

# Multicouches de polyélectrolytes dans le domaine des biotechnologies

Jean-Claude Voegel, Gero Decher et Pierre Schaaf

## Abstract

### Polyelectrolyte multilayer films in the biotechnology field

Multilayered self assembled polyelectrolyte films result from a simple dipping process in which polycations and polyanions are alternatively adsorbed on a charged surface. The physico-chemical properties of the resulting architectures can be largely modified by varying the number of deposited layers, by changing the nature of the polyelectrolytes, the pH or the ionic strength... Fonctionnalization for biomedical uses of the constructions can be undertaken by protein or drug « embedding » or by the « insertion » of covalently bound peptides in the architectures. The large versatility of the concept allows numerous applications in the biomedical field going from the modification of biomaterial surfaces to the construction of enzymatic nanoreactors in which a cascade of reactions can be induced.

## Mots-clés

**Multicouches, polyélectrolytes, auto-assemblage, fonctionnalisation.**

## Key-words

**Multilayers, polyelectrolytes, self assembling, functionalization.**

L'objectif de cet article est de faire une revue des possibilités de modification des propriétés de surfaces de biomatériaux par le biais d'assemblages moléculaires constitués de multicouches de polyélectrolytes.

« *La nature de la surface d'un biomatériau assure le contrôle des processus impliqués dans la réponse biologique* ». Cette affirmation de B. Ratner [1] définit largement les objectifs dans un domaine dont l'importance croît d'années en années. L'augmentation des exigences en terme de qualité et la maîtrise des coûts dans le secteur médical nécessitent une mise au point constante d'approches nouvelles. Tout objet interagit avec son environnement *via* sa surface et toutes les interactions avec l'environnement sont dictées par les propriétés surfaciques. Un ajustement des propriétés de surface d'un matériau permet également le contrôle de l'interaction avec le milieu environnant. Cet aspect est essentiel dans des domaines tels que les biomatériaux et la biotechnologie qui nécessitent des méthodes de modification de surface capables d'être utilisées en milieu aqueux et répondant aux contraintes particulières du secteur de la santé. Ces films concernent notamment le contrôle des processus d'interactions avec les cellules (adhérence ou non-adhérence), de libération de médicaments ou plus généralement de la conception de surfaces biomimétiques. Nous décrivons dans cet article une technologie nouvelle, souvent appelée dépôt couche par couche (cpc) qui commence réellement à marquer de son empreinte le domaine des sciences des matériaux et de la vie [2].

La méthode cpc est simple et permet de réaliser des assemblages supramoléculaires sur tout substrat chargé. Elle a été proposée il y a une dizaine d'années [3-4]. Ces assemblages sont réalisés par des trempages successifs du support alternativement dans une solution de polyanion et de polycation. Une étape de rinçage sépare généralement deux dépôts successifs. Le moteur de la croissance de ces films, également appelés multicouches de polyélectrolytes,

réside dans l'excès de charges qui apparaît après chaque nouveau dépôt d'un polyélectrolyte et qui permet ainsi une nouvelle interaction avec le polyélectrolyte de signe opposé. L'apparition de cet excès de charge a été démontrée par l'alternance du signe du potentiel zêta de la surface au cours

## Glossaire

### Anti-thrombine

Molécule inhibitrice de la coagulation.

### Cellules de mélanome

Cellules cancéreuses dérivant des cellules pigmentaires de la peau.

### Chondrosarcome

Cellule cancéreuse du cartilage.

### Chymotrypsine

Enzyme digestive ; sérine protéase.

### Échinocyte

Cellule du sang, de forme sphérique.

### IgG (immunoglobuline G)

Molécule d'anticorps de la classe G (protéine de la réponse immunitaire adaptative produite par les lymphocytes B en réponse à une stimulation antigénique).

### Laminine

Protéine fibrillaire structurant la matrice extracellulaire et constitutive des membranes basales.

### Monocytes

Cellules sanguines mononuclées précurseurs des macrophages.

### Myoblaste

Cellule précurseur des cellules du muscle squelettique.

### Ostéoblaste

Cellule sécrétrice de matrice osseuse.

### Phéochromocytomes

Cellules cancéreuses des glandes surrénales.

### Potentiel zêta

Il traduit la densité de charges à l'interface film/solide.

### Protéine A

Protéine staphylococcique modulatrice du système immunitaire (à propriétés antitumorales).

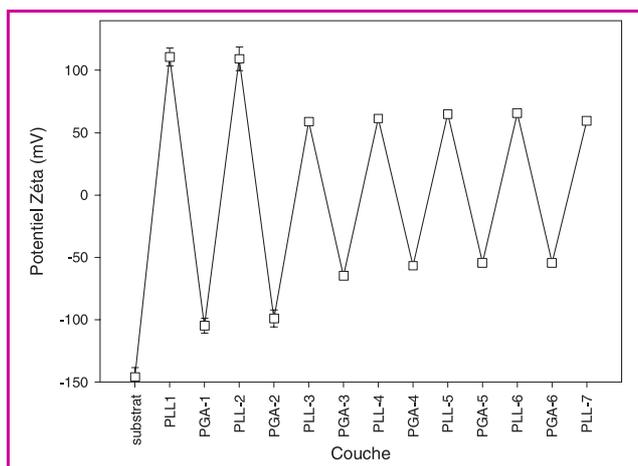


Figure 1 - Évolution du potentiel zêta lors de la construction d'un film de type (PLL/PGA)<sub>n</sub>.

Après chaque dépôt de polyélectrolyte, le potentiel zêta change de signe ce qui démontre la surcompensation de charge.

de la construction de tels films [5] (figure 1). La croissance d'une multicouche peut ainsi se poursuivre de façon quasi illimitée. Cette méthode de traitement des surfaces présente de nombreux avantages par rapport à des technologies développées dans le passé telles que les films de Langmuir-Blodgett : elle est simple d'utilisation, s'applique quelle que soit la géométrie du support et ne met généralement en œuvre que des solutions aqueuses. Enfin, elle permet de fonctionnaliser les supports de façon très générale par insertion de molécules ou de particules dans l'architecture au cours de la construction. Cette fonctionnalisation s'effectue généralement par simple adsorption ou insertion comme nous allons le voir.

Au cours de la construction d'une multicouche de polyélectrolytes, sa masse et son épaisseur augmentent avec le nombre de dépôts réalisés. Cette croissance n'est cependant pas toujours linéaire avec le nombre de cycles. On peut ainsi distinguer entre les films à croissance linéaire et ceux à croissance exponentielle. Les premiers sont construits dans des conditions telles que lors de chaque dépôt, le polyélectrolyte de la solution n'interagit qu'avec le polyélectrolyte de charge opposée constituant la surface externe du film [4]. De telles conditions sont remplies lorsque les polyélectrolytes ne peuvent pas diffuser vers l'intérieur du film, notamment en raison de leur trop forte densité. Ces constructions conduisent à des architectures pseudo-stratifiées donnant naissance à des pics de Bragg en réflectivité des neutrons lorsque des polyélectrolytes deutérés sont utilisés lors des différentes étapes de la construction [4-6]. Le système polystyrène sulfonate/poly(allylamine) (PSS/PAH) constitue l'un des exemples les plus étudiés de ce type de multicouche (figure 2). L'épaisseur, la densité, la rugosité et la structure des films peuvent être variées quasiment à volonté en changeant les paramètres physico-chimiques lors de la construction. En utilisant des polyacides et des polybases faibles, il est possible de faire varier l'épaisseur de chaque nouveau dépôt de moins d'un nanomètre à quelques dizaines de nanomètres en ajustant le pH de la solution de polyélectrolytes [7]. Ainsi, lorsque l'un au moins des deux polyélectrolytes est faiblement chargé, il interagit avec le polyélectrolyte de charge opposée en formant des boucles. L'épaisseur d'une bicouche (polyanion/polycation) devient

