

Les polymères utilisés dans le domaine des biomatériaux

De la fonctionnalisation de surface à l'ingénierie tissulaire

Youri Arntz, Vincent Ball (*coordinateur*), Nadia Benkirane-Jessel, Fouzia Boulmedais, Christian Debry, Maria Dimitrova, René Elkaim, Youssef Haikel, Joseph Hemmerlé, Philippe Laval, Florent Meyer, Sabine Muller, Joëlle Ogier, Pierre Schaaf, Bernard Senger, Vesna Stanic, Henri Tenenbaum, Dominique Vautier, Constant Vodouhê, Dmitry Volodkin, Jean-Claude Voegel et Sandra Werner

Résumé Cet article définit en premier lieu les conditions sous lesquelles un matériau implanté dans un organisme vivant se comporte comme un « biomatériau ». Il illustre ensuite par plusieurs exemples comment des polymères, d'origine naturelle ou synthétique, peuvent être utilisés, soit pour recouvrir la surface d'un implant dans le but de contrôler l'adsorption non spécifique de protéines et de favoriser l'adhésion cellulaire spécifique à la surface de l'implant, soit en tant que gel dans le but de favoriser la recolonisation tissulaire d'une région qui a subi une lésion. Il montre enfin que la chimie combinatoire peut permettre d'élargir la gamme de polymères utilisables en tant que biomatériaux.

Mots-clés **Biomatériaux, polyesters hydrolysables, polysaccharides, poly(amino acides), transfection de gènes, chimie combinatoire.**

Abstract **Polymers in biomaterials science: from surface functionalisation to tissue engineering**
This article first defines the conditions a material implanted in a living organism has to fulfil to be considered as a biomaterial. It presents then some examples in which natural or synthetic polymers can be used either to coat the surface of an implant, with the aim to simultaneously reduce non specific protein adsorption and to favour specific cell adhesion, or in the form of a gel in order to induce recolonisation of a tissue in an injured region of a living organism. It finally shows that more efficient polymers for a given purpose can be synthesised with the tools of combinatorial chemistry.

Keywords **Biomaterials, hydrolysable polyesters, polysaccharides, poly(aminoacids), gene transfection, combinatorial chemistry.**

Cet article fait suite à la conférence donnée par Vincent Ball lors des 22^e Journées pour l'innovation et la recherche dans l'enseignement de la chimie (JIREC) qui se sont tenues à Strasbourg en mai 2006, sur le thème : « Polymères organiques : du monomère à l'objet ».

Nous nous intéresserons principalement ici à « l'objet polymère » en biologie, en considérant non seulement les polymères de synthèse, mais également les biopolymères. Cette revue ne peut prétendre en aucun cas couvrir l'ensemble du domaine des biomatériaux et de l'utilisation des polymères dans ce domaine. Elle a pour cible principale des étudiants en sciences des matériaux et des chercheurs non spécialistes des biomatériaux. Le domaine est vaste et complexe et de nombreuses revues spécialisées comme *Biomaterials*, *Journal of Biomaterials Research*, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* ou *Acta Biomaterialia* lui sont exclusivement consacrées. Il faut y ajouter des revues plus généralistes à la fois en physique, chimie et

biologie qui publient des articles consacrés au sujet. Nous souhaitons simplement illustrer la problématique générale dans le domaine des biomatériaux et décrire les principales familles de polymères couramment utilisés, l'ensemble des conditions qu'un polymère doit satisfaire pour pouvoir être intégré dans un organisme vivant. Quelques applications récentes dans le domaine de la libération contrôlée de médicaments seront présentées. Nous montrerons aussi l'utilisation de matrices polymères ou de gels comme milieux de recolonisation cellulaire. Ce sera l'occasion de décrire un domaine en émergence au sein des sciences biologiques : l'ingénierie tissulaire. Enfin, nous illustrerons par un exemple concret – celui de la préparation de polymères pour la thérapie génique – comment la chimie combinatoire pourra révolutionner les stratégies de recherche dans la conception de polymères utilisables en tant que biomatériaux.

Le but réel de cet article est de montrer que l'ingénierie des biomatériaux est un domaine de recherche passionnant, tourné vers les applications biomédicales mais en relation

Glossaire

Les termes suivis d'un astérisque* dans le texte sont définis ci-dessous.

α -MSH : abréviation de « α -melanocyte stimulating hormone ».

Angiogenèse : processus biologique aboutissant à la genèse de vaisseaux sanguins.

Antigène : toute molécule reconnue comme étrangère par le système immunitaire de l'hôte.

Adsorption : fixation transitoire ou définitive d'une molécule à une interface. Dans le premier cas, l'adsorption est dite réversible, dans le second, elle est dite irréversible.

Chondrocytes : cellules arrondies et volumineuses (d'un diamètre de 20 à 40 μm) présentes dans le cartilage qui synthétisent et dégradent les composants de la matrice extracellulaire du cartilage, à savoir le collagène de type II et IX en particulier et les glycosaminoglycanes. Elles participent également à la synthèse et au maintien du tissu cartilagineux.

Endocytose : mécanisme de transport de molécules voire de particules (telles que des virus ou des bactéries) vers l'intérieur de la cellule, c'est donc un mécanisme d'internalisation. L'endocytose a lieu quand une partie de la membrane entoure complètement une particule ou une grosse molécule et la fait pénétrer de l'extérieur vers l'intérieur d'une cellule.

Endosomes : sous-compartiments de la cellule, ou organelles, sur lesquels des « vésicules d'endocytose » s'accrochent et fusionnent pour libérer leur contenu (les molécules qui étaient à la surface de la cellule et qui ont été internalisées à l'intérieur de cette vésicule). Ces vésicules d'endocytose se sont formées à la surface de la cellule. Elles portent généralement un manteau protéique organisé en plusieurs couches. La dernière couche protéique est formée d'un assemblage de clathrine qui constitue une « cage » autour de la vésicule. Les macromolécules qui sont

internalisées dans la cellule par ces vésicules peuvent être des récepteurs placés à la surface de la cellule et qui ont interagi avec un ligand extracellulaire. Les endosomes sont des compartiments qui permettent le tri des molécules internalisées. Celles-ci pourront avoir plusieurs devenir : soit repartir vers la membrane plasmique, soit être dégradées par des systèmes de dégradation intracellulaire, soit être redirigées vers d'autres compartiments intracellulaires.

Hémoglobine : protéine multimérique obtenue par l'association de deux sous-unités α et de sous-unités β . Chaque sous-unité est capable de fixer une molécule de dioxygène. Lorsque l'une des sous-unités a fixé une molécule O_2 , l'affinité de la sous-unité suivante pour le dioxygène augmente. L'hémoglobine présente donc une coopérativité positive pour la fixation de O_2 .

Oxydant : toute substance (atome, molécule ou ion) capable de fixer un ou plusieurs électrons. De ce fait un oxydant subit une réaction de réduction.

PGA- α -MSH : acide poly-L-glutamique conjugué au α -MSH.

Polymère en bloc : polymère linéaire comportant des régions de composition différentes. Un copolymère dibloc comporte deux blocs et sa composition peut être écrite sous la forme AB où le bloc A comporte en moyenne m monomères de type a et le bloc B, n monomères de type b.

Porosité : elle est égale au rapport entre le volume des régions vides et le volume total du matériau.

Réducteur : toute substance (atome, molécule ou ion) capable de libérer un ou plusieurs électrons. De ce fait un réducteur subit une réaction d'oxydation.

Sarcome : tumeur maligne qui se forme à partir d'un tissu conjonctif ou de tissus qui en dérivent comme les tissus musculaires ou osseux.

permanente avec la recherche fondamentale, à l'interface entre la physique, la chimie et la biologie. Nous ne nous contenterons pas d'utiliser des exemples tirés de nos propres laboratoires de recherche, mais nous essayerons de couvrir le domaine de la manière la plus large possible, sans toutefois prétendre à l'exhaustivité. Avant de décrire les grandes familles de polymères utilisées, il nous faut expliquer ce qu'est un biomatériau et quelles sont les exigences auxquelles il doit satisfaire.

Qu'est-ce qu'un biomatériau ?

De nombreux ouvrages de référence peuvent être consultés à ce sujet [1-2]. Nous nous contenterons ici de dire qu'« un biomatériau est un dispositif destiné à améliorer les propriétés d'un organe ou à remplacer un organe ou bien encore à remplacer/créer une fonction déficiente dans un organisme vivant. » Des exemples de tels matériaux sont nombreux : valves cardiaques (en carbone pyrolytique, en titane...), stimulateurs cardiaques (en acier inoxydable), prothèses dentaires (en alliage d'or, en biocéramique, divers alliages du titane...), prothèses orthopédiques (en alliage titane-aluminium-vanadium...), lentilles de contact (faites à partir d'un hydrogel), systèmes de dialyse rénaux... De nouveaux produits sont en cours d'optimisation et seront bientôt mis sur le marché : peaux artificielles, pancréas bioartificiel, etc. Il faut rappeler que le sang est un tissu et que toute tentative d'ajout de transporteur d'oxygène, par exemple des fluorocarbures, destiné à remplacer une hémoglobine* qui fixe mal le dioxygène, consiste à « implanter » un biomatériau dans ce tissu.

Vu le vieillissement de la population, le marché des biomatériaux est en expansion constante. Rien qu'aux États-Unis, on estime à environ 34 millions par an le nombre d'interventions chirurgicales liées à l'implantation d'un biomatériau...

