): 227-231.
- Park, T. G. (1995). "Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition." Biomaterials **16**(15): 1123-30.
- Parry, M. F. and R. Wallach (1974). "Ethylene glycol poisoning." American Journal of Medicine **57**(1): 143-150.
-

-
- Pastoriza-Santos, I., B. Scholer and F. Caruso (2001). "Core-shell colloids and hollow polyelectrolyte capsules based on diazoresins." Advanced Functional Materials **11**(2): 122-128.
- Pavoor, P. V., B. P. Gearing, O. Muratoglu, R. E. Cohen and A. Bellare (2006). "Wear reduction of orthopaedic bearing surfaces using polyelectrolyte multilayer nanocoatings." Biomaterials **27**(8): 1527-1533.
- Peattie, R. A., E. R. Rieke, E. M. Hewett, R. J. Fisher, X. Z. Shu and G. D. Prestwich (2006). "Dual growth factor-induced angiogenesis in vivo using hyaluronan hydrogel implants." Biomaterials **27**(9): 1868-1875.
- Pelham, R. J. and Y. L. Wang (1997). "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(25): 13661-13665.
- Peterson, L., T. Minas, M. Brittberg and A. Lindahl (2003). "Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years." Journal of Bone and Joint Surgery **85-A Suppl 2**: 17-24.
- Peyman, G. A., D. Yang, B. Khoobehi, M. H. Rahimy and S. Y. Chin (1996). "In vitro evaluation of polymeric matrix and porous biodegradable reservoir devices for slow-release drug delivery." Ophthalmic Surgery and Lasers **27**(5): 384-391.
- Picart, C., R. Elkaim, L. Richert, T. Audoin, Y. Arntz, M. D. Cardoso, P. Schaaf, J. C. Voegel and B. Frisch (2005a). "Primary cell adhesion on RGD-functionalized and covalently crosslinked thin polyelectrolyte multilayer films." Advanced Functional Materials **15**(1): 83-94.
- Picart, C., P. Lavalle, P. Hubert, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf and J. C. Voegel (2001). "Buildup mechanism for poly(L-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface." Langmuir **17**(23): 7414-7424.
- Picart, C., J. Mutterer, L. Richert, Y. Luo, G. D. Prestwich, P. Schaaf, J. C. Voegel and P. Lavalle (2002). "Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(20): 12531-12535.
- Picart, C., A. Schneider, O. Etienne, J. Mutterer, P. Schaaf, C. Egles, N. Jessel and J. C. Voegel (2005b). "Controlled degradability of polysaccharide multilayer films in vitro and in vivo." Advanced Functional Materials **15**(11): 1771-1780.
- Poptoshev, E., B. Schoeler and F. Caruso (2004). "Influence of solvent quality on the growth of polyelectrolyte multilayers." Langmuir **20**(3): 829-34.
- Porcel, C., P. Lavalle, G. Decher, B. Senger, J. C. Voegel and P. Schaaf (2007). "Influence of the Polyelectrolyte Molecular Weight on Exponentially Growing Multilayer Films in the Linear Regime." Langmuir **23**(4): 1898-1904.
-

-
- Porcel, C. H., A. Izquierdo, V. Ball, G. Decher, J.-C. Voegel and P. Schaaf (2005). "Ultrathin coatings and (poly(glutamic acid)/polyallylamine) films deposited by continuous and simultaneous spraying." Langmuir **21**(2): 800-802.
- Pouton, C. W., P. Lucas, B. J. Thomas, A. N. Uduehi, D. A. Milroy and S. H. Moss (1998). "Polycation-DNA complexes for gene delivery: A comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids." Journal of Controlled Release **53**(1-3): 289-299.
- Quinn, J. F., J. C. C. Yeo and F. Caruso (2004). "Layer-by-layer assembly of nanoblended thin films: Poly(allylamine hydrochloride) and a binary mixture of a synthetic and natural polyelectrolyte." Macromolecules **37**(17): 6537-6543.