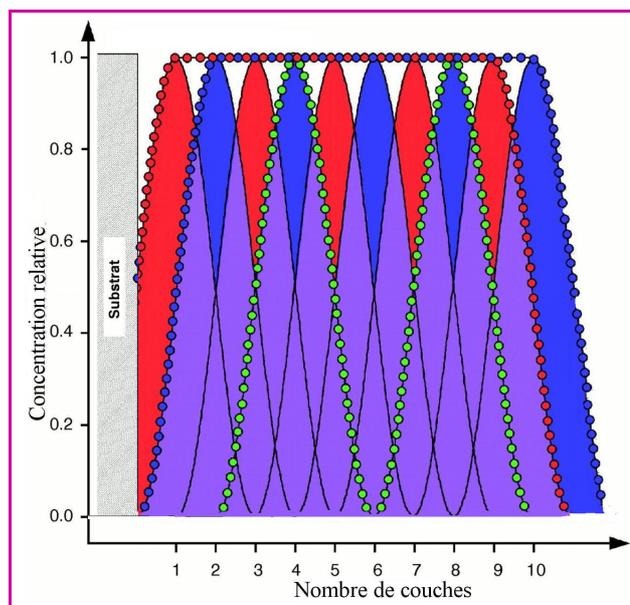


Figure 2 - Représentation schématique d'un film multicouche à croissance linéaire composé de 10 couches.

Les concentrations en polyanion et en polycation sont arbitrairement représentées par un profil sinusoïdal.

alors plus importante. De tels films sont généralement très hydratés. De manière comparable, l'augmentation de la force ionique des solutions de polyélectrolytes lors de la construction des multicouches conduit à des films plus épais à cause de la diminution de la répulsion entre les groupes chargés dans une même chaîne [5]. Une fois formé, un tel film peut se restructurer, notamment gonfler s'il est rincé par une solution dont la teneur saline est plus faible que celle utilisée lors de sa construction [5]. L'effet inverse est observé lorsque le rinçage est effectué à l'aide d'une solution dont la teneur saline est plus élevée. La rugosité d'un film peut également être modifiée en changeant les conditions de salinité et de pH lors de sa construction. Mendelsohn et coll. ont démontré qu'il était possible d'induire une morphologie microporeuse dans des multicouches de polyélectrolytes faibles en les soumettant à de fortes variations de pH après leur construction, la taille modulable des pores étant typiquement de l'ordre de 100 à 500 nm [8]. Ces processus résultent de changements de l'ionisation des polyélectrolytes au sein des films, ce qui conduit à d'importantes réorganisations locales des structures du film. Plus récemment, des films à croissance exponentielle ont également été décrits [9-10]. Cette propriété permet, dans certains cas, d'obtenir des multicouches dont l'épaisseur peut dépasser plusieurs micromètres après le dépôt seulement d'une dizaine de bicouches (polyanion/polycation). Des films construits à l'aide de polypeptides comme poly-(L-lysine)/acide poly-glutamique (PLL/PGA), de polyélectrolytes naturels comme chitosan/acide hyaluronique (Chi/HA) ou encore PLL/HA constituent des exemples types. L'utilisation de la microscopie confocale liée à un marquage fluorescent a permis de démontrer que ce type de croissance est généralement associé à la diffusion à travers l'ensemble de l'édifice, lors de chaque étape de la construction d'au moins un des deux polyélectrolytes constituant le film [11] (figure 3).

Le mécanisme de croissance exponentielle proposé est schématisé sur la figure 4 dans le cas où le polycation est

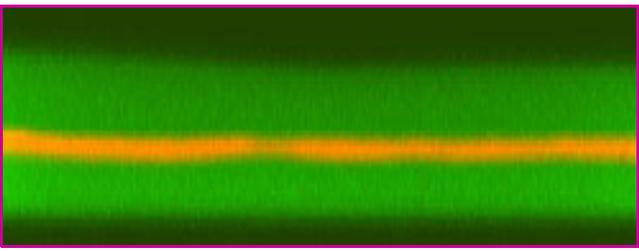


Figure 3 - Film de  $(PLL/PGA)_{18}-(PLL/HA_{TR})-(PLL_{FITC}-HA)-(PLL/HA)_5$ .  $HA_{TR}$  correspond au HA marqué au rouge de Texas (rouge) et  $PLL_{FITC}$  correspond à la PLL marquée à la fluorescéine isothiocyanate (vert). L'ensemble du film apparaît en vert à cause de la diffusion de  $PLL_{FITC}$ . La bande jaune correspond à la présence simultanée de  $HA_{TR}$  et de  $PLL_{FITC}$ . La localisation de  $HA_{TR}$  prouve que HA ne diffuse pas à travers le film.

uniquement susceptible de diffuser comme pour le système PLL/HA. Brièvement, en mettant la multicouche qui était préalablement au contact avec la solution de polyanions, au contact de la solution de polycations, ces derniers vont à la fois interagir avec l'excès de charges négatives distribuées sur la surface extérieure du film et conduire ainsi à la formation d'un excès de charges positives, et diffuser à l'intérieur du film pour former un réservoir de polycations « libres ». Lorsque la solution de polycations est remplacée par le tampon pur lors de la phase de rinçage, seule une partie des polycations libres du film diffuse hors de la multicouche. Cette libération partielle résulte de l'excès de charges positives qui reste à la surface du film créant une barrière de potentiel. Celle-ci empêche une partie des polycations de quitter la multicouche. Lorsque le film est ensuite mis au contact avec la solution de polyanions, ceux-ci interagissent avec l'excès de charges positives faisant ainsi disparaître la barrière de potentiel positive. Les polycations libres restant dans le film diffusent alors vers l'extérieur. Dès leur arrivée au voisinage de l'interface entre le film et la solution, ils sont complexés par les polyanions. Ces complexes font partie intégrante de la nouvelle couche la plus externe du film. La masse de cette nouvelle couche est proportionnelle à la quantité de polycations restant libres dans le film après la phase de rinçage. Cette quantité est elle-même en première approximation proportionnelle à l'épaisseur du film, ce qui conduit à une croissance de type « exponentiel ».

Quel que soit le type de multicouches, la construction résulte de l'interaction entre des polyanions et des polycations. Le mélange de ces mêmes polyélectrolytes en solution conduit à la formation de complexes de polyélectrolytes. La structure locale des films doit donc être très voisine de celle des complexes en solution. Une telle démonstration a été apportée récemment pour des systèmes de polypeptides dont les complexes en solution possèdent des structures secondaires (hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$ ) analogues à celles des protéines [12]. Les applications potentielles des multicouches de polyélectrolytes sont nombreuses et touchent des domaines aussi variés que l'optique non linéaire, l'optoélectronique ou les biomatériaux. C'est ce dernier type d'applications que nous allons décrire dans la suite de cet article.