D'après la définition proposée ci-dessus, un biomatériau est donc destiné à être placé au contact intime de tissus et de fluides biologiques. Ces fluides assurent les échanges de dioxygène, de dioxyde de carbone, des oxydes d'azote entre les tissus et l'atmosphère, mais également les échanges de toutes les molécules impliquées dans les processus métaboliques et les molécules liées aux échanges d'information (hormones, molécules du système immunitaire...). Considérons la composition moyenne du sang : l'ensemble des cellules en suspension (globules blancs, globules rouges et plaquettes... qui en toute rigueur ne doivent pas être considérées comme des cellules) occupe une fraction volumique de 40 % tandis que la phase liquide (le plasma) occupe les 60 % du volume restant. Cette phase liquide est avant tout une solution d'électrolyte (solution ionique) dont le pH est fixé par les ions phosphates essentiellement (le pKa du couple $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ est égal à 7,2). Cette solution électrolytique solubilise les molécules du métabolisme ainsi que des agrégats lipidiques. Elle contient de 6 à 8 % de protéines en fraction massique. Parmi celles-ci, l'albumine et le fibrinogène sont les plus abondantes et interagissent avec presque toutes les interfaces en s'y adsorbant. La surface d'un biomatériau recouverte d'une couche de protéines adsorbées pourra interagir avec des cellules ; nous y reviendrons. Ce phénomène d'adsorption* est complexe, de par l'abondance et la diversité des protéines solubilisées dans le plasma, et dynamique (*encadré 1*).

Encadré 1***Dynamique de l'adsorption des protéines***

Les premières molécules protéiques à pouvoir s'adsorber sur une surface à partir du sérum sont celles qui atteignent en premier l'interface solide-liquide considérée. Ce sont donc celles pour lesquelles le flux diffusif initial est le plus élevé, ce flux étant égal au produit du coefficient de diffusion de la protéine considérée et de sa concentration (si l'on considère que la concentration initiale en protéines adsorbées à l'interface est nulle). Mais lorsqu'une protéine a établi un certain nombre d'interactions avec les molécules exposées à la surface d'un biomatériau, elle n'y reste pas nécessairement adsorbée de façon irréversible : elle peut être déplacée par des protéines de même nature ou plus probablement par des protéines de nature différente, si celles-ci présentent une plus forte affinité pour la surface du biomatériau (en général, la variation d'énergie libre associée à l'adsorption est une fonction croissante de la masse moléculaire de la protéine pour une raison très simple : les protéines de forte masse moléculaire présentent une grande surface accessible et donc potentiellement un plus grand nombre de sites susceptibles d'interagir avec les groupements chimiques du substrat d'adsorption).

Le déplacement de protéines déjà adsorbées par des protéines en solution constitue le phénomène de « l'échange protéique ». Il a été amplement étudié dans la littérature à la fois pour des systèmes simples et pour une protéine individuelle (marquée avec un fluorophore ou un isotope radioactif) au sein du plasma [3]. Les protéines adsorbées après l'atteinte d'un état stationnaire constitueront des sites d'ancrage pour l'adhésion cellulaire. Il faut retenir que l'adsorption protéique à la surface d'un biomatériau non fonctionnalisé est un phénomène aspécifique tandis que l'adhésion cellulaire est un processus hautement spécifique par lequel des récepteurs protéiques exposés à la surface de la membrane cellulaire interagissent avec des motifs d'acides aminés immobilisés sur la cible, l'endroit où la cellule considérée va établir le premier contact avec son substrat d'adhésion (avant une cascade d'événements ultérieurs : étalement, migration, prolifération et une éventuelle différenciation cellulaire). Il existe un grand nombre de motifs d'adhésion spécifiques, dont la triade RGD (R, G et D désignent respectivement l'arginine, la glycine et l'acide aspartique) qui est présente dans de nombreuses protéines dont le fibrinogène et la fibronectine, deux protéines que l'on retrouve souvent adsorbées à des interfaces solide-liquide. Si de telles protéines s'adsorbent sur la surface d'un biomatériau, la surface de celui-ci devient un site d'adhésion pour de nombreux types de cellules. Cette adhésion cellulaire peut être ou non un événement favorable. Au titre des événements défavorables, on peut citer le dépôt de biofilms bactériens, mais aussi la formation de « couches fibreuses » autour des implants, celles-ci résultant de l'adhésion de fibroblastes (suite à l'adsorption de protéines) à la surface des implants. Ces cellules expriment alors à leur surface des récepteurs spécifiques du collagène dont le dépôt entraîne l'apparition de ladite couche fibreuse qui peut ralentir, voire empêcher l'accès des molécules du métabolisme aux cellules en contact avec l'implant.

L'adsorption protéique est également un phénomène complexe par le fait que de nombreux substrats induisent une dénaturation progressive (un changement de conformation) des protéines adsorbées. De ce fait, la nature des groupements chimiques exposés à la solution aqueuse par

les protéines adsorbées est susceptible de changer en fonction du temps, même si le processus d'échange peut être considéré comme achevé.

En tout cas, si l'expérimentateur ou le clinicien ne sont pas capables de contrôler l'adsorption protéique, ils ne seront pas maîtres des événements ultérieurs. Il serait donc souhaitable d'éviter toute adsorption non spécifique (encadré 2) et d'immobiliser à la surface du biomatériau des molécules interagissant spécifiquement avec un type cellulaire donné.

Encadré 2***Principe des stratégies visant à réduire l'adsorption aspécifique des protéines***

De vastes programmes de recherche (encore en cours) visent à greffer selon une orientation contrôlée et avec une densité de surface contrôlée des molécules possédant à la fois des propriétés permettant d'éviter toute adsorption spécifique et contenant des sites permettant une adsorption ou une adhésion cellulaire spécifiques. Ces deux fonctionnalités peuvent être obtenues à partir d'un polymère à structure ramifiée dont le « squelette » permet l'immobilisation à la surface du biomatériau et dont les « bras » portent, par exemple, du polyéthylène glycol (PEG) permettant de réduire considérablement l'adsorption protéique aspécifique et des motifs RGD à densité contrôlée afin de favoriser l'adhésion cellulaire. Cet exemple donne une première illustration du rôle que jouent les polymères dans le domaine de l'ingénierie de surface des biomatériaux.

Jusqu'à présent, nous avons insisté sur l'importance qu'il y avait à contrôler de manière spécifique l'adsorption des protéines à la surface d'un biomatériau, mais ce n'est pas le seul problème à résoudre lors de la mise en contact d'un biomatériau avec un fluide biologique. Nous allons maintenant décrire le cahier des charges complet que doit satisfaire un biomatériau. Par la même occasion, nous allons répertorier les avantages (et les inconvénients) que peuvent offrir des biomatériaux à base de polymères par rapport à des biomatériaux à base de métaux ou d'alliages métalliques.

Le cahier des charges des biomatériaux du futur

Avant de poursuivre, il faut définir la notion de « biocompatibilité » : on dit qu'un matériau est biocompatible s'il est capable de remplir sa fonction sans effet adverse sur l'environnement biologique dans lequel il est implanté. Les phosphates de calcium, les carbonates de calcium, la silice ainsi que d'autres biocéramiques sont des matériaux biocompatibles.

En plus du contrôle de l'adsorption des protéines à l'interface solide-liquide, un « bon » biomatériau doit :

• être stable dans son site d'implantation

Cette stabilité doit être à la fois de nature chimique et de nature physique. Dans le domaine de la stabilité chimique, le biomatériau, s'il est de nature polymère, ne doit pas libérer de molécules toxiques durant toute la période d'implantation dans l'organisme, c'est-à-dire sur un intervalle de temps de plusieurs années. Ce critère limite fortement le choix des polymères utilisables, surtout si l'on souhaite que le biomatériau polymère se dégrade progressivement par hydrolyse (il va libérer alors des monomères que l'organisme doit éliminer).

Dans le cas d'implants à base d'alliages métalliques, le critère de stabilité chimique repose essentiellement sur l'absence de libération d'ions métalliques issus de la corrosion (les fluides biologiques sont des milieux relativement oxydants* et les métaux sont pour la plupart de bons réducteurs*). Ainsi, les métaux « idéaux » en science des biomatériaux sont ceux qui se recouvrent spontanément d'une couche d'oxyde compacte et fortement imperméable. Le titane recouvert d'une couche d'oxyde compacte et dont l'épaisseur croît progressivement suivant le temps de contact avec le fluide biologique constitue un métal modèle [4].

En termes de stabilité physique, les propriétés mécaniques du biomatériau utilisé comme prothèse doivent être peu affectées sur un nombre de cycles charge-décharge très élevé (de l'ordre de 10^8). En particulier, les forces de frottement conduisent souvent à la perte d'intégrité du matériau et à la libération de petites particules au voisinage du site de l'implantation. Il apparaît que des débris de taille inférieure à 5 ou 10 μm sont en général particulièrement toxiques vis-à-vis de la plupart des lignées cellulaires, même si le matériau dont ces débris sont issus est parfaitement biocompatible [5].

• **posséder une rugosité et une porosité bien contrôlées**

Là aussi, il n'y a pas de réponse bien tranchée : est-il plus favorable d'utiliser des surfaces rugueuses (dont la surface réelle accessible aux molécules d'intérêt est supérieure à la surface plane) ou des surfaces très lisses ? La même question se pose quant à la porosité* et la distribution de la taille des pores. D'un côté, une forte rugosité peut augmenter la surface de contact entre l'implant et les cellules du tissu avoisinant, ce qui va favoriser l'adhésion entre les deux matériaux. Un exemple de biomatériau rugueux à base de macrobilles de titane destiné à servir comme prothèse de trachée après une fonctionnalisation chimique adéquate est représenté *figure 1* [6].



Figure 1 - (a) Exemple de prothèse de trachée constituée de billes de titane, comprenant deux ouvertures en forme de cylindre aux extrémités (photographie de gauche, flèches blanches) ainsi qu'une ouverture longitudinale (photo de droite, flèche blanche) ; (b) Photographie montrant une telle prothèse en titane implantée au niveau de la trachée d'un rat (d'après [6]).