- Ram, M. K., P. Bertoncello, H. Ding, S. Paddeu and C. Nicolini (2001). "Cholesterol biosensors prepared by layer-by-layer technique." Biosensors and Bioelectronics **16**(9-12): 849-856.
- Rao, C. S., J. J. Chu, R. S. Liu and Y. K. Lai (1998). "Synthesis and evaluation of [¹⁴C]-labelled and fluorescent-tagged paclitaxel derivatives as new biological probes." Bioorganic and Medicinal Chemistry **6**(11): 2193-2204.
- Ratner, B. D. (1996). "The engineering of biomaterials exhibiting recognition and specificity." Journal of Molecular Recognition **9**(5-6): 617-25.
- Ratner, B. D. and S. J. Bryant (2004). "BIOMATERIALS: Where We Have Been and Where We are Going." Annual Review of Biomedical Engineering **6**(1): 41-75.
- Ravivarapu, H. B., K. Burton and P. P. DeLuca (2000). "Polymer and microsphere blending to alter the release of a peptide from PLGA microspheres." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **50**(2): 263-270.
- Ray, P. K., T. Das, G. Sa, A. K. Ghosh and S. Chattopadhyay (2000). "Protection of apoptotic cell death by protein A." Apoptosis **5**(6): 509-514.
- Reed, A. M. and D. K. Gilding (1981). "Biodegradable polymers for use in surgery - poly(glycolic)/poly(lactic acid) homo and copolymers - 2. in vitro degradation." Polymer **22**(4): 494-498.
- Ren, K., J. Ji and J. Shen (2006). "Construction and enzymatic degradation of multilayered poly-l-lysine/DNA films." Biomaterials **27**(7): 1152-1159.
- Richert, L., Y. Arntz, P. Schaaf, J. C. Voegel and C. Picart (2004a). "pH dependent growth of poly(L-lysine)/poly(L-glutamic) acid multilayer films and their cell adhesion properties." Surface Science **570**(1-2): 13-29.
- Richert, L., F. Boulmedais, P. Lavalle, J. Mutterer, E. Ferreux, G. Decher, P. Schaaf, J.-C. Voegel and C. Picart (2004b). "Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking." Biomacromolecules **5**(2): 284-294.
-

-
- Richert, L., P. Lavalle, E. Payan, X. S. Zheng, G. D. Prestwich, J.-F. Stoltz, P. Schaaf, J.-C. Voegel and C. Picart (2004c). "Layer by layer buildup of polysaccharide films : physical chemistry and cellular adhesion aspects." Langmuir **20**: 448-458.
- Rmaile, H. H. and J. B. Schlenoff (2003). "Optically active polyelectrolyte multilayers as membranes for chiral separations." Journal of the American Chemical Society **125**(22): 6602-6603.
- Rodahl, M. and B. Kasemo (1996a). "Frequency and dissipation-factor responses to localized liquid deposits on a QCM electrode." Sensors and Actuators, B: Chemical **37**(1-2): 111-116.
- Rodahl, M. and B. Kasemo (1996b). "A simple setup to simultaneously measure the resonant frequency and the absolute dissipation factor of a quartz crystal microbalance." Review of Scientific Instruments **67**(9): 3238-3241.
- Rogach, A. L., D. S. Koktysh, M. Harrison and N. A. Kotov (2000). "Layer-by-layer assembled films of HgTe nanocrystals with strong infrared emission." Chemistry of Materials **12**(6): 1526-1528.
- Ruoslahti, E. (2003). "The RGD story: a personal account." Matrix Biology **22**(6): 459-465.
- Ruths, J., F. Essler, G. Decher and H. Riegler (2000). "Polyelectrolytes I: Polyanion/Polycation Multilayers at the Air/Monolayer/Water Interface as Elements for Quantitative Polymer Adsorption Studies and Preparation of Hetero-superlattices on Solid Surfaces." Langmuir **16**(23): 8871-8878.