**Surfaces non adhérentes**

La mise au point de surfaces ou d'interfaces qui résistent à l'adsorption protéique et/ou à l'adhérence

cellulaire constitue un objectif majeur pour l'élaboration de matériaux destinés à être mis au contact du milieu sanguin, aussi bien pour les implants médicaux que pour les biosenseurs. Des matériaux sur lesquels sont greffées des chaînes de poly(éthylène-glycol) (PEG) ont souvent été considérés comme particulièrement bien adaptés pour atteindre cet objectif. Les méthodes de préparation de telles surfaces sont cependant lourdes et ne sont pas applicables à tous les types de supports et toutes les géométries. En 1999, Elbert et coll. ont déposé des multicouches alginate/PLL sur des supports solides de gélatine, de matrice extracellulaire produite par des fibroblastes ou de collagène de type I [9]. Ces films constituaient un premier exemple de multicouches à croissance exponentielle possédant des propriétés de bio-inertie vis-à-vis de fibroblastes humains. D'autres multicouches à base de polysaccharides comme PLL/HA et Chi/HA se sont depuis également révélées non adhérentes vis-à-vis de cellules de chondrosarcome [13] ou d'ostéoblastes. Récemment, Mendelsohn et coll. ont pu démontrer des propriétés de contrôle d'adhérence vis-à-vis d'une lignée de fibroblastes NR6WT pour des constructions de multicouches réalisées à partir de PAH et d'acide polyacrylique (PAA) [14]. En faisant varier les conditions de pH lors de la construction des films, ils ont généralement noté une bonne adhérence cellulaire. De façon surprenante, des films pour lesquels le polyanion et le polycation étaient déposés tous deux à pH 2,0 se sont montrés très résistants vis-à-vis de l'adhésion cellulaire, aussi bien lorsque le film s'achevait par la couche de polycation que de polyanion. Par ailleurs, les mêmes auteurs n'ont observé aucune corrélation entre l'adhérence des cellules et l'adsorption de protéines, comme le fibrinogène ou le lysozyme, sur ces films. Un comportement similaire était noté vis-à-vis de ces mêmes cellules lorsque le PAA était remplacé par l'acide polyméthacrylique, le poly(styrène sulfonate) ou le chlorure de poly(diallyldiméthylammonium). Une corrélation directe entre le caractère non adhérent des films et leur capacité, une fois séchés, à gonfler lorsqu'ils sont remis au contact d'une solution aqueuse a été mise en évidence [14]. L'ensemble de ces résultats suggère que le caractère non adhérent d'une multicouche est directement lié à son degré d'hydratation. De plus, les mêmes auteurs démontrent l'absence de corrélation directe entre l'adsorption de protéines sur un film et sa non-adhérence vis-à-vis de

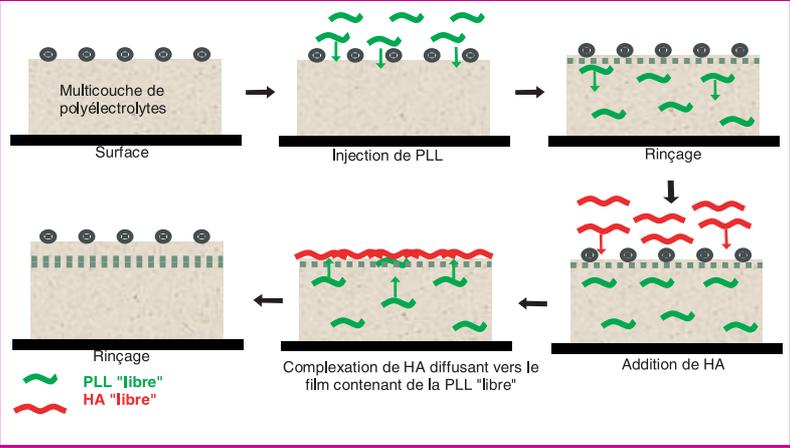


Figure 4 - Représentation schématique la construction d'un film à croissance exponentielle. Le cas représenté est celui d'un film de type  $(PLL/HA)_n$  où PLL peut diffuser à travers le film alors que HA ne peut pas diffuser.

cellules. Ce dernier résultat remet en cause le postulat sur lequel étaient fondées toutes les études d'adsorption de protéines durant des dizaines d'années et qui stipulait que des surfaces non adhérentes devaient également être non adsorbantes.

Richert et coll. ont étudié par micromanipulation les forces d'adhésion entre des chondrosarcomes et des films de (PLL/PGA)<sub>n</sub> [13]. Alors que pour des films s'achevant par PGA les forces d'adhésion sont très faibles, voire nulles, elles sont beaucoup plus importantes sur les films se terminant par PLL et décroissent avec *n*. Il a aussi été montré que de tels films peuvent empêcher l'adhésion et la prolifération de bactéries [15]. Ce résultat a été atteint à l'aide de films du type PLL/PGA terminés par trois bicouches de PLL/PGA-PEG. PGA-PEG sont des chaînes d'acide poly(L-glutamique) sur lesquelles ont été couplées de façon covalente des chaînes de poly(éthylène glycol) de masse 2 000 Da. Ces films réduisent l'adhésion d'une bactérie comme *Escherichia coli* de plus de 92 %. D'autres multicouches non adsorbantes aux protéines ont également été décrites [14, 16]. Ainsi, à pH 7,4, des protéines telles que le lysozyme, les immunoglobulines, l'albumine sérique humaine (HSA) et la fibronectine ne s'adsorbent pratiquement pas à la surface de films portant des charges opposées à celles de la protéine pour les architectures basées sur le dépôt alterné de poly(éthylèneimine) (PEI) et d'acide polyacrylique, ou de poly(éthylèneimine) et d'acide polyaléique, alors qu'elles se fixent de manière significative sur des films ayant des bases fortes et incluant la poly(éthylèneimine) et le poly(vinylsulfate).

L'élaboration de multicouches non adhérentes constitue non seulement un objectif en soi, mais s'inscrit aussi dans une démarche visant à rendre des surfaces sélectivement adhérentes à certains types cellulaires. La voie utilisée consiste à fonctionnaliser ces films non adhérents par l'intermédiaire de peptides spécifiques de l'adhésion de certains types cellulaires. Des études sont actuellement en cours dans ce domaine dans plusieurs laboratoires qui envisagent des applications biomédicales pour de tels films de polyélectrolytes, notamment pour le recouvrement de surfaces de biomatériaux.

## Films adhérents

Des films ont aussi été élaborés en utilisant du collagène de type I en alternance avec du PSS [17]. Les films qui incluent dans leur architecture plusieurs couches de collagène se caractérisent par une bonne adhérence de cellules telles que les myoblastes et les cellules phéochromocytomes de rats. Le recouvrement d'une surface de biomatériau par une architecture constituée par PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub> mise au contact de cellules endothéliales conduit également à une très forte adhésion sans induire une quelconque dédifférenciation cellulaire ou effet cytotoxique [18]. Ce type de film pourrait

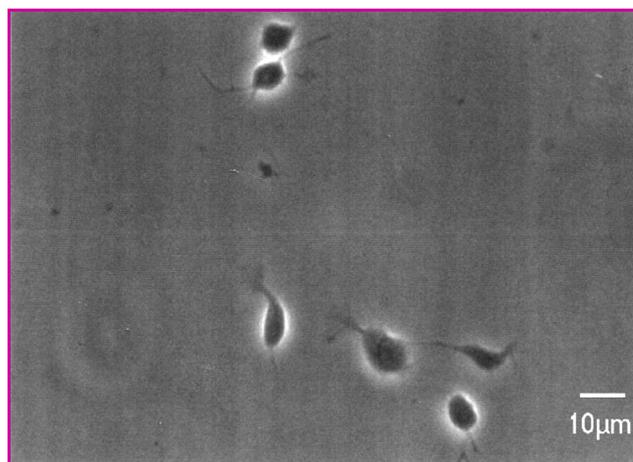


Figure 5 - Motoneurones de la moelle épinière déposés sur un film de trois couches de PEI/PSS/PAH.

ainsi constituer une bonne base pour augmenter la biocompatibilité par rapport au plasma sanguin après ensemencement par des cellules endothéliales, notamment pour des vaisseaux de faible diamètre.

Le contrôle de l'épaisseur du film, associé à une bonne biocompatibilité des précurseurs de cellules nerveuses, laisse également entrevoir l'application de la technique multicouche dans le guidage des neurones. Des études ont été menées par Decher en collaboration avec l'équipe du professeur Ternaux de Marseille [19]. Des motoneurones de la moelle épinière de rat ont été déposés sur différentes architectures de polyélectrolytes et les paramètres cellulaires ont été comparés à ceux de surfaces recouvertes par la laminine [20]. Il a été démontré que l'adhésion et la survie des motoneurones sur les multicouches construites à partir de polyélectrolytes de synthèse sont comparables et parfois supérieures à celles observées sur le système de référence (laminine). La nature chimique de la dernière couche déposée semble particulièrement importante pour le comportement des cellules à la surface du film. Une image typique de la croissance de neurones sur un film poly(éthylène-imine)/PSS/PAH est donnée dans la figure 5, tandis que le tableau I fournit une analyse détaillée de l'adhésion neuronale sur différents types de films.