D'un autre côté, une surface trop rugueuse ou trop poreuse va offrir un grand nombre de crevasses favorables au développement de biofilms bactériens. Il a été démontré que des surfaces très peu rugueuses à base de polymères ou de céramiques pouvaient induire des sarcomes* alors que ce n'est pas le cas avec des surfaces rugueuses ayant la même composition chimique.

• **être facilement stérilisable**, afin de réduire les risques de contamination et de prolifération bactériennes.

• **avoir des propriétés mécaniques contrôlées**, notamment une élasticité proche de celle des tissus environnants.

De nombreux travaux expérimentaux ont montré qu'en plus de motifs d'adhésion spécifiques à sa surface, un biomatériau devait posséder une élasticité appropriée [7]. À titre d'exemple, beaucoup de lignées cellulaires adhèrent très mal sur des matériaux présentant un faible module d'Young [7]. Nous rappelons sur la *figure 2* que le module d'Young est égal à la pente de la courbe qui relie la contrainte appliquée au matériau (un exemple de dispositif permettant de mesurer le module d'élasticité est représenté schématiquement sur la partie droite) à sa déformation (une déformation longitudinale dans ce cas). Cette relation de proportionnalité entre la contrainte et la déformation n'est valable que dans le domaine des faibles déformations.

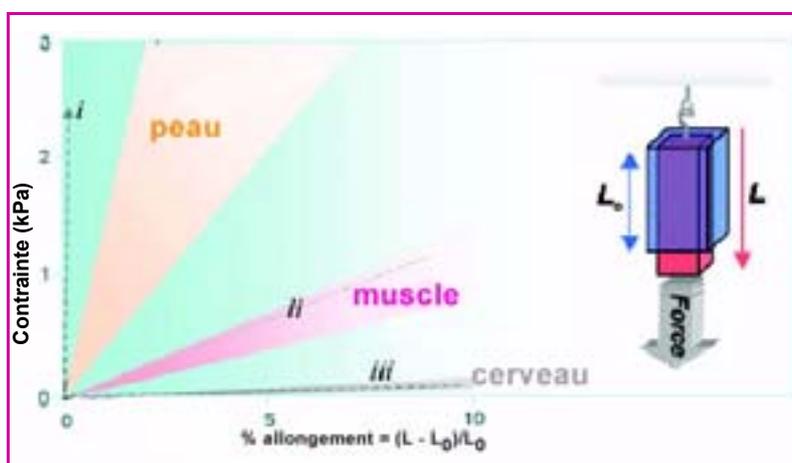


Figure 2 - Représentation de la variation de la contrainte lors de l'allongement d'un matériau en fonction de sa déformation, dans le régime des petites déformations.

La pente des droites obtenues donne la valeur du module d'Young du matériau. De haut en bas : domaine de variation du module d'Young pour la peau, le tissu musculaire et le tissu cérébral. La partie droite représente un schéma de principe du dispositif expérimental (d'après [7]).

• C'est presque anecdotique, mais pour de nombreuses applications, notamment dans le domaine dentaire, le matériau doit **présenter un aspect « esthétique »**, en termes de couleur, de brillance, etc.

• Enfin, et c'est sans doute le critère essentiel, le matériau implanté ne doit **donner lieu ni à une réaction de rejet immunitaire, ni à une réaction inflammatoire marquée**.

Il est facile d'imaginer qu'il y a très peu de matériaux disponibles dans le commerce qui satisfont simultanément à tous ces critères. On comprend donc la nécessité qu'il y a de mettre de nouveaux

produits sur le marché en recouvrant des matériaux solides déjà disponibles à l'aide d'un revêtement dont le but est de rendre ce matériau « furtif » vis-à-vis des tissus biologiques. D'un autre côté, il n'est souvent pas nécessaire d'utiliser un matériau solide : pour la réparation ou la régénération d'un tissu mou, il peut sembler intéressant d'implanter un gel poreux qui peut constituer, après optimisation de ses

propriétés mécaniques, une matrice de croissance pour les cellules du tissu envisagé. Dans les deux cas de figure, on imagine aisément le rôle que peuvent jouer les matériaux polymères. Le premier cas consiste en la fonctionnalisation « classique » de la surface d'un biomatériau (on peut considérer à ce titre l'adsorption protéique à partir du plasma comme la fonctionnalisation passive d'un biomatériau par un mélange de biopolymères), tandis que le second cas constitue un domaine de recherche émergent : celui de l'ingénierie tissulaire [8-11].

Notons qu'un biomatériau dit « du futur » doit non seulement isoler l'implant des fluides ou des tissus environnants, mais qu'il devra également provoquer une réponse biologique « programmée ». Nous allons présenter maintenant quelques exemples, que nous espérons significatifs, de fonctionnalisation de biomatériaux et d'ingénierie tissulaire.

Recouvrement de biomatériaux par des films polymères : contrôle de l'adhésion cellulaire

Avant de décrire les stratégies de fonctionnalisation de matériaux solides par des films polymères biocompatibles, il nous faut énumérer les principaux polymères utilisés. Les molécules sélectionnées doivent répondre aux critères généraux identifiés dans la partie précédente, à savoir essentiellement l'absence de réaction immunitaire et inflammatoire et l'absence de libération de molécules toxiques, ainsi que le contrôle des propriétés mécaniques.

Afin d'éviter toute réaction de rejet, il semble naturel de s'inspirer des polymères que les organismes vivants synthétisent, donc de mettre en œuvre une stratégie de « biomimétisme ». Une large gamme de biopolymères sont présents dans tout le règne animal ou végétal (*figure 3*) et devraient donc permettre de réduire le risque de rejet immunitaire. On peut citer l'acide hyaluronique (HA) qui joue un rôle majeur comme éponge à eau, les alginate (polymères en bloc* d'acide mannuronique (M sur la *figure 3*) et d'acide glucuronique (G sur la *figure 3*) où les blocs d'acide glucuronique servent de point de réticulation, par formation d'un pont ionique entre les chaînes, lors de la gélification induite

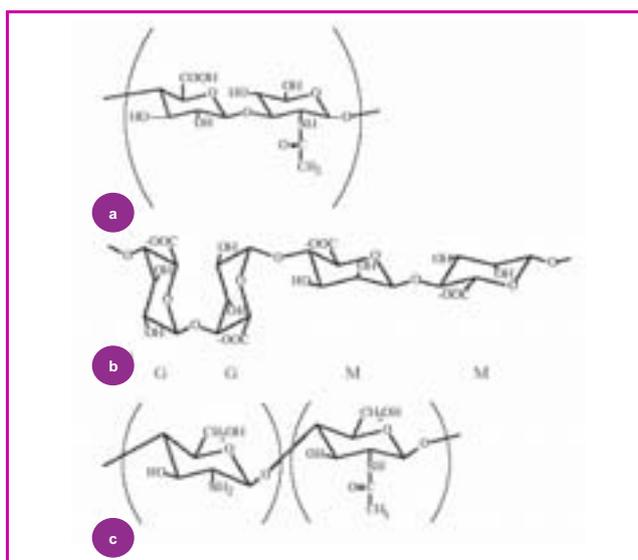


Figure 3 - Structure (a) de l'unité monomère de l'acide hyaluronique (HA), (b) d'une séquence GGMM de l'alginate et (c) de deux monomères du chitosane, le premier sous forme déacétylée et le second sous sa forme acétylée (insoluble dans l'eau).

par l'addition d'une solution contenant des ions Ca^{2+}), le chitosane (Cl) qui est la forme déacétylée de la chitine (le biopolymère le plus abondant sur Terre, que l'on trouve par exemple dans la cuticule des crustacés).

D'autres biopolymères comme la chondroïtine sulfate et l'héparine sulfate sont également utilisés pour le recouvrement d'implants afin de leur conférer des propriétés anticoagulantes. Les biopolymères utilisés doivent être purifiés avant leur utilisation directe ou leur fonctionnalisation. Cette purification a pour but d'éliminer toute trace de molécules qui pourraient être reconnues comme des antigènes* par l'organisme dans lequel le biomatériau doit être implanté. Il est utile de préciser que cette « contrainte » de pureté rend les études beaucoup plus compliquées lorsqu'il s'agit de passer d'une expérimentation *in vitro* à une expérimentation *in vivo*, c'est-à-dire au moment de l'implantation chez l'animal ou chez l'homme. Les tests *in vitro* constituent néanmoins une étape préliminaire indispensable au développement d'un nouveau biomatériau.

Les protéines et les polypeptides appartiennent bien sûr à cette famille de biopolymères utilisés pour la fonctionnalisation de biomatériaux. Notons que si l'on veut préparer des biomatériaux injectables, un contrôle rigoureux de la viscosité des solutions s'impose également.