- Ryser, H. J., I. Drummond and W. C. Shen (1982). "The cellular uptake of horseradish peroxidase and its poly(lysine) conjugate by cultured fibroblasts is qualitatively similar despite a 900-fold difference in rate." Journal of Cellular Physiology **113**(1): 167-78.
- Ryser, H. J. and W. C. Shen (1978). "Conjugation of methotrexate to poly(L-lysine) increases drug transport and overcomes drug resistance in cultured cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **75**(8): 3867-70.
- Sakiyama-Elbert, S. E. and J. A. Hubbell (2001). "FUNCTIONAL BIOMATERIALS: Design of Novel Biomaterials." Annual Review of Materials Research **31**(1): 183-201.
- Salloum, D. S., S. G. Olenych, T. C. S. Keller and J. B. Schlenoff (2005). "Vascular Smooth Muscle Cells on Polyelectrolyte Multilayers: Hydrophobicity-Directed Adhesion and Growth." Biomacromolecules **6**(1): 161-167.
- Salomaki, M., P. Tervasmaki, S. Areva and J. Kankare (2004). "The Hofmeister anion effect and the growth of polyelectrolyte multilayers." Langmuir **20**(9): 3679-3683.
- Salomaki, M., I. A. Vinokurov and J. Kankare (2005). "Effect of Temperature on the Buildup of Polyelectrolyte Multilayers." Langmuir **21**(24): 11232-11240.
-

-
- Salomäki, M., I. A. Vinokurov and J. Kankare (2005). "Effect of temperature on the buildup of polyelectrolyte multilayers." Langmuir **21**(24): 11232-11240.
- Sanchez-Mas, J., C. Hahmann, I. Gerritsen, J. C. Garcia-Borron and C. Jimenez-Cervantes (2004). "Agonist-independent, high constitutive activity of the human melanocortin 1 receptor." Pigment Cell Research **17**(4): 386-395.
- Sander, E. A., A. M. Alb, E. A. Nauman, W. F. Reed and K. C. Dee (2004). "Solvent effects on the microstructure and properties of 75/25 poly(D,L-lactide-co-glycolide) tissue scaffolds." Journal of Biomedical Materials Research Part A **70A**(3): 506-513.
- Sangribsub, S., P. Tangboriboonrat, T. Pith and G. Decher (2005). "Hydrophobization of multilayered film containing layer-by-layer assembled nanoparticle by Nafion adsorption." Polymer Bulletin **53**(5-6): 425-434.
- Sawyer, T. K., P. J. Sanfilippo, V. J. Hruby, M. H. Engel, C. B. Heward, J. B. Burnett and M. E. Hadley (1980). "4-Norleucine, 7-D-phenylalanine-alpha-melanocyte-stimulating hormone: a highly potent alpha-melanotropin with ultralong biological activity." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **77**(10): 5754-8.
- Schlenoff, J. B., S. T. Dubas and T. Farhat (2000). "Sprayed polyelectrolyte multilayers." Langmuir **16**(26): 9968-9969.
- Schneider, A., G. Francius, R. Obeid, P. Schwinté, J. Hemmerle, B. Frisch, P. Schaaf, J. C. Voegel, B. Senger and C. Picart (2006). "Polyelectrolyte multilayers with a tunable Young's modulus: Influence of film stiffness on cell adhesion." Langmuir **22**(3): 1193-1200.
- Schneider, A., C. Vodouhê, L. Richert, G. Francius, E. Le Guen, P. Schaaf, J. C. Voegel, B. Frisch and C. Picart (2007). "Multifunctional polyelectrolyte multilayer films: combining mechanical resistance, biodegradability, and bioactivity." Biomacromolecules **8**(1): 139-45.
- Schneider, S., P. J. Feilen, V. Slotty, D. Kampfner, S. Preuss, S. Berger, J. Beyer and R. Pommersheim (2001). "Multilayer capsules: a promising microencapsulation system for transplantation of pancreatic islets." Biomaterials **22**(14): 1961-1970.