## Les multicouches comme méthode de fonctionnalisation de biomatériaux

Un matériau est dit fonctionnalisé lorsqu'il a été possible de lui conférer une ou des propriété(s) spécifique(s). Ainsi, des matériaux non adhérents sont fonctionnalisés. On peut préparer des supports possédant des propriétés anti-inflammatoires, anti-bactériennes ou capables de libérer

Tableau I - Paramètres de morphologie et de croissance des motoneurones déterminés sur des assemblages. Il apparaît clairement que l'architecture et la nature des polyélectrolytes agissent sur le contrôle cellulaire.

	Nombre de neurites primaires	Nombre total de bifurcations	Vitesse de pousse de l'axone (µm/jour)	Vitesse de pousse des dendrites (µm/jour)	Surface (µm <sup>2</sup> )
PLL/laminine	3,97 ± 0,16	3,516 ± 0,28	61 ± 3,3	89 ± 7	-
PEI	3,92 ± 0,16	15,77 ± 1,3	45,6 ± 3,4	86,5 ± 8,6	-
PSS/PAH	3,08 ± 0,09	18,79 ± 0,85	35,9 ± 3,3	71 ± 8	-
(PSS/PAH) <sub>12</sub>	5,93 ± 0,17	3,76 ± 0,21	40,0 ± 1,8	111,4 ± 2,3	9 999 ± 567

dans le temps des substances actives. Différentes voies de fonctionnalisation des multicouches de polyélectrolytes sont envisageables : des protéines actives peuvent notamment être insérées dans les films. Les multicouches peuvent même être constituées exclusivement de protéines. L'insertion de polyélectrolytes sur lesquels sont greffés des peptides actifs est aussi possible. Enfin, les architectures peuvent être fonctionnalisées par des médicaments.

### Fonctionnalisation par des protéines

Les multicouches peuvent être fonctionnalisées en adsorbant des protéines au sommet d'un film ou en insérant une ou plusieurs protéines identiques ou différentes à plusieurs niveaux de l'édifice. Ces protéines doivent cependant conserver une structure proche de celle de leur forme native. Une fois enfouies, elles doivent aussi pouvoir interagir avec des cellules déposées au sommet du film (figure 6).

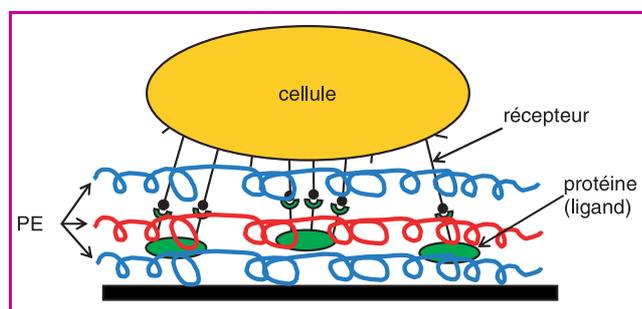


Figure 6 - Représentation schématique d'un film fonctionnalisé par une protéine « enfouie » dans l'architecture du film.

Nous avons décrit dans le paragraphe précédent des multicouches qui se comportaient de façon non adsorbante vis-à-vis des protéines. Celles-ci constituent cependant des exceptions et il y a généralement adsorption de protéines à la surface des multicouches. Des études d'adsorption de différentes protéines sur des films de type PSS/PAH ont montré que les quantités adsorbées sont supérieures lorsque la charge globale des protéines est opposée à celle de la multicouche, bien que les quantités adsorbées ne soient pas nulles lorsque les protéines sont de même signe que le film [21]. On peut ensuite poursuivre la construction du film sur cette couche de protéines adsorbées, ce qui permet de les enfouir dans l'architecture. En utilisant des techniques de fluorescence, il a été montré que des protéines comme la protéine A, enfouies dans un film de PLL/PGA, n'étaient pas capables de diffuser dans la direction perpendiculaire au film et restaient donc confinées dans la couche de dépôt [22]. Par contre, une diffusion latérale dans le film a été mise en évidence pour une fraction importante des molécules d'albumine humaine sérique adsorbées ou insérées dans des films de type PSS/PAH [23-24].

Le maintien dans les films de l'activité des protéines nécessite d'éviter leur dénaturation. Les polyélectrolytes en général et les multicouches de polyélectrolyte en particulier semblent bien remplir ce rôle. Ainsi, il a été démontré que la glucose isomérase, la glucosamylase (GA), la glucose oxydase (GOD) et la peroxydase incluses dans les multicouches de polyélectrolyte conservent toute leur activité enzymatique. De même, des immunoglobulines G (IgG) enfouies sous un petit nombre de couches de

polyélectrolytes conservent leur activité et interagissent avec leurs antigènes [25]. Des analyses par spectroscopie IR par transformée de Fourier ont également montré la conservation de la structure secondaire de la forme native de protéines insérées dans les architectures [26-27]. De plus, la présence des polyélectrolytes empêche la formation de feuillets  $\beta$  intermoléculaires et stabilise thermiquement des protéines comme le fibrinogène.

Un élément primordial de ce type de fonctionnalisation concerne la communication cellulaire qui s'établit entre des cellules déposées au sommet de l'architecture et les protéines enfouies. Jessel et coll. ont étudié cet aspect pour un système modèle : des molécules de protéine A ont été insérées dans des multicouches de type PLL/PGA sur lesquelles ont été déposées ensuite des monocytes [22]. La réponse cellulaire a été analysée en suivant la production de  $\text{TNF}\alpha$  induite par l'interaction cellule/protéine A. Il apparaît que la production de  $\text{TNF}\alpha$  devient maximale après un contact d'au moins 2 heures entre les cellules et le film lorsque la protéine A est recouverte par 10 bicouches de PLL/PGA. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été constatée dans la production de  $\text{TNF}\alpha$  après un temps de contact de 2, 4 et 12 h. La production reste aussi inchangée après 4 ou 12 h de contact lorsque la protéine est simplement adsorbée au sommet de la construction ou recouverte par 10, 15, 20, 25 ou 30 bicouches de PLL/PGA. Par contre, le recouvrement de la protéine A par 10 bicouches de PGA/PDL (poly-D-lysine) bloque totalement la production de  $\text{TNF}\alpha$ . Ce résultat suggère que le contact entre les cellules et les molécules de protéine A enfouies est probablement dû à une dégradation enzymatique du film. Cette hypothèse a été confirmée par des expériences de microscopie confocale. L'incorporation dans l'architecture de protéine A marquée au rouge de Texas ( $\text{PA}_{\text{TR}}$ ) et de PLL marquée au fluorothiocyanate ( $\text{PLL}_{\text{FITC}}$ ) indique clairement que la protéine A reste localisée au niveau de sa couche de dépôt, alors que la PLL diffuse à travers tout le film. Cette propriété se manifeste en microscopie confocale par la formation d'une bande rouge mince et continue alors que la coloration verte s'étend sur l'ensemble du film, indiquant la diffusion de la PLL (figure 7). Le dépôt de monocytes sur l'architecture marquée montre la formation de pseudopodes au niveau cellulaire qui traversent le film jusqu'au contact de la protéine A, permettant ainsi la communication cellulaire (figure 8).