En tout état de cause, les biopolymères ne constituent pas la panacée et il faut avoir recours aux polymères de synthèse, de façon « réfléchie », afin d'élargir le champ des polymères utilisables. De manière générale, les polymères sélectionnés sont soit hydrosolubles, soit hydrophobes mais se dégradant au contact de l'eau. Dans ce dernier cas, le « biomatériau polymère » est conçu pour avoir une durée de vie limitée. On utilise ainsi très fréquemment des polyesters qui subissent une hydrolyse au contact de l'eau (la réaction d'estérification est réversible : la réaction de l'eau sur un ester aboutit à la formation d'un alcool et d'un acide carboxylique). Nous avons déjà signalé à maintes reprises que les produits de dégradation du polymère initial ne doivent pas être cytotoxiques. C'est le cas des produits de dégradation des copolymères à base d'acide (poly-D-lactique) et (poly-D-glycolique) qui produisent de l'acide lactique et de l'acide glycolique (produits du métabolisme) lors de leur hydrolyse. Dans le cas des polymères hydrophiles, le poly(oxyde d'éthylène) (PEO ou PEG) est fréquemment utilisé pour le recouvrement d'implants par un film permettant de supprimer presque totalement toute adsorption protéique non spécifique [12]. Il a été démontré que la longueur moyenne des chaînes greffées ainsi que la densité de greffage constituent les paramètres les plus importants pour réduire l'adsorption protéique. Le mécanisme conduisant à une forte réduction de l'adsorption protéique continue d'être étudié de façon intensive [13-14]. Il semble que la forte réduction de l'adsorption protéique soit liée à la flexibilité des chaînes de PEG et à la structuration de l'eau autour de ces chaînes. Notons aussi qu'il est possible de greffer le PEG (préalablement modifié à ses extrémités de chaîne) sur des polyamino acides cationiques ou anioniques [14-15]. Si ceux-ci conservent une partie de leur densité de charge initiale après greffage, il est possible de les déposer par simple adsorption sur la surface d'un biomatériau (qui le plus souvent porte une densité de charge électrostatique non nulle à pH physiologique). La structure des unités monomères de polymères hydrophiles fréquemment utilisés pour la fonctionnalisation de biomatériaux est représentée sur la *figure 4*.

Il existe différentes méthodes d'immobilisation, schématisées sur la *figure 5*, de ces polymères sur la surface d'un

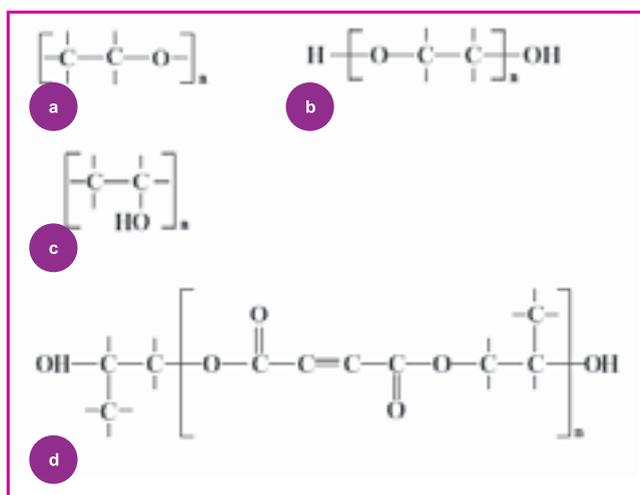


Figure 4 - Structure des unités monomères du (a) : poly(oxyle d'éthylène), (b) : poly(éthylène glycol), (c) : alcool poly(vinyle) et (d) : poly(propylène fumarate).

implant. La figure représente spécifiquement le cas des polypeptides et des protéines, mais ces concepts peuvent être étendus à tous les biopolymères envisagés.

On peut également utiliser des matériaux fortement poreux fabriqués à partir de gels ou hydrolysables contenant des substances actives qui seront libérées progressivement lors de la dégradation spécifique de la matrice polymère. Les pores du matériau solide servent alors simplement de matrice d'imprégnation [16]. Dans le même ordre d'idées, de nombreux travaux ont consisté à déposer un gel à la surface du matériau, les polymères constitutifs de ce gel comportant des motifs d'adhésion cellulaire greffés de manière covalente (voir [9] pour de plus amples détails). Le gel poreux va être progressivement envahi par les cellules qui y trouveront ainsi une matrice tridimensionnelle permettant leur prolifération.

Notons que de nombreux films polymères à base d'hydrogels ou de multicouches de polyélectrolytes (la stratégie de fonctionnalisation employée dans nos laboratoires repose sur l'adsorption alternée d'un polycation et d'un polyanion sur un substrat portant une densité de charge non nulle dans les conditions du dépôt, *figure 6*) ne présentent pas les propriétés mécaniques adéquates pour l'adhésion cellulaire et peuvent même être détachés du substrat sous l'influence d'une contrainte de cisaillement assez faible. Il faut donc dans certains cas augmenter la densité volumique de points de réticulation au sein du film ou du gel déposé. Cet objectif peut être atteint par une voie de réticulation chimique [17], ou de façon plus « biomimétique » par le dépôt d'un matériau composite (qui permet d'augmenter le module élastique du matériau) alliant une charge inorganique (qui doit être biocompatible) et un « liant » organique [18]. À titre d'exemple, on peut mentionner la combinaison de nanotubes de carbone et de polymères hydrolysables comme matrices injectables [19] pour l'ingénierie tissulaire.

Il a été démontré qu'une augmentation de la concentration d'agent réticulant – le 1-éthyl-3-(3-diméthyl aminopropyl) carbodiimide, EDC (*encadré 3*) – en présence d'un catalyseur entraînait une augmentation progressive du module d'Young de films multicouches de polyélectrolytes à base de HA et de poly-L-lysine (PLL) jusqu'à atteindre un

plateau à partir de 40 mg/mL en EDC. Au plateau, la valeur du module d'Young, mesurée par microscopie à force atomique à l'aide d'une pointe munie d'une sonde colloïdale sphérique, est de l'ordre de 400 kPa, alors qu'un film non réticulé possède un module d'Young pratiquement nul comme on pouvait s'y attendre pour un film non réticulé [20].

L'adhésion de chondrosarcomes humains sur de tels films augmente avec le module d'Young [21] et donc avec la concentration en EDC utilisé pour la réticulation du film. Ces observations expérimentales confirment l'hypothèse de l'importance de l'élasticité du biomatériau implanté ou du film polymère recouvrant la surface de ce biomatériau [7].

Les polymères en bloc et les films minces utilisés comme systèmes de libération de médicaments

Précédemment, nous avons montré qu'en modifiant la surface d'un biomatériau avec un film polymère (d'élasticité bien caractérisée) et en y greffant des motifs d'adhésion cellulaire, il était possible de contrôler non seulement la quantité de cellules adhérentes par unité de surface du biomatériau mais encore la nature des cellules adhérentes. Une telle propriété ne suffit pas nécessairement à assurer l'ensemble des fonctionnalités souhaitées : il faut encore moduler les réponses cellulaires comme la réponse inflammatoire et/ou immunitaire, d'où l'idée de « rajouter » des médicaments à la surface ou au cœur du volume du film polymère recouvrant le biomatériau. De nombreux exemples sont disponibles dans la littérature [8]. Au sein de nos laboratoires, nous avons inséré, par simple adsorption, des peptides antibactériens (comme la défensine) dans des films multicouches de polyélectrolytes [22]. Le couplage covalent à un polyélectrolyte de peptides modulant l'inflammation (du PGA couplé à un analogue du α -MSH*, noté PGA- α -MSH*), a également été utilisé pour induire une réponse anti-inflammatoire spécifique. Le concept a été validé *in vivo* sur des rats dans lesquels une trachée artificielle recouverte d'un film multicouche PLL-(PGA-PLL)₄-PGA- α -MSH ou PLL-(PGA-PLL)-(PGA- α -MSH)-(PLL-PGA)₃ a été implantée. Entre trois et

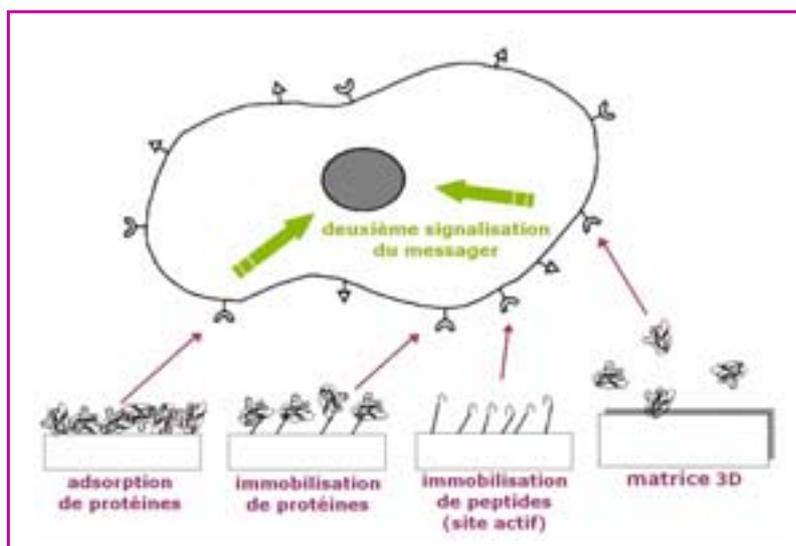


Figure 5 - Différentes méthodes d'immobilisation de protéines et de peptides à une interface solide-liquide, consistant à immobiliser des motifs de reconnaissance spécifiques pour les cellules destinées à adhérer sur la surface du matériau implanté. La complexité de la méthode de fonctionnalisation est croissante de gauche à droite (d'après [9]).

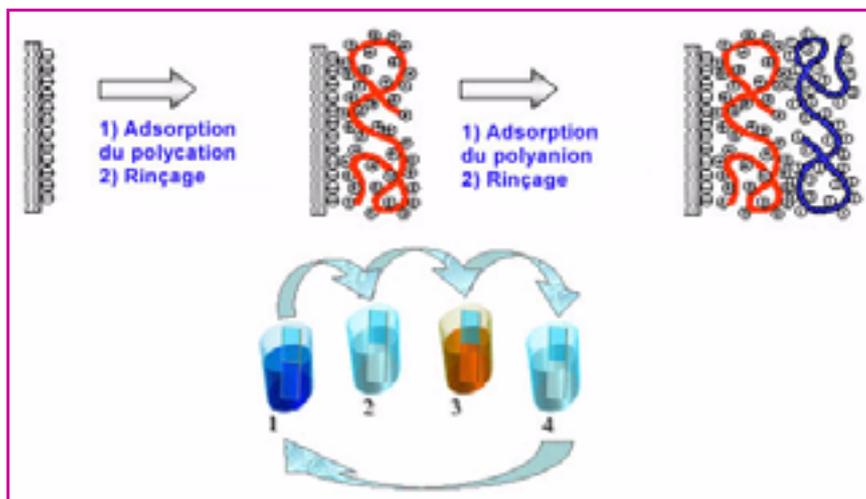


Figure 6 - Schéma de principe de la méthode de dépôt de films multicouches de polyélectrolytes sur des substrats chargés.