- Schultz, P., D. Vautier, L. Richert, N. Jessel, Y. Haïkel, P. Schaaf, J.-C. Voegel, J. Ogier and C. Debry (2005). "Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide, alpha-MSH, for coating a tracheal prosthesis." Biomaterials **26**(15): 2621-2630.
- Schwarz, S., K. J. Eichhorn, E. Wischerhoff and A. Laschewsky (1999). "Polyelectrolyte adsorption onto planar surfaces: a study by streaming potential and ellipsometry measurements." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **159**(2-3): 491-501.
-

-
- Schwinté, P., V. Ball, B. Szalontai, Y. Häikel, J. C. Voegel and P. Schaaf (2002). "Secondary Structure of Proteins Adsorbed onto or Embedded in Polyelectrolyte Multilayers." Biomacromolecules **3**(6): 1135-1143.
- Scott, J. E. and F. Heatley (2002). "Biological properties of hyaluronan in aqueous solution are controlled and sequestered by reversible tertiary structures, defined by NMR spectroscopy." Biomacromolecules **3**(3): 547-553.
- Serizawa, T., M. Yamaguchi and M. Akashi (2002). "Alternating Bioactivity of Polymeric Layer-by-Layer Assemblies: Anticoagulation vs Procoagulation of Human Blood." Biomacromolecules **3**(4): 724-731.
- Serpe, M. J., K. A. Yarmey, C. M. Nolan and L. A. Lyon (2005). "Doxorubicin uptake and release from microgel thin films." Biomacromolecules **6**(1): 408-413.
- Sharma, S., R. W. Johnson and T. A. Desai (2004). "XPS and AFM analysis of antifouling PEG interfaces for microfabricated silicon biosensors." Biosensors and Bioelectronics **20**(2): 227-239.
- Shen, W. C. and H. J. Ryser (1978). "Conjugation of poly-L-lysine to albumin and horseradish peroxidase: a novel method of enhancing the cellular uptake of proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **75**(4): 1872-6.
- Shi, F., Z. Q. Wang, N. Zhao and X. Zhang (2005). "Patterned polyelectrolyte multilayer: Surface modification for enhancing selective adsorption." Langmuir **21**(4): 1599-1602.
- Shiratori, S. S. and M. F. Rubner (2000). "pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes." Macromolecules **33**(11): 4213-4219.
- Siegrist, W., D. H. Willard, W. O. Wilkison and A. N. Eberle (1996). "Agouti protein inhibits growth of B16 melanoma cells in vitro by acting through melanocortin receptors." Biochemical and Biophysical Research Communications **218**(1): 171-5.
- Sinha, V. R. and A. Trehan (2003). "Biodegradable microspheres for protein delivery." Journal of Controlled Release **90**(3): 261-280.
- Smyth, D. G., A. Nagamatsu and J. S. Fruton (1960). "Some Reactions of N-Ethylmaleimide." Journal of the American Chemical Society **82**(17): 4600-4604.
- Sophia, A., A. M. Christopher and M. P. Linda (2005). "Hyaluronan and Hyaluronan Synthases: Potential Therapeutic Targets in Cancer." Current Drug Targets - Cardiovascular & Hematological Disorders **5**: 3-14.
- Spagnoli, C., A. Korniaikov, A. Ulman, E. A. Balazs, Y. L. Lyubchenko and M. K. Cowman (2005). "Hyaluronan conformations on surfaces: effect of surface charge and hydrophobicity." Carbohydrate Research **340**(5): 929-941.
- Srivastava, A. K., K. P. Singh and P. K. Ray (1997). "Protein A induced protection against experimental candidiasis in mice." Mycopathologia **138**(1): 21-28.
-

-
- Srivastava, R. K., Q.-S. Mi, J. M. Hardwick and D. L. Longo (1999). "Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(7): 3775-3780.
- Stanecki, C. E., M. J. McShane, A. M. Hannibal, A. Watts and K. Driggers (2003). A Novel Biosensor for On-line Dialysis Monitoring. Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology - Proceedings.