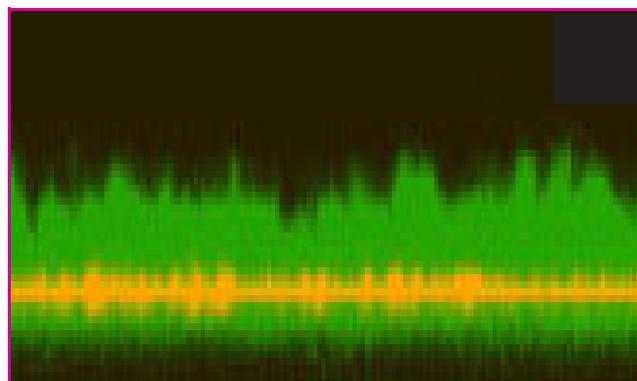


Figure 7 - Film de  $\text{PEI}-(\text{PLL}/\text{PGA})-\text{PA}_{\text{TR}}-(\text{PGA}/\text{PLL})_{10}-(\text{PGA}/\text{PLL}_{\text{FITC}})$ .

$\text{PA}_{\text{TR}}$  correspond à la protéine A marquée au rouge de Texas (rouge) et  $\text{PLL}_{\text{FITC}}$  correspond à la PLL marquée à la fluorescéine isothiocyanate (vert). L'ensemble du film apparaît en vert à cause de la diffusion de  $\text{PLL}_{\text{FITC}}$ . La bande jaune correspond à la présence simultanée de  $\text{PA}_{\text{TR}}$  et de  $\text{PLL}_{\text{FITC}}$ . La localisation de  $\text{PA}_{\text{TR}}$  prouve que la PA ne diffuse pas à travers le film.

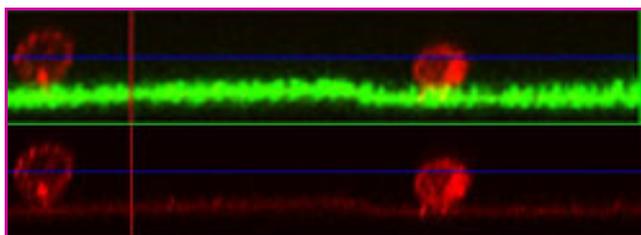


Figure 8 - Images en microscopie confocale de monocytes au contact avec un film de PEI-(PLL/PGA)-PA<sub>TR</sub>-(PGA/PLL)<sub>18</sub>-(PGA/PLL-FITC).

Les cellules étaient mises préalablement au contact avec le film pendant 120 min. Image du haut : observation avec les canaux vert et rouge. Le trait vert correspond au film de multicouche. Image du bas : observation avec le canal rouge seulement. On observe les pseudopodes des cellules qui traversent le film jusqu'au dépôt de protéine A qui apparaît légèrement en rouge.

Des assemblages constitués par une alternance de protéines et de polyélectrolytes suivie d'une stabilisation de la multicouche à la glutaraldéhyde ont également été réalisés [28-29]. Des constructions constituées uniquement de protéines peuvent ainsi être obtenues après élimination par rinçage des polyélectrolytes non couplés [30]. Ainsi, des assemblages construits uniquement à partir d'albumine [31] ou d'albumine et d'héparine ont été employés pour le recouvrement d'équipements médicaux utilisés au contact de plasma sanguin. La passivation de surfaces par des multicouches d'albumine a été démontrée par l'absence presque totale d'adsorption d'IgG à partir de plasma sanguin [31]. De telles surfaces semblent donc prévenir le contact direct entre la surface et les cellules ou les protéines du plasma sanguin. Les surfaces se terminant par une couche d'héparine semblent, quant-à-elles, posséder des propriétés anticoagulantes mises en évidence par leur interaction avec l'antithrombine. L'utilisation de polyélectrolytes naturels tels que le chitosan (Chi) et le dextran sulfate (DS) [32-33] pour la construction des films permet de moduler des propriétés pro- ou anti-coagulantes vis-à-vis du milieu sanguin. La force ionique de ces solutions de polyélectrolyte lors de la construction des films joue un rôle primordial dans les propriétés des films avec une variation très importante entre 0,2 et 0,5 M NaCl. L'augmentation de la concentration saline conduit à une augmentation de l'épaisseur déposée par couche ainsi qu'à une augmentation de l'excès de charges négatives observé après chaque dépôt de dextran. Ainsi, à partir du dépôt de la troisième bicouche et pour une teneur saline supérieure à 0,5 M, on note un comportement procoagulant lorsque le film s'achève par Chi et anticoagulant lorsque la structure se termine par DS. Les propriétés anticoagulantes sont expliquées par l'excès de charges introduites par la couche externe de dextran. Pour les autres conditions (films plus minces et taux de sel plus faibles), on observe toujours un comportement procoagulant. Des constructions identiques réalisées par dépôts successifs de chitosan et d'héparine à partir de solution à 1 M en NaCl possèdent des propriétés anticoagulantes fortes, quelle que soit la nature de la couche extérieure.

### Fonctionnalisation par des peptides

Une autre voie de fonctionnalisation s'appuie sur l'inclusion dans l'architecture d'un polyélectrolyte modifié par couplage

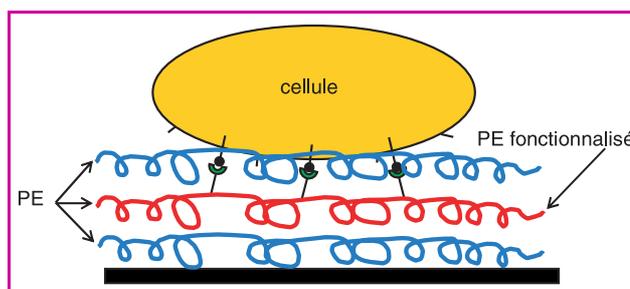


Figure 9 - Représentation schématique d'un film fonctionnalisé par une couche de polyélectrolytes modifiés par le couplage covalent d'un peptide d'adhésion.

covalent d'un peptide (figure 9). Cette démarche a été suivie par Chluba et coll. qui ont testé la réponse de cellules de mélanome (B16-F1) déposées sur des architectures (PGA/PLL)<sub>n</sub> dont certaines couches de PLL ont été remplacées par de la PLL couplée à de l' $\alpha$ -mélancortine ( $\alpha$ -MSH) [34]. Cette hormone peptidique est un stimulateur potentiel de la mélanogenèse. Il a d'abord été montré que l' $\alpha$ -MSH couplée de manière covalente à PLL et adsorbée au sommet de l'architecture du film conservait une activité tout à fait comparable à celle de l'hormone libre. Par ailleurs, l'activité aux temps courts (production d'AMP cyclique) de films dans lesquels sont enfouies des molécules de  $\alpha$ -MSH couplées à la PLL, dépend de la profondeur d'enfouissement du polyélectrolyte modifié, alors que la réponse aux temps longs (production de mélanine) ne varie pas jusqu'à un recouvrement de l' $\alpha$ -MSH couplée par au moins 25 bicouches de PLL/PGA. Dans cette étude, le mécanisme de communication cellulaire n'a pas pu être démontré de façon rigoureuse et pourrait avoir différentes origines. Parmi celles-ci, on peut citer la diffusion des molécules de PLL qui se répartissent partiellement dans l'ensemble de la construction à cause du mécanisme de croissance exponentielle du film [11]. La communication cellulaire pourrait aussi être due à la dégradation des multicouches par les cellules, identique à celle observée pour l'interaction de monocytes avec la protéine A insérée dans des multicouches de même nature. Néanmoins, cette origine, si elle existe, ne peut constituer la seule voie de signalisation car l'insertion, dans l'architecture PLL/PGA, de plusieurs couches de PSS/PAH non dégradables par les enzymes n'empêche pas totalement la communication cellulaire.