Nous envisageons ici le cas le plus fréquent d'un substrat portant des charges de surface négatives dans les conditions physico-chimiques du dépôt : l'adsorption d'un polycation (étape 1) se poursuivra jusqu'à ce que le coût énergétique de l'ajout de nouvelles molécules dans le film adsorbé devienne prohibitif. À l'état stationnaire, la densité de charges de surface est devenue positive : on a ainsi réalisé une inversion du signe de la charge de surface. Cela permet, après rinçage (étape 2) et élimination des molécules non adsorbées ou faiblement liées au substrat, d'adsorber un polyanion (étape 3). À l'état stationnaire, la charge de surface du matériau est redevenue négative. Après rinçage (étape 4), on peut recommencer le cycle de dépôt par l'étape 1. L'ensemble des étapes 1, 2, 3 et 4 permet le dépôt d'une paire de couches de polyélectrolytes. De cette façon, l'expérimentateur peut déposer autant de paires de couches qu'il le souhaite avec un très bon contrôle de l'épaisseur du film déposé (moyennant un contrôle rigoureux des paramètres physico-chimiques du dépôt, notamment de la concentration du sel de fond utilisé).

sept jours après l'implantation, le sérum des rats portant une telle prothèse fonctionnalisée est significativement enrichi en interleukine 10, un marqueur de l'occurrence d'une réaction anti-inflammatoire, par rapport aux rats portant une prothèse non modifiée [6].

Il faut noter que le couplage covalent d'une molécule spécifique au polymère doit être privilégié par rapport à une simple immobilisation passive, même si la réalisation de l'architecture nécessite un travail de synthèse chimique en amont de la fonctionnalisation du biomatériau. En effet, le plus souvent une proportion notable des peptides ou protéines adsorbées sur un matériau polymère est désorbée, soit au contact du plasma (dans le cas où la molécule d'intérêt est déposée en surface du matériau), soit au contact d'autres polymères si on l'enfouit au sein d'une matrice tridimensionnelle [23]. En revanche, la densité de greffage des molécules d'intérêt est connue précisément (par des techniques de caractérisation spectroscopiques) et l'on peut donc déterminer le nombre de molécules d'intérêt thérapeutique immobilisées par unité de surface du biomatériau.

De nombreuses équipes développent des stratégies d'immobilisation de vésicules lipidiques ou à enveloppe poly-

mère (en utilisant des polymères di- ou tribloc) dans des matrices polymères elles-mêmes immobilisées sur un biomatériau [24-25]. Ces vésicules contiennent des médicaments qui sont libérés dans le milieu environnant par un mécanisme de libération progressive. L'idéal serait de développer un système hybride polymère-vésicule totalement imperméable dans le but de ne libérer les médicaments que sous l'influence d'une perturbation extérieure (application d'une contrainte mécanique, application d'un champ électromagnétique ou augmentation de température). Cet objectif ne pourra être atteint qu'en augmentant la rigidité des vésicules enfouies, afin d'éviter tout phénomène de rupture (même transitoire) de la bicouche lipidique. Cette augmentation de rigidité ne devra cependant pas être réalisée au détriment de la biocompatibilité du film déposé sur la surface du biomatériau. Si un tel objectif était atteint, on pourrait envisager d'augmenter fortement la capacité du film polymère en molécules actives, car celles-ci occupent tout le volume des vésicules unilamellaires de grande taille alors qu'elles ne forment qu'un film bidimensionnel si elles sont greffées sur un polymère. De plus, la fonction chimique qui assure le greffage doit être hydrolysable en milieu physiologique afin d'assurer la libération de la molécule d'intérêt [26] (figure 7).

Quelle que soit la méthode envisagée, la préparation de films minces (à base de matériaux inorganiques ou de polymères) contenant des médicaments qui sont libérés localement et de façon prolongée dans les tissus avoisinant l'implant offre un avantage considérable par rapport aux méthodes classiques d'administration : celui de pouvoir réduire fortement les doses administrées et donc les effets secondaires associés au médicament considéré.

Il est difficile d'immobiliser des molécules fortement hydrophobes à des interfaces surtout si la fonctionnalisation de surface du biomatériau doit se faire par voie aqueuse. Des solutions très élégantes à ce problème ont été proposées récemment. Un exemple consiste en l'encapsulation du piroxicam, un anti-inflammatoire non stéroïdien, à l'intérieur de la cavité hydrophobe d'une β -cyclodextrine portant une

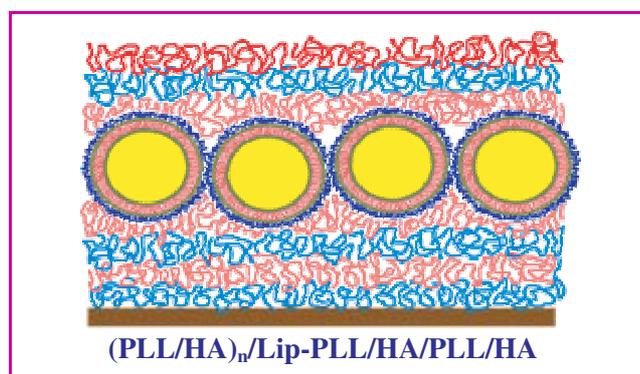


Figure 7 - Représentation schématique d'une architecture multicouche construite par adsorption séquentielle (cf. figure 6) de polycations, de PLL (en bleu) et de polyanions, l'acide hyaluronique (en rouge) contenant des liposomes rigidifiés par adsorption de PLL.

Ces liposomes contiennent une substance active (en jaune) dans leur compartiment aqueux interne. Cette stratégie permet d'augmenter la capacité des films en molécules actives par rapport à l'adsorption d'une couche de polymère lui-même modifié par les molécules actives.

Encadré 3

Principe de la réticulation entre des groupements amino et des groupements carboxyliques par un carbodiimide

Un carbodiimide, $R_1N=C=NR_2$, provoque la formation d'une liaison amide entre le polymère porteur d'une fonction amine et celui porteur d'une fonction acide carboxylique. Il en résulte une liaison covalente entre les 2 chaînes qui n'interagissaient initialement que par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques, des liaisons hydrogène ou des interactions de type Van der Waals. Le carbodiimide est transformé en une urée $R_1NH-CO-NHR_2$.

charge électrique permanente [27]. La présence de la charge électrique a permis d'immobiliser, par simple adsorption, le complexe médicament-cage au sein d'un film multicouche de polyélectrolytes à base d'acide poly-L-glutamique (PGA) et de poly-L-lysine (PLL). Ce film présente alors une activité anti-inflammatoire vis-à-vis de monocytes humains de type THP-1 : en effet, la production du facteur de nécrose tumorale (TNF- α), un agent pro-inflammatoire, est inhibé au terme d'une phase de latence séparant la mise en contact du film fonctionnalisé et des cellules. La durée de cette phase peut être modulée selon la profondeur d'enfouissement du complexe β -cyclodextrine-piroxicam au sein du film polymère [27]. Le fait de pouvoir contrôler l'activité biologique dans le temps en insérant des principes actifs à un niveau déterminé au sein d'un film biodégradable constitue une avancée majeure en sciences des biomatériaux. On peut également créer des strates d'épaisseur contrôlée dans lesquelles un médicament peut être « solubilisé » dans un gel polymère (ou au sein d'un film multicouche de polyélectrolytes fortement hydraté) et recouvrir cette strate avec un nouveau film dégradable [28]. Cette stratégie offre l'avantage de pouvoir contrôler la quantité de médicament immobilisée puisque celle-ci dépend directement de l'épaisseur du réservoir à médicaments (dans le cas où le remplissage du réservoir est homogène). Cette grandeur peut être contrôlée facilement dans le cas de films multicouches de polyélectrolytes dont on connaît de mieux en mieux les mécanismes de croissance [29-30].

Notons que l'on peut également immobiliser de l'acide désoxyribonucléique (ADN) couche par couche en alternance avec un polycation hydrolysable à pH et à température physiologiques. Un tel polycation hydrolysable peut être un poly(β amino ester) [31]. Le film multicouche est obtenu en adsorbant alternativement le polycation et le plasmide (chargé négativement de part la présence des groupements phosphates) à pH acide afin de limiter la dégradation du film par hydrolyse. Celle-ci ne devient effective qu'à pH physiologique et à la température du corps humain. De plus, il a été démontré qu'il était possible de contrôler la localisation de la libération de l'ADN sur une couche de cellules (*figure 8*) en y déposant la lamelle de quartz fonctionnalisée par l'architecture ADN-polymère hydrolysable. Les cellules sélectionnées pour cette étude ont été de type COS-7. La faisabilité de ce concept « d'expression localisée d'un gène » a été démontrée dans le

cas où le plasmide immobilisé code pour la GFP (« green fluorescent protein ») : les cellules transfectées émettent alors un signal de fluorescence sous éclairage qui caractérise l'expression de la protéine exprimée.