- Stason, W. B., M. Vallotton and E. Haber (1967). "Synthesis of an antigenic copolymer of angiotensin and succinylated poly-L-lysine." Biochimica et Biophysica Acta **133**(3): 582-4.
- Stevens, M. M., R. P. Marini, I. Martin, R. Langer and V. P. Shastri (2004). "FGF-2 enhances TGF-beta 1-induced periosteal chondrogenesis." Journal of Orthopaedic Research **22**(5): 1114-1119.
- Stoltz, J. F., D. Bensoussan, V. Decot, P. Netter, A. Ciree and P. Gillet (2006). "Cell and tissue engineering and clinical applications: An overview." Bio-Medical Materials and Engineering **16**(4 SUPPL.).
- Stroeve, P., V. Vasquez, M. A. N. Coelho and J. F. Rabolt (1996). "Gas transfer in supported films made by molecular self-assembly of ionic polymers." Thin Solid Films **284-285**: 708-712.
- Sui, Z. and J. B. Schlenoff (2003). "Controlling electroosmotic flow in microchannels with pH-responsive polyelectrolyte multilayers." Langmuir **19**(19): 7829-7831.
- Sukhorukov, G. B., E. Donath, S. Davis, H. Lichtenfeld, F. Caruso, V. I. Popov and H. Möhwald (1998). "Stepwise polyelectrolyte assembly on particle surfaces: a novel approach to colloid design." Polymers for Advanced Technologies **9**(10-11): 759-767.
- Sultana, N., J. B. Schenkman and J. F. Rusling (2005). "Protein film electrochemistry of microsomes genetically enriched in human cytochrome P450 monooxygenases." Journal of the American Chemical Society **127**(39): 13460-13461.
- Swanson, N., K. Hogrefe, Q. Javed and A. H. Gershlick (2003). "In vitro evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF)-eluting stents." International Journal of Cardiology **92**(2-3): 247-251.
- Sykes, P. (1975). A guidebook to mechanism in organic chemistry. . London, Longman Group Ltd.: 232-239.
- Taherzadeh, S., S. Sharma, V. Chhajlani, I. Gantz, N. Rajora, M. T. Demitri, L. Kelly, H. Zhao, T. Ichiyama, A. Catania and J. M. Lipton (1999). "Alpha-MSH and its receptors in regulation of tumor necrosis factor-alpha production by human monocyte/macrophages." American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology **276**(5 45-5).
- Talja, M., T. Valimaa, T. Tammela, A. Petas and P. Tormala (1997). "Bioabsorbable and biodegradable stents in urology." Journal of Endourology **11**(6): 391-7.
-

-
- Tang, Z., N. A. Kotov, S. Magonov and B. Ozturk (2003). "Nanostructured artificial nacre." Nature Materials **2**(6): 413-8.
- Tang, Z. Y., Y. Wang, P. Podsiadlo and N. A. Kotov (2006). "Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering." Advanced Materials **18**(24): 3203-3224.
- Tateishi, T., G. Chen and T. Ushida (2002). "Biodegradable porous scaffolds for tissue engineering." Journal of Artificial Organs **5**(2): 77-83.
- Tay, A. G., J. Farhadi, R. Suetterlin, G. Pierer, M. Heberer and I. Martin (2004). "Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes." Tissue Engineering **10**(5-6): 762-70.
- Tezcaner, A., D. Hicks, F. Boulmedais, J. Sahel, P. Schaaf, J.-C. Voegel and P. Lavallo (2006). "Polyelectrolyte multilayer films as substrates for photoreceptor cells." Biomacromolecules **7**(1): 86-94.
- Thierry, B., P. Kujawa, C. Tkaczyk, F. M. Winnik, L. Bilodeau and M. Tabrizian (2005). "Delivery platform for hydrophobic drugs: Prodrug approach combined with self-assembled multilayers." Journal of the American Chemical Society **127**(6): 1626-1627.