### Fonctionnalisation par des médicaments

Les multicouches de polyélectrolytes peuvent également être fonctionnalisées en y insérant des médicaments (figure 10). Récemment, Schwinté et coll. ont construit des

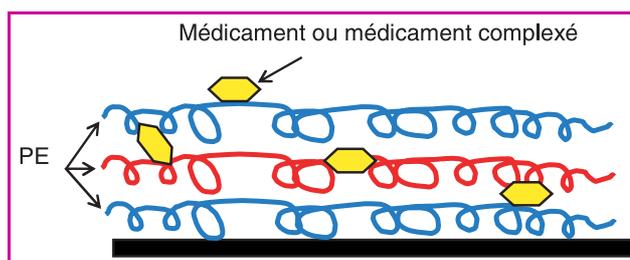


Figure 10 - Représentation schématique d'un film fonctionnalisé par l'intermédiaire de médicaments.

films de type PLL/PGA possédant des propriétés anti-inflammatoires après insertion de pyroxicam (Px), une molécule connue pour ses propriétés anti-inflammatoires [35]. Cette molécule est cependant très peu soluble dans l'eau et elle est généralement administrée sous la forme d'un complexe avec des molécules de cyclodextrine. Afin d'insérer un tel complexe dans les multicouches, ces mêmes auteurs ont utilisé une cyclodextrine chargée, la 6A-carboxyméthylthio- $\beta$ -cyclodextrine (cCD). Les propriétés anti-inflammatoires de ces films ont été évaluées en suivant la production de TNF $\alpha$  par des monocytes (THP-1) stimulées par le lipopolysaccharide (LPS). Une forte activité anti-inflammatoire a été notée pour les films dont les structures renfermaient plusieurs couches constituées de complexes cCDPx.

## Vers la conception de nanoréacteurs

L'activité d'enzymes dans des films multicouches a d'abord été évaluée sur des architectures de type enzyme/polyélectrolyte comme POD/PSS ou PEI/GOD (POD : peroxydase, GOD : glucose oxydase) [36-37]. Des constructions renfermant les deux enzymes GOD et POD ont ensuite été réalisées [38]. Deux couches POD/PSS et deux autres couches PEI/GOD ont été assemblées dans cet ordre sur quatre couches précurseurs PEI/PSS. La réaction en deux étapes impliquant les deux enzymes est induite en rajoutant du glucose et un colorant (DA67) dans la solution au-dessus de la construction. Le premier enzyme (GOD) catalyse la réaction entre le  $\beta$ -glucose et O<sub>2</sub> avec production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de D-glucono- $\delta$ -lactone. Cette dernière molécule permet l'oxydation du colorant DA67, cette réaction étant catalysée par POD. Des constructions dans lesquelles la glucamylase (GA) a été insérée et catalyse la conversion de l'amidon en  $\beta$ -glucose ont également été réalisées [38]. Ainsi, une construction constituée, du sommet du film vers le bas, par deux bicouches de PEI/GA et deux bicouches de PEI/GOD permet à nouveau l'obtention de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par conversion de l'amidon en  $\beta$ -glucose, cette réaction étant catalysée par GA. Le  $\beta$ -glucose est à son tour converti en D-glucono- $\delta$ -galactone (au contact de GOD) avec production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui, en solution en présence de POD, permet l'oxydation du colorant DA67. Des constructions permettant une cascade de deux à trois réactions enzymatiques peuvent donc être réalisées à l'aide de multicouches de polyélectrolytes. Une optimisation de la distance de séparation entre les couches enzymatiques permet d'augmenter le rendement de la réaction multi-étape. De telles constructions multi-enzymatiques miment par exemple les organelles naturelles et devraient également permettre de réaliser des réactions en plusieurs étapes avec des produits de réaction intermédiaires instables. De telles réactions sont difficiles à mener en solution lorsque les enzymes sont dissous dans la solution. De plus, ces assemblages ne consomment que peu d'enzymes.

## Multicouches et colloïdes

Les particules colloïdales possédant des propriétés spécifiques par fonctionnalisation de leur surface trouvent de nombreuses applications dans des domaines aussi variés que la catalyse, les senseurs, la libération contrôlée de médicaments, mais également en électronique ou en

photonique. Les modifications des propriétés de surface des colloïdes et leur fonctionnalisation peuvent, là aussi, être réalisées par le dépôt de multicouches de polyélectrolytes. Le recouvrement de colloïdes a été entrepris selon deux voies différentes. La première consiste à rajouter dans la solution la quantité de polyélectrolytes juste nécessaire pour la saturation d'une couche, ce qui permet de rajouter immédiatement le polyélectrolyte de signe opposé sans rinçage [39]. Dans la deuxième voie, on utilise une concentration élevée de polyélectrolyte dont l'excès est éliminé après le dépôt [40-43]. L'élimination est réalisée soit par des cycles de centrifugation/rinçage suivis par une resuspension des particules, soit par des méthodes de filtration. D'une manière générale, deux types de colloïdes ont été préparés : des particules soit pleines, soit creuses.

## Multicouches « habillant » des particules pleines

Comme pour la construction de films sur des supports plans, des dépôts alternés de polyélectrolytes et de protéines ont été réalisés sur des particules [36-37, 44-45]. La technique a également été étendue à l'encapsulation de matériaux biologiques qui peuvent conserver ainsi leur activité enzymatique [46]. Des assemblages de polyélectrolytes peuvent également être déposés sur des agrégats protéiques tels que la lactate déshydrogénase [47] ou la chymotrypsine [48] dont l'activité est conservée à environ 70 %. Le recouvrement par les polyélectrolytes empêche sans doute l'action d'inhibiteurs de haut poids moléculaire. Des enzymes recouverts de multicouches constituent d'intéressants réacteurs, notamment grâce à la grande surface spécifique développée par ces colloïdes. Des particules de latex recouvertes de couches renfermant de la GOD ou de la POD ont aussi été étudiées montrant que l'adsorption directe d'enzymes dans l'architecture conduisait à une activité dix fois plus importante que lors d'un dépôt de complexes chargés enzymes/polyélectrolytes dans l'édifice [36-37]. L'activité peut également être augmentée par le nombre de couches d'enzymes insérées. Par ailleurs, des constructions ont été réalisées sur les colloïdes, dans lesquelles plusieurs enzymes sont insérées comme dans les films, en vue d'induire des réactions en chaîne comme pour les nanoréacteurs.

Des cellules biologiques ont aussi été employées comme support d'encapsulation, notamment des échinocytes fixés à la glutaraldéhyde [49-50]. Ces constructions sont alors souvent utilisées pour la fabrication de particules poreuses après dissolution du cœur de l'édifice. L'encapsulation de cellules vivantes permet aussi leur protection vis-à-vis d'éventuelles agressions extérieures. Ainsi, l'encapsulation de cellules pancréatiques [51] par des multicouches offre une immuno-protection à ces cellules greffées, ainsi qu'une grande perméabilité à l'oxygène, au glucose et à l'insuline. Par ailleurs, ces films n'interfèrent pas avec le fonctionnement des îlots de Langerhans (cellules du pancréas sécrétant l'insuline) et permettent, *in vivo*, la production d'insuline.

Des particules colloïdales sont largement employées pour les diagnostics immunologiques. L'utilisation des multicouches de polyélectrolytes est notamment attrayante après adsorption d'un polyélectrolyte fluorescent qui est suivie d'un dépôt de protéine. Cette voie a été exploitée en déposant des IgG de souris sur des billes de polystyrène

rendues fluorescentes [52]. Leur réaction avec des anticorps de chèvre dirigés contre les IgG de souris adsorbés sur des boîtes de culture a ainsi été mise en évidence. L'insertion de médicaments de faible poids moléculaire et non chargés dans des multicouches de polyélectrolytes permet la libération contrôlée du médicament après sa solubilisation en variant notamment le nombre de couches de polyélectrolytes déposées [49, 53].