Les gels polymères comme matériaux de recolonisation cellulaire : une voie d'ingénierie tissulaire

Les gels à base de polymères peuvent être utilisés comme matériaux de recolonisation cellulaire grâce à leurs propriétés chimiques et à leur porosité (à différentes échelles de taille) : ils peuvent ainsi contenir les médicaments utiles et même encapsuler les cellules d'intérêt en vue d'applications dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Le grand avantage de ces gels est que leur composition peut être choisie de manière à être proche de celle des matrices extracellulaires (par l'utilisation de polymères d'origine biologique comme nous l'avons vu précédemment) et qu'ils peuvent être utilisés aisément par simple injection, donc sans occasionner de dommages de nature mécanique aux tissus avoisinants [32].

Le but de l'ingénierie tissulaire consiste à synthétiser, à partir de matrices contenant l'ensemble des ingrédients nécessaires, un tissu remplaçant un tissu manquant (suite à une lésion) ou un tissu endommagé. Cette discipline est émergente en raison d'un besoin réel d'organes : le différentiel entre le nombre de « demandeurs » d'organes et d'organes effectivement disponibles n'a cessé de croître au cours des dernières années. On peut préparer très facilement des hydrogels à partir de solutions de polymères naturels en les faisant interagir avec des agents de réticulation qui sont le plus souvent des ions multivalents. L'exemple le plus connu est celui de l'alginate de sodium qui gélifie en présence d'ions Ca^{2+} , Ba^{2+} ou Sr^{2+} . Dans le cas de polymères de synthèse, la prise du gel peut être réalisée par l'action d'un stimulus extérieur d'une autre nature que l'addition d'un réactif : le polymère peut être synthétisé de manière à contenir des groupements photosensibles (acryliques ou métacryliques), ce qui permet la réticulation du gel par l'éclairage avec une source lumineuse émettant dans le domaine spectral approprié [33].

Quelle que soit la situation envisagée, la matrice polymère doit être gélifiée sans endommager les cellules qui doivent conserver leur viabilité. Les pores du gel doivent permettre la

diffusion des nutriments vers les cellules ainsi que celle des produits de dégradation du métabolisme cellulaire vers l'extérieur du gel. À ce titre, tout processus de gélification qui implique une modification du pH ou une augmentation de température doit être évité. Une fois implanté à l'endroit souhaité de l'organisme hôte, le gel doit résister aux diverses contraintes mécaniques et conserver son volume pendant une durée suffisante tout en transmettant ces contraintes aux cellules encapsulées. Dans le cas classique des gels d'alginate, la valeur du module de compression peut être accrue en augmentant la concentration volumique en alginate ainsi que le rapport du nombre de groupements α -L-guluronique (G dans la *figure 3b*) au nombre de groupements β -D-mannuronique (M dans la

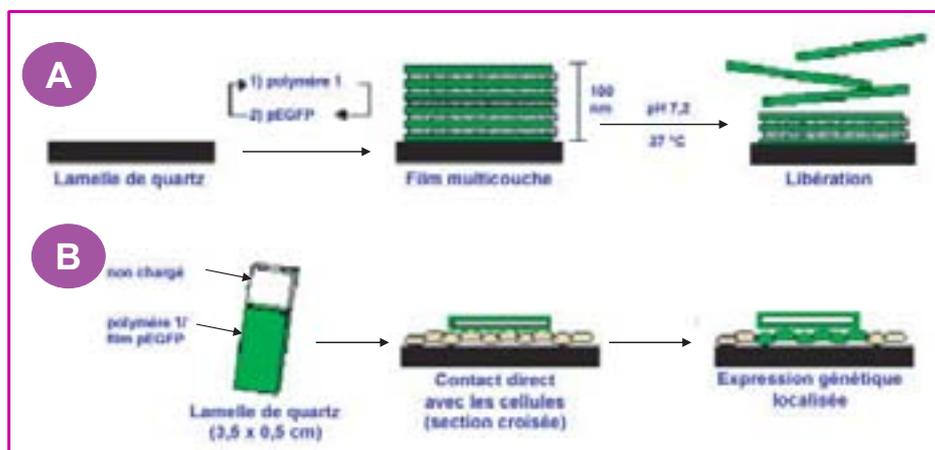


Figure 8 - A) Schéma de principe de préparation de l'architecture multicouche consistant à déposer de manière séquentielle le polycation hydrolysable et le plasmide (ici le pEGFP) et de l'hydrolyse progressive du film lorsque celui-ci est placé à pH 7,2 et à 37 °C ; B) Schéma montrant la possibilité de réaliser une « expression génique localisée » lors de la mise en contact d'une lamelle de quartz fonctionnalisée avec l'architecture illustrée en A avec une couche de cellules (d'après [31]).

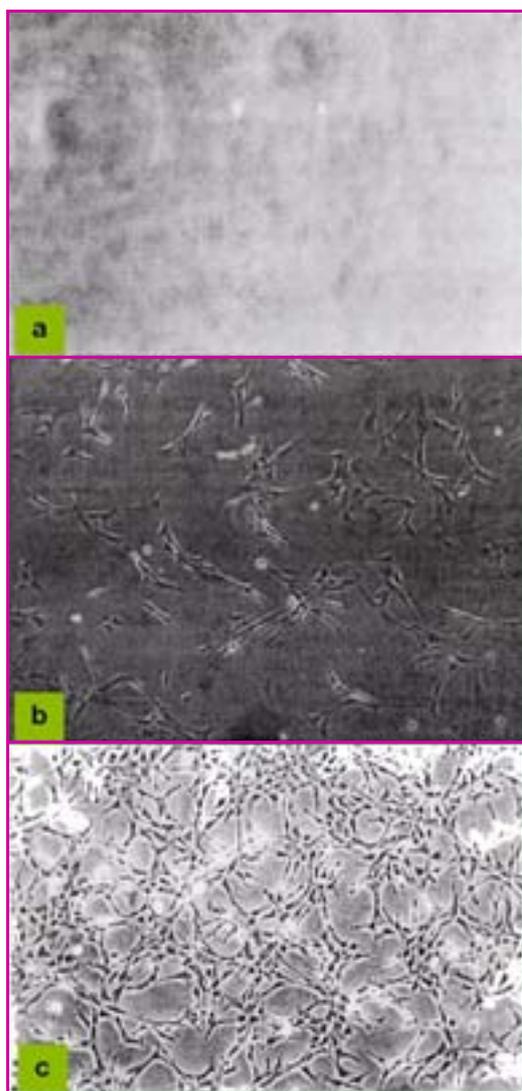


Figure 9 - (a) Micrographie optique d'un gel d'alginate mis en présence de myoblastes (cellules précurseurs de muscles) de type C2C12 [35]; (b) Ostéoblastes (cellules précurseurs du tissu osseux) de rat mis en présence d'un gel d'alginate au sein duquel des oligopeptides de séquence G_4RGDY ont été greffés de manière covalente [36]; (c) Myoblastes de type C2C12 mis en présence d'un gel d'alginate au sein duquel des oligopeptides de séquence G_4RGDY ont été greffés de manière covalente [35].

figure 3b). Une fois le gel formé, il est souvent souhaitable, sauf dans le cas où le gel sert à protéger les cellules encapsulées contre les molécules du système immunitaire, qu'il se dégrade spontanément pour laisser place au tissu formé. Celui-ci provient de la division ou de la différenciation des cellules encapsulées. De façon idéale, la dégradation de la matrice polymère devrait se faire à la même vitesse que la croissance des nouveaux tissus de manière à ce que le volume total du matériau (gel + cellules) reste constant. Les trois principaux mécanismes de dégradation des hydrogels sont l'hydrolyse spontanée (cas des polyesters de synthèse), l'hydrolyse catalysée par voie enzymatique (cas de l'acide hyaluronique, l'enzyme impliquée étant la hyaluronidase) et la dissolution spontanée du gel (cas des gels d'alginate) [34]. L'amélioration des propriétés mécaniques du gel ne doit cependant pas empêcher la diffusion des petites molécules dans et hors du gel.

Si le gel devient très épais, typiquement plus de 100 μm , il est souhaitable d'y incorporer des facteurs protéiques favorisant l'angiogenèse*. Ainsi, les nutriments et le dioxygène auront une distance plus courte à parcourir par diffusion parce que les vaisseaux sanguins arriveront au contact direct des cellules encapsulées.

De manière générale, il ne suffit pas que le gel contenant des cellules encapsulées n'induisse pas de réaction négative sur les tissus environnant, il faut encore favoriser l'adhésion des cellules issues de la mitose des cellules présentes initialement au sein du gel. On a donc intérêt à modifier les polymères constitutifs du gel avec des motifs d'adhésion cellulaire comme le montre la figure 9.

Un objectif de la première importance consiste à créer un cartilage artificiel. Le cartilage est constitué de chondrocytes* au sein d'une matrice de collagène de type II et de différents glycoaminoglycanes. La régénération du cartilage est un problème important car ce tissu ne se régénère pas spontanément. De nombreuses études sont en cours dans ce domaine et le lecteur intéressé pourra se référer à des articles spécialisés [37].

Signalons enfin que de nombreux programmes de recherche visent à encapsuler des cellules souches (c'est-à-dire des cellules non différenciées) au sein de matrices à base de biopolymères contenant des facteurs de différenciation cellulaire. Le but de ces travaux est de guider la différenciation des cellules souches et de reconstituer ainsi un nouveau tissu « sur commande ».

Il est également intéressant de noter qu'il est possible d'encapsuler et de maintenir en vie des cellules au sein de matrices inorganiques obtenues par un procédé sol-gel [38-39].