- Thierry, B., F. M. Winnik, Y. Merhi, J. Silver and M. Tabrizian (2003a). "Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers." Biomacromolecules **4**(6): 1564-1571.
- Thierry, B., F. M. Winnik, Y. Merhi and M. Tabrizian (2003b). "Nanocoatings onto arteries via layer-by-layer deposition: Toward the in vivo repair of damaged blood vessels." Journal of the American Chemical Society **125**(25): 7494-7495.
- Thompson, M. T., M. C. Berg, I. S. Tobias, M. F. Rubner and K. J. Van Vliet (2005). "Tuning compliance of nanoscale polyelectrolyte multilayers to modulate cell adhesion." Biomaterials **26**(34): 6836-6845.
- Thomson, R. C., A. G. Mikos, E. Beahm, J. C. Lemon, W. C. Satterfield, T. B. Aufdemorte and M. J. Miller (1999). "Guided tissue fabrication from periosteum using preformed biodegradable polymer scaffolds." Biomaterials **20**(21): 2007-2018.
- Tognana, E., A. Borriero, C. De Luca and A. Pavesio (2007). "Hyalograft C: hyaluronan-based scaffolds in tissue-engineered cartilage." Cells Tissues Organs **186**(2): 97-103.
- Tryoen-Toth, P., D. Vautier, Y. Häikel, J.-C. Voegel, P. Schaaf, J. Chluba and J. Ogier (2002). "Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films." Journal of Biomedical Materials Research **60**(4): 657-667.
- Tsatmali, M., J. Ancans and A. J. Thody (2002). "Melanocyte function and its control by melanocortin peptides." Journal of Histochemistry and Cytochemistry **50**(2): 125-33.
-

-
- Ueda, Y., E. Walsh, H. Nakanishi and K. Yoshida (1994). "A colorimetric assay method for the evaluation of neurotrophic activity in vitro." Neuroscience Letters **165**(1-2): 203-207.
- Vautier, D., V. Karsten, C. Egles, J. Chluba, P. Schaaf, J.-C. Voegel and J. Ogier (2002). "Polyelectrolyte multilayer films modulate cytoskeletal organization in chondrosarcoma cells." Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition **13**(6): 713-732.
- Vazquez, E., D. M. Dewitt, P. T. Hammond and D. M. Lynn (2002). "Construction of hydrolytically-degradable thin films via layer-by-layer deposition of degradable polyelectrolytes." Journal of the American Chemical Society **124**(47): 13992-13993.
- Vodouhê, C., E. Le Guen, J. M. Garza, G. Francius, C. Dejugnat, J. Ogier, P. Schaaf, J. C. Voegel and P. Lavalley (2006). "Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films." Biomaterials **27**(22): 4149-56.
- Vodouhê, C., M. Schmittbuhl, F. Boulmedais, D. Bagnard, D. Vautier, P. Schaaf, C. Egles, J.-C. Voegel and J. Ogier (2005). "Effect of functionalization of multilayered polyelectrolyte films on motoneuron growth." Biomaterials **26**(5): 545-554.
- Voet, D. and J. G. Voet (1998). Biochimie, Deuxième édition. Paris, De Boeck Université s.a.
- Voinova, M. V., M. Rodahl, M. Jonson and B. Kasemo (1999). "Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces : continuum mechanics approach." Physica Scripta **59**: 391-396.
- von Kleist, S., E. Chany, P. Burtin, M. King and J. Fogh (1975). "Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor." Journal of the National Cancer Institute **55**(3): 555-60.
- Wagner, E., M. Zenke, M. Cotten, H. Beug and M. L. Birnstiel (1990). "Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **87**(9): 3410-3414.
- Wake, C. M., P. D. Gerecht, L. Lu and A. G. Mikos (1998). "Effects of biodegradable polymer particles on rat marrow-derived stromal osteoblasts in vitro." Biomaterials **19**(14): 1255-1268.