### Les multicouches utilisées pour fabriquer des particules creuses

On peut également recouvrir des particules colloïdales de multicouches de polyélectrolytes, le cœur des particules pouvant être dissout après dépôt du film. Les particules supports peuvent être de synthèse (inorganique, organique) ou biologiques. Un des premiers supports utilisés pour cette application a été la mélamine formaldéhyde [50] dont la dissolution par HCl est aisée. Une solution alternative a consisté à utiliser des précipités protéiques ou des cœurs dont la destruction est effectuée par l'hypochlorite de sodium. On peut aussi jouer sur la solubilité ou rajouter un agent complexant tel que l'EDTA dans le cas de  $\text{CaCO}_3$  ou  $\text{CdCO}_3$  [49]. La calcination de particules de  $\text{SiO}_2$  couvertes d'une multicouche conduit à des particules creuses et poreuses avec un film de  $\text{SiO}_2$  résiduel sous les polyélectrolytes.

La grande variété de matériaux que l'on peut utiliser pour la fabrication des membranes des particules creuses permet aussi un contrôle de leur perméabilité. Dans les applications, soit une libération contrôlée sur une période longue, soit une libération rapide et ponctuelle d'un principe actif sont recherchées. La variation de l'épaisseur du film permet la modulation de cette libération sur un ordre de grandeur en temps. La libération rapide est plus facile à mettre en œuvre. Une inclusion de protéines sous forme cristalline permet, après dissolution, une libération rapide du contenu protéique. La rupture de la paroi de la particule peut être induite par un choc osmotique tandis que l'insertion des polyélectrolytes de faible masse permet la destruction de l'architecture par une simple variation de la force ionique. Une solution alternative concerne l'inclusion dans les constructions de dérivés sensibles à la chaleur, la lumière ou la pression [54].

L'induction de libérations réversibles et répétées pourrait être obtenues par une modulation de la perméabilité des films. L'inclusion de canaux ioniques comparables à ceux dans les membranes cellulaires pourrait constituer une voie originale. La diffusion d'espèces plus volumineuses peut aussi être induite par des variations de pH. Ainsi, les molécules de dextran-FITC s'adsorbent à l'extérieur de capsules de PSS/PAH préparées à pH 8 [55]. Lorsque le pH est abaissé à 6, les molécules de dextran-FITC diffusent vers le cœur des particules. En ajustant le pH à 8, on observe la présence de molécules marquées uniquement à l'intérieur des particules. Une alternance des pH permet des réactions réversibles et le changement de perméabilité résulte d'une ionisation variable qui découle de l'ionisation partielle du polyélectrolyte à pH 8 qui devient totale à pH 6. Les répulsions entre les polyélectrolytes conduisent à une certaine porosité dans le film construit à pH 8 et permettent la diffusion des molécules de dextran.

Les capsules creuses pourraient trouver de multiples applications dès lors qu'elles pourront facilement être chargées par des molécules actives. Des voies chimiques ou

physiques sont envisageables à cet effet. On peut ainsi établir un équilibre de Donnan en utilisant des parois de capsules qui sont imperméables aux polyélectrolytes. Pour de telles constructions, le rajout d'un polyacide à l'extérieur permet la diffusion de  $\text{H}^+$  vers l'intérieur des particules induisant des variations de pH de 1 à 4 unités [56]. La différence de pH induit des variations de porosité qui permettent alors de charger les particules creuses. Une manière différente d'emprisonner un enzyme consiste à l'adsorber sur le support sur lequel le film est construit mais avant le dépôt des premières couches ou en l'incluant dans les premières couches de l'architecture (vers l'intérieur de la capsule creuse). Si ces premières couches sont constituées de polyélectrolytes dégradables [57], les enzymes peuvent être relargués à l'intérieur des capsules après dissolution des couches internes. Une caractéristique majeure des particules poreuses découle de la propriété de diffusion des petites molécules à travers les films alors que les grosses entités ne peuvent le faire. Ainsi l'encapsulation d'enzymes permet leur protection contre les protéases de haut poids moléculaire. Cette propriété a été démontrée pour la chymotrypsine et la peroxidase de raifort [58]. La protection semble efficace mais elle s'accompagne toutefois d'une perte d'activité.

## Conclusions

Ce rapide tour d'horizon montre que les multicouches de polyélectrolytes constituent une nouvelle méthode de fonctionnalisation des surfaces et de fabrication de particules colloïdales avec de nombreuses applications potentielles en biologie et médecine. On peut notamment citer la réparation tissulaire (lésion articulaire, peau artificielle...) ou le recouvrement de surfaces de biomatériaux par des films (multi)fonctionnalisés (implants dentaires, prothèses de hanche, de larynx...), ou toute surface en contact avec un fluide ou un tissu biologique. Simple à mettre en œuvre, cette technique de préparation de films minces est très générale et peut être envisagée sur tout type de support chargé.

## Références

- [1] Ratner B.D., Johnston A.B.; Lenk T.J., *J. Biomed. Mater. Res.*, **1987**, *21*, p. 59.
- [2] Decher G., Schlenoff J.B., *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [3] Decher G., Hong J.D. Schmitt J., *Thin Solid Films*, **1992**, *210*, p. 831.
- [4] Decher G., *Science*, **1997**, *277*, p. 1232.
- [5] Ladam G., Schaad P., Voegel J.-C., Schaaf P., Decher G., Cuisinier F., *Langmuir*, **2000**, *16*, p. 1249.
- [6] Lösche M., Schmitt J., Decher G., Bouwnman W.G., Kjaer K., *Macromolecules*, **1998**, *31*, p. 8893.
- [7] Shiratori S.S., Rubner M.F., *Macromolecules*, **2000**, *33*, p. 4213.
- [8] Mendelsohn J.D., Barrett C.J., Chan V.V., Pal A.J., Mayes A.M., Rubner M.F., *Langmuir*, **2000**, *16*, p. 5017.
- [9] Elbert D.L., Herbert C.B., Hubbell J.A., *Langmuir*, **1999**, *15*, p. 5355.
- [10] Picart C., Lavalley P., Hubert P., Cuisinier F.J.G., Decher G., Schaaf P., Voegel J.-C., *Langmuir*, **2001**, *17*, p. 7414.
- [11] Picart C., Mütterer J., Richert L., Luo Y., Prestwich G.D., Schaaf P., Voegel J.-C., Lavalley P., *Proc. Natl. Acad. Sci., États-Unis*, **2002**, *99*, p. 12531.
- [12] Boulmedais F., Schwinte P., Gergely C., Voegel J.-C., Schaaf P., *Langmuir*, **2002**, *18*, p. 4523.
- [13] Richert L., Lavalley P., Vautier D., Senger B., Stoltz J.-F., Schaaf P., Voegel J.-C., Picart C., *Biomacromol.*, **2002**, *3*, p. 1170.
- [14] Mendelsohn J.D., Yang S.Y., Hiller J., Hochbaum A.I., Rubner M.F., *Biomacromol.*, **2003**, *4*, p. 96.
- [15] Boulmedais F., Etienne O., Frisch B., Lavalley P., Picart C., Ogier G., Voegel J.-C., Schaaf P., Egles C., *Biomaterials* (sous presse).
- [16] Muller M., Rieser T., Dubin P.L., Lunikwitz K., *Macromolecular Rapid Communications*, **2001**, *22*, p. 390.