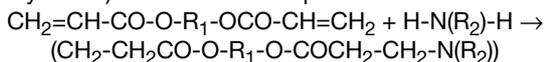
La chimie combinatoire pour la préparation de nouveaux biomatériaux

Nous avons précédemment décrit les principales classes de polymères utilisés en science des biomatériaux. Les critères de sélection essentiels concernent l'absence de toxicité et de réaction immunitaire, ainsi que la possibilité de contrôler leur cinétique de dégradation. Plusieurs types de structures et de fonctions chimiques apparaissent très fréquemment (figures 3 et 4), mais force est de reconnaître que les connaissances dans ce domaine sont plutôt empiriques. Si l'on a besoin d'un polyester pour une application donnée, on se tournera vers des polyesters déjà disponibles. Afin d'améliorer les fonctions biologiques d'un polymère pour une application donnée, il convient de mieux comprendre la relation entre la structure du polymère et son activité chimique ou biologique. Le problème est similaire à celui rencontré en pharmacologie [40] : si l'on veut synthétiser un inhibiteur d'une enzyme, il est utile de connaître sa structure tridimensionnelle à l'échelle atomique (ce qui est possible par diffraction des rayons X si l'enzyme en question peut être cristallisée) et de concevoir une structure d'inhibiteur qui puisse interagir avec les groupements chimiques du site actif de l'enzyme. En pratique, on synthétise une librairie de molécules. On réalise donc diverses « variations sur un thème ». Des études *in vitro* permettent de tester en parallèle l'ensemble des molécules de la bibliothèque afin d'identifier les meilleures candidates. Il s'agit donc d'une synthèse rationnelle, une synthèse combinatoire, du médicament potentiellement le plus efficace.

Ces stratégies commencent à être utilisées pour la synthèse de polymères. Décrivons brièvement un exemple dans

le domaine de la synthèse de polycations hydrolysables utilisables pour le transfert de gènes [41]. Nous avons décrit précédemment l'utilisation de poly(β amino ester) comme polycations hydrolysables à pH physiologique, capables de produire des complexes avec l'ADN. Ces complexes peuvent être endocytés* par des cellules et une partie de l'ADN initial peut être incorporé dans le noyau et exprimé sous forme de protéines actives. Notons que l'ADN plasmidique ne s'intègre pas dans le génome au contraire des vecteurs issus des rétrovirus. De nombreux agents de transfection, des molécules ou des assemblées moléculaires capables de se complexer à l'ADN et d'assurer son transport à travers la membrane plasmique, sont utilisés : des polycations comme la poly(éthylène imine), des lipides cationiques et des agents viraux. Parmi tous ces systèmes, l'efficacité de la transfection (rapport entre l'ADN exprimé sous forme de protéines et l'ADN fourni initialement) est en général la plus élevée dans le cas des agents viraux (ce n'est pas un hasard : la capsid virale, l'enveloppe protéique protégeant l'ADN viral, contient un « programme moléculaire » permettant la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique).

Revenons aux poly(β amino ester). Comment trouver l'agent de transfection le plus efficace possible, qui contienne des liaisons hydrolysables de type (CH₂-CH₂CO-O-R₁-O-COCH₂-CH₂-N(R₂)) ? Voyons d'abord comment obtenir des polymères contenant ce motif de répétition. Il peut être obtenu par polycondensation en faisant réagir des molécules contenant deux groupements acryliques (appelées « diacrylates ») avec des amines primaires selon la réaction :



À partir de là, on peut envisager de faire réagir différents membres d'une famille de diacrylates (différant les uns des autres par la nature du groupement R₁) avec différentes molécules contenant une fonction amine primaire ou secondaire (différant entre elles par la nature du groupement R₂). Les auteurs de la publication originale [41] ont ainsi sélectionné sept diacrylates et une famille de vingt amines disponibles dans le commerce (figure 10). Cette approche a permis d'obtenir un ensemble de 140 poly(β amino ester) qui ont été caractérisés par chromatographie par perméation sur gel (ou chromatographie d'exclusion stérique) [42].

Le premier critère de sélection pour les polymères obtenus a été leur solubilité dans l'eau (dans du tampon acétate de sodium à pH 5,0 pour limiter l'influence de la réaction d'hydrolyse du polyester) : en effet, ces polymères doivent d'abord être solubilisés dans l'eau avant de pouvoir former des complexes avec l'ADN (qui est un polyanion). Le critère de solubilité minimale a été fixé à 2 mg/mL, et seuls 70 parmi les 140 polymères de la bibliothèque ont satisfait à ce critère. Ces 70 polymères ont ensuite été mis en contact avec de l'ADN dans un rapport massique de une unité d'ADN pour vingt unités de polymère (donc en excès de polymère) et les solutions ont été soumises à une électrophorèse sur gel. Si l'ADN est complexé par le polymère, sa migration est retardée voire supprimée (en cas d'inversion de charge lors de la complexation). On dispose ainsi d'un critère de sélection supplémentaire permettant d'identifier les polymères (cationiques) capables d'interagir avec et de complexer l'ADN (anionique). Seuls 56 des 70 polycations hydrosolubles ont répondu à ce critère. Des complexes ont alors été formés entre ces 56 polycations et le plasmide (ADN cyclique) pCMV-luc codant pour la luciférase. L'hydrolyse du substrat de cette enzyme produit des molécules fluorescentes. La mesure de l'intensité de fluorescence a permis de sélectionner les complexes, donc les

polycations, capables de transfecter l'ADN. Les résultats sont présentés sous forme de matrice tridimensionnelle, l'intensité de fluorescence étant représentée en fonction de la nature du polymère (qui est caractérisée par deux variables : la nature du diacrylate et de l'amine). Les résultats sont comparés à des systèmes de transfection modèles comme la poly(éthylène imine) et la lipofectamine (lipides cationiques) (figure 11). Parmi les 56 poly(β amino ester) complexant l'ADN, on a ainsi pu isoler quatre complexes « intéressants » pour la transfection. Il est remarquable que le polycation B14 (obtenu par polycondensation du diacrylate B avec l'amine 14 de la figure 10) présente une efficacité supérieure à la lipofectamine (pour un rapport ADN/agent de transfection donné) pour l'expression de la luciférase. Cela n'est pas très étonnant si l'on considère la structure de l'amine 14 (figure 10) : celle-ci comporte un groupement histidine qui peut jouer le rôle d'agent tampon pour stabiliser le pH au sein des endosomes*

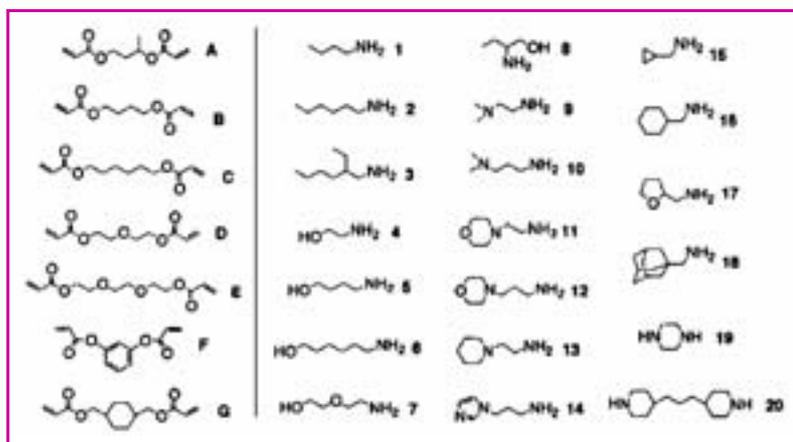


Figure 10 - Structures chimiques des diacrylates (A-G) et des amines sélectionnées pour constituer une bibliothèque de poly(β amino ester) (d'après [41]).

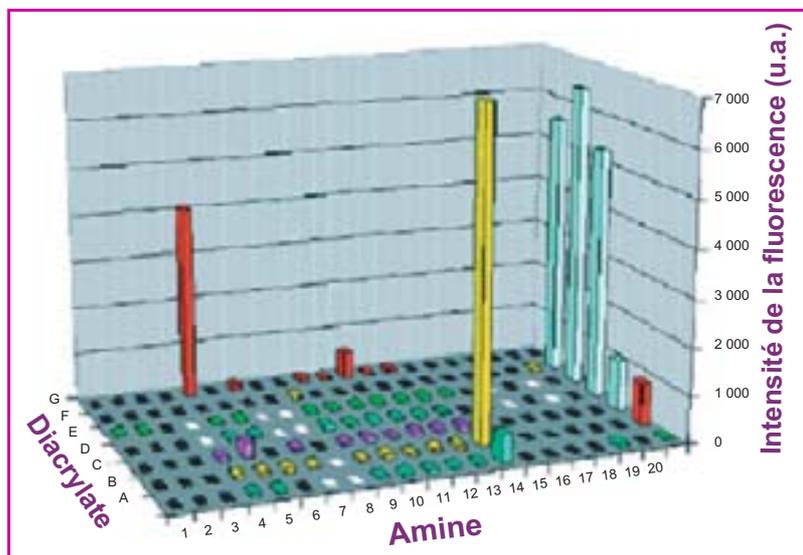


Figure 11 - Résultats de la transfection de cellules COS-7 par des plasmides pCMV-luc complexés avec les poly(β amino ester) de la bibliothèque constituée à partir des diacrylates (A-G) et des amines (1-14, voir figure 10).

Les carrés noirs correspondent aux polymères insolubles (donc inutilisables) tandis que les carrés blancs correspondent aux polymères solubles qui ne permettent pas d'obtenir de complexes lorsqu'ils sont mis en présence d'ADN. Dans toutes les expériences de transfection, le rapport ADN/polymère est égal à 1/20 en masse. La colonne de droite correspond à des expériences de contrôle avec de la lipofectamine (bleu clair) et de la poly(éthylène imine) (rouge). Le poly(β amino ester) le plus efficace est obtenu à partir du diacrylate B et de l'amine 14 (d'après [41]).

et faciliter ainsi la sortie des complexes des endosomes vers le noyau.