- Wakitani, S., T. Mitsuoka, N. Nakamura, Y. Toritsuka, Y. Nakamura and S. Horibe (2004). "Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: Two case reports." Cell Transplantation **13**(5): 595-600.
- Wang, C. T., Y. T. Lin, B. L. Chiang, Y. H. Lin and S. M. Hou (2006). "High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis." Osteoarthritis and Cartilage **14**(12): 1237-1247.
-

-
- Wang, Q. (2006). "Modelling layer-by-layer assembly of flexible polyelectrolytes." Journal of Physical Chemistry B **110**(12): 5825-5828.
- Weber, L. M., K. N. Hayda, K. Haskins and K. S. Anseth (2007). "The effects of cell-matrix interactions on encapsulated β -cell function within hydrogels functionalized with matrix-derived adhesive peptides." Biomaterials **28**(19): 3004-3011.
- Williams, D. F. and E. Mort (1977). "Enzyme-accelerated hydrolysis of polyglycolic acid." Journal of Bioengineering **1**(3): 231-8.
- Wong, J. Y., A. Velasco, P. Rajagopalan and Q. Pham (2003). "Directed Movement of Vascular Smooth Muscle Cells on Gradient-Compliant Hydrogels." Langmuir **19**(5): 1908-1913.
- Woo, B. H., B. F. Fink, R. Page, J. A. Schrier, Y. W. Jo, G. Jiang, M. DeLuca, H. C. Vasconez and P. P. DeLuca (2001). "Enhancement of Bone Growth by Sustained Delivery of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in a Polymeric Matrix." Pharmaceutical Research **18**(12): 1747-1753.
- Wood, K. C., J. Q. Boedicker, D. M. Lynn and P. T. Hammond (2005). "Tunable drug release from hydrolytically degradable layer-by-layer thin films." Langmuir **21**(4): 1603-1609.
- Wood, K. C., H. F. Chuang, R. D. Batten, D. M. Lynn and P. T. Hammond (2006). "Controlling interlayer diffusion to achieve sustained, multiagent delivery from layer-by-layer thin films." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(27): 10207-10212.
- Yan, L., C. Marzolin, A. Terfort and G. M. Whitesides (1997). "Formation and reaction of interchain carboxylic anhydride groups on self-assembled monolayers on gold." Langmuir **13**(25): 6704-6712.
- Yang, S. Y. and M. F. Rubner (2002). "Micropatterning of polymer thin films with pH-sensitive and cross-linkable hydrogen-bonded polyelectrolyte multilayers." Journal of the American Chemical Society **124**(10): 2100-2101.
- Yavin, E. and Z. Yavin (1974). "Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine-coated surface." Journal of Cell Biology **62**(2): 540-546.
- Yong-Hong, L., A. J. Stuart, F. Ben, P. M. Gary and B. B. Marc (2005). "Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery." Drug Delivery **12**(6): 327-342.
- Zaikov, G. E. (1985). "Techniques for the analysis of crosslinked polymers." Journal of Macromolecular Science - Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics **C25**(4): 551-597.
- Zhang, L., B. Li, Z. L. Zhi and D. T. Haynie (2005). "Perturbation of nanoscale structure of polypeptide multilayer thin films." Langmuir **21**(12): 5439-45.
-

- Zhang, S. X., W. W. Yang, Y. M. Niu and C. Q. Sun (2004). "Multilayered construction of glucose oxidase and poly(allylamine)ferrocene on gold electrodes by means of layer-by-layer covalent attachment." Sensors and Actuators B-Chemical **101**(3): 387-393.
- Zhao, Q., B. Han, Z. Wang, C. Gao, C. Peng and J. Shen (2007). "Hollow chitosan-alginate multilayer microcapsules as drug delivery vehicle: doxorubicin loading and in vitro and in vivo studies." Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine **3**(1): 63-74.
- Zilberman, M. and R. C. Eberhart (2006). "Drug-eluting bioresorbable stents for various applications." Annual Review of Biomedical Engineering **8**: 153-80.