- [17] Grant G.G.S., Koktysh D.S., Yun B., Matts R.L., Kotov N.A., *Biomedical Microdevices*, **2001**, 3:4, p. 301.
- [18] Boura C., Menu P., Payan E., Picart C., Voegel J.-C., Muller S., Stoltz J.-F., *Biomaterials*, **2003**, 24, p. 3521.
- [19] Pointu D., thèse à l'université Louis Pasteur, Strasbourg, **2002**.
- [20] Bataille S., Portalier P., Coulon P., Ternaux J.-P., *Eur. J. Neurosci.*, **1998**, 10, p. 560.
- [21] Ladam G., Schaaf P., Cuisinier F.G.J., Decher G., Voegel J.-C., *Langmuir*, **2001**, 17, p. 878.
- [22] Jessel N., Atalar F., Lavallo P., Mutterer J., Decher G., Schaaf P., Voegel J.-C., Ogier G., *Advanced Materials*, **2003**, 24, p. 692.
- [23] Szyk L., Schaaf P., Gergely C., Voegel J.-C., Tinland B., *Langmuir*, **2001**, 17, p. 6248.
- [24] Szyk L., Schwinté P., Voegel J.-C., Schaaf P., Tinland B., *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106, p. 6049.
- [25] Caruso F., Furlong D.N., Ariga K., Ichinose I., Kunitake T., *Langmuir*, **1998**, 14, p. 4559.
- [26] Schwinté P., Voegel J.-C., Picart C., Haikel Y., Schaaf P., Szalontai B., *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, p. 11906.
- [27] Schwinté P., Ball V., Szalontai B., Haikel Y., Voegel J.-C., Schaaf P., *Biomacromol.*, **2002**, 3, p. 1135.
- [28] Houska M., Brynda E., *J. Colloid Interface Sci.*, **1997**, 188, p. 243.
- [29] Brynda E., Houska M., *J. Colloid Interface Sci.*, **1996**, 183, p. 18.
- [30] Golander C.-G., Lin Y.-S., Hlady V., Andrade J.D., *Colloids Surf.*, **1990**, 49, p. 289.
- [31] Brynda E., Houska M., *Protein Architecture: Interfacing Molecular Assemblies and Immobilization Biotechnology*, Y. Lvov, H. Moehwald (eds), Marcel Dekker, New York, **2000**, p. 251.
- [32] Serizawa T., Yamaguchi M., Matsuyama T., Akashi M., *Biomacromol.*, **2000**, 1, p. 306.
- [33] Serizawa T., Yamaguchi M., Akashi M., *Biomacromol.*, **2002**, 3, p. 724.
- [34] Chluba J., Voegel J.-C., Decher G., Erbacher P., Schaaf P., Ogier J., *Biomacromol.*, **2001**, 2, p. 800.
- [35] Schwinté P., Jessel N., Falvey P., Darcy R., Schaaf P., Voegel J.-C., Ogier J., *Advanced Funct. Materials*, **2003** (sous presse).
- [36] Schuler C., Caruso F., *Macromolecular Rapid Communications*, **2000**, 21, p. 750.
- [37] Caruso F., Schuler C., *Langmuir*, **2000**, 16, p. 9595.
- [38] Ariga K., Kunitake T., *Protein Architecture: Interfacing Molecular Assemblies and Immobilization Biotechnology*, Y. Lvov, H. Moehwald (eds), Marcel Dekker, New York, **2000**, p. 169.
- [39] Caruso F., *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, p. 423.
- [40] Donath E., Sukhorukov G.B., Caruso F., Davis S.A., Mohwald H., *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **1998**, 37, p. 2202.
- [41] Caruso F., Donath E., Moehwald H., *J. Phys. Chem.*, **1998**, 102, p. 2011.
- [42] Sukhorukov G.B., Donath E., Lichtenfeld H., Knippel E., Knippel M., Budde A., Mohwald H., *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.*, **1998**, 137, p. 253.
- [43] Caruso F., Caruso R.A., Mohwald H., *Science*, **1998**, 282, p. 1111.
- [44] Caruso F., Mohwald H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, p. 6039.
- [45] Lvov Y., Caruso F., *Anal. Chem.*, **2001**, 73, p. 4212.
- [46] Caruso F., Trau D., Moehwald H., Renneberg R., *Langmuir*, **2000**, 16, p. 1485.
- [47] Bobreshova M.E., Sukhorukov G.B., Saburova E.A., Elfimov L.I., Shabarchina L.I., Sukhorukov B.I., *Biofizika*, **1999**, 44, p. 813.
- [48] Balabushevitch N.G., Sukhorukov G.B., Moroz N.A., Volodkin D.V., Larionova N.I., Donath E., Mohwald H., *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, 76, p. 207.
- [49] Antipov A.A., Sukhorukov G.B., Donath E., Mohwald H., *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, p. 2281.
- [50] Gao C.Y., Moya S., Lichtenfeld H., Casoli A., Fiedler H., Donath E., Mohwald H., *Macromol. Mater. Eng.*, **2001**, 286, p. 355.
- [51] Schneider S., Feilen P.J., Sloty V., Kampfner D., Preuss S., Berger S., Beyer J., Pommersheim R., *Biomaterials*, **2001**, 22, p. 1961.
- [52] Yang W., Trau D., Renneberg R., Yu N.T., Caruso F., *J. Colloid Interface Sci.*, **2001**, 234, p. 356.
- [53] Shi X.Y., Caruso F., *Langmuir*, **2001**, 17, p. 2036.
- [54] Moehwald H., Donath E., Sukhorukov G., *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*, G. Decher, J.B. Schlenoff (eds), Wiley-VCH Weinheim, **2003**, p. 363.
- [55] Sukhorukov G.B., Antipov A.A., Voigt A., Donath E., Mohwald H., *Macromolecular Rapid Communications*, **2001**, 22, p. 44.
- [56] Sukhorukov G.B., Brumen M., Donath E., Mohwald H., *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, p. 6434.
- [57] Radtchenko I.L., Sukhorukov G.B., Mohwald H., *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.*, **2002**, 202, p. 127.
- [58] Tiourina O.P., Antipov A.A., Sukhorukov G.B., Larionova N.L., Lvov Y., Mohwald H., *Macromol. Biosci.*, **2001**, 1, p. 209.



J.-C. Voegel



G. Decher



P. Schaaf

**Jean-Claude Voegel**

est directeur de recherches à l'Inserm, directeur de l'Unité Inserm U595 à la Faculté de chirurgie dentaire de Strasbourg\*.

**Gero Decher et Pierre Schaaf**

sont professeurs à l'université Louis Pasteur de Strasbourg\*\* et responsables d'équipe à l'Institut Charles Sadron (ICS), UPR 22 du CNRS.

\* Unité Inserm U595, Faculté de chirurgie dentaire, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex.

Tél. : 03 90 24 33 87. Fax : 03 90 24 33 79.

Courriel : Jean-Claude.Voegel@medecine.u-strasbg.fr

\*\* Université Louis Pasteur, 6 Rue Boussingault, 67083 Strasbourg Cedex.

Tél. : 03 88 41 40 66. Fax : 03 88 41 40 99.

Courriels : decher@cerbere.u-strasbg.fr

schaaf@cerbere.u-strasbg.fr

**NOUVEAUX**

**STRATOSPHERES™**



**Polymer Laboratories**

Polymer Laboratories SARL  
Centre Silic Marseille Sud, Impasse du Paradou  
Bâtiment A4, 13009 Marseille  
Tel: 04 91 17 64 00 Fax: 04 91 17 64 01

[www.polymerlabs.fr](http://www.polymerlabs.fr)

## Resines Scavenger

### A Forte Capacité Pour La Synthèse En Solution

Polymer Laboratories vient de mettre sur le marché une gamme de résines microporeuses « scavenger » à forte capacité pour la synthèse en solution dans la série des résines StratoSpheres™ développées pour la chimie combinatoire et la synthèse peptidique.

Un nouveau kit de démarrage comprenant 10 résines différentes est disponible pour faciliter le choix du support et disposer d'un grand champ d'application. Pour obtenir des renseignements sur notre gamme de produits, visitez notre site internet [www.polymerlabs.com/stratospheres](http://www.polymerlabs.com/stratospheres), envoyez un message à Support@polymerlabs.fr ou téléphonez nous.

Polymer Laboratories réalise des résines qui possèdent de grandes performances et un excellent rapport qualité-prix pour la synthèse en solution, la chimie combinatoire et la synthèse peptidique.