Il peut sembler décevant que seule une fraction si faible des polycations synthétisés lors de la conception de la librairie soit efficace pour la transfection de l'ADN. Mais il faut signaler aussi que les molécules intéressantes n'auraient certainement jamais été identifiées si l'on avait procédé « au hasard », c'est-à-dire en « pêchant » parmi les polycations existants. Cela illustre les possibilités de la chimie combinatoire : elle permet d'explorer des candidats médicaments avec une diversité beaucoup plus large que les méthodes de synthèse traditionnelles. On peut bien sûr augmenter la taille de la bibliothèque en augmentant le nombre de molécules de diacrylates et d'amines sélectionnées (encore faut-il que ces molécules soient disponibles commercialement... sinon il faut synthétiser ces monomères), mais au prix d'analyses beaucoup plus longues. Il faut noter que l'ensemble de l'étude décrite, de la synthèse des polymères à l'étude de transfection en passant par les tests de solubilité et par les mesures d'électrophorèse, a été effectuée avec des procédures automatisées faisant appel à des robots.

Conclusion

Dans les deux premières parties de cet article, nous avons défini les critères généraux auxquels un matériau destiné à être mis en contact avec des tissus vivants devait satisfaire. Dans le paragraphe suivant, des exemples de polymères, d'origine naturelle ou synthétique, pouvant être utilisés en tant que biomatériaux ont été présentés. Finalement, nous avons utilisé quelques exemples issus de la littérature récente afin d'illustrer comment des films ou des gels à base de polymères pouvaient servir en tant que réservoir de médicaments ou comme matrice pour la régénération tissulaire. Le but du dernier paragraphe a été de montrer que les méthodes de la chimie combinatoire pouvaient être utilisées afin de synthétiser des polymères possédant des propriétés sans cesse améliorées pour une application donnée. Cet exemple a montré que toute avancée notable dans le domaine des biomatériaux se faisait à l'interface des sciences de l'ingénieur, des sciences chimiques et des sciences de la vie. Cette perspective est passionnante et l'on peut espérer que ces nouvelles approches multidisciplinaires vont permettre de mettre sur le marché non seulement des biomatériaux plus efficaces (en termes de durée de vie, d'une réduction des complications postopératoires...), mais encore de préparer des matériaux capables de reconstituer des organes entiers.

Références

- [1] Ratner B., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E., *Biomaterials Science*, Academic Press, New York, **1996**.
- [2] *Biomaterials and Tissue Engineering*, D. Shi (ed), Springer Verlag, Berlin, **2004**, chapitre 2.
- [3] Ball V., Voegel J.-C., Schaaf P., Mechanism of interfacial exchange phenomena for proteins adsorbed at solid-liquid interfaces, « Biopolymers at interfaces », *Surfactant Science Series*, **1998**, 75, p. 453.
- [4] Steinemann S.G., Titanium: the material of choice?, *Periodontol* **2000**, **1998**, 17, p. 7.
- [5] Shanbhag A.S., Jacob J.J., Black J., Galante J.O., Glant J., Macrophage/particle interactions: effect of size, composition and surface area, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1994**, 28, p. 81.
- [6] Schultz P., Vautier D., Richert L., Jessel N., Haikel Y., Schaaf P., Voegel J.-C., Ogier J., Debry C., Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide, α -MSH, for coating a tracheal prosthesis, *Biomaterials*, **2005**, 26, p. 2621.
- [7] Discher D.E., Janmey P., Wang Y.-L., Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate, *Science*, **2005**, 310, p. 1139.
- [8] Seal B.L., Otero T.C., Panich A., Polymeric materials for tissue and organ regeneration, *Mater. Sci. Eng.*, **2001**, R262, p. 1.
- [9] Hirano Y., Mooney D.J., Peptide and protein presenting materials for tissue engineering, *Adv. Mater.*, **2004**, 16, p. 17.
- [10] Lutolf M.P., Hubbell J.A., Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering, *Nature Biotechnology*, **2005**, 23, p. 47.
- [11] Khademhosseini A., Langer R., Borenstein J., Vacanti J.P., Microscale technologies for tissue engineering and biology, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103, p. 2480.
- [12] Prime K.L., Whitesides G.M., Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces, *Science*, **1991**, 252, p. 1164.
- [13] Sheth S.R., Leckband D., Measurements of attractive forces between proteins and end-grafted poly(ethylene glycol) chains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, p. 8399.
- [14] Pasche S., Vörös J., Griesser H.J., Spencer N.D., Textor M., Effects of ionic strength and surface charge on protein adsorption at PEGylated surfaces, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, p. 17545.
- [15] Boulmedais F., Frisch B., Etienne O., Lavallo P., Picart C., Ogier J., Voegel J.-C., Schaaf P., Egles C., Polyelectrolyte multilayer films with PEGylated polypeptides as a new type of anti-microbial protection for biomaterials, *Biomaterials*, **2004**, 25, p. 2003.
- [16] Agrawal C.M., Pennick A., Wang X., Schenck R.C., Porous coated titanium implant impregnated with a biodegradable protein delivery system, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1998**, 36, p. 516.
- [17] Richert L., Boulmedais F., Lavallo P., Mutterer J., Ferreux E., Decher G., Schaaf P., Voegel J.-C., Picart C., Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films, by chemical cross linking, *Biomacromolecules*, **2004**, 5, p. 284.
- [18] Tang Z., Kotov N.A., Magonov S., Ozturk B., Nanostructured artificial nacre, *Nat. Mater.*, **2003**, 2, p. 413.
- [19] Shi X., Hudson J.L., Spicer P.P., Tour J.M., Krishnamoorti R., Mikos A.G., Injectable nanocomposites of single-walled carbon nanotubes and biodegradable polymers for bone tissue engineering, *Biomacromolecules*, **2006**, 7, p. 2237.
- [20] Francius G., Hemmerlé J., Ohayon J., Schaaf P., Voegel J.-C., Picart C., Senger B., Effet de crosslinking on the elasticity of polyelectrolyte multilayer films measured by colloidal probe AFM, *Microscopy Res. & Tech.*, **2006**, 69, p. 84.
- [21] Schneider A., Francius G., Obeid R., Schwinté P., Hemmerlé J., Frisch B., Schaaf P., Voegel J.-C., Senger B., Picart C., Polyelectrolyte multilayers with a tunable Young's modulus: influence of film stiffness on cell adhesion, *Langmuir*, **2006**, 22, p. 1193.
- [22] Étienne O., Picart C., Taddei C., Haikel Y., Dimarcq J.L., Schaaf P., Voegel J.-C., Ogier J.A., Egles C., Multilayer polyelectrolyte films functionalized by insertion of defensin: a new approach to protection of implants from bacterial colonization, *Antimicrob. Agents & Chemotherapy*, **2004**, 48, p. 3662.
- [23] Lvov Y., Ariga K., Ichinose I., Kunitake T., Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic layer-by-layer adsorption, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1995**, 117, p. 6117.
- [24] Katagiri K., Hamasaki R., Ariga K., Kikuchi J.-I., Layer-by-layer self-assembly of liposomal « cerasome » on substrates, *Langmuir*, **2002**, 18, p. 6709.
- [25] Michel M., Vautier D., Voegel J.-C., Schaaf P., Ball V., Layer by layer self assembled polyelectrolyte multilayers with embedded phospholipid vesicles, *Langmuir*, **2004**, 20, p. 4835.
- [26] Thierry B., Kujawa P., Tkaczyk C., Winnik F.M., Bilodeau L., Tabrizian M., Delivery platform for hydrophobic drugs: prodrug approach combined with self-assembled multilayers, *J. Amer. Chem. Soc.*, **2005**, 127, p. 1626.
- [27] Benkirane-Jessel N., Schwinté P., Falvey P., Darcy R., Haikel Y., Schaaf P., Voegel J.-C., Ogier J., Build-up of polypeptide multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxicam-cyclodextrine complexes, *Adv. Funct. Mater.*, **2004**, 14, p. 174.
- [28] Vodouhê C., Le Guen E., Mendez Garza J., Francius G., Déjunctat C., Ogier J., Schaaf P., Voegel J.-C., Lavallo P., Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films, *Biomaterials*, **2006**, 27, p. 4149.
- [29] Lavallo P., Picart C., Mutterer J., Gergely C., Reiss H., Voegel J.-C., Senger B., Schaaf P., Modeling the build up of polyelectrolyte multilayer films having exponential growth, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108, p. 635.
- [30] Laugel N., Betscha C., Winterhalter M., Voegel J.-C., Schaaf P., Ball V., Relationship between the growth regime of polyelectrolyte multilayers and the polyanion/polycation complexation enthalpy, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, p. 19443.
- [31] Jewell C.M., Zhang J., Fredin N.J., Lynn D.M., Multilayered polyelectrolyte films promote the direct and localized delivery of DNA to cells, *J. Control. Release*, **2005**, 106, p. 214.
- [32] Lee K., Money D.J., Hydrogels for tissue engineering, *Chem. Rev.*, **2001**, 101, p. 1869.
- [33] Cruise G.M., Scharp D.S., Hubbell J.A., Characterization of permeability and network structure of interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels, *Biomaterials*, **1998**, 19, p. 1287.
- [34] Le Roux M.A., Guilak F., Setton L.A., Compressive and shear properties of alginate gel: effect of sodium ions and alginate concentration, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1999**, 47, p. 46.
- [35] Rowley J.A., Madlambayan G., Mooney D.J., Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials, *Biomaterials*, **1999**, 20, p. 45.

- [36] Alsberg E., Anderson K.W., Albeiruti A., Franceschi R.T., Mooney D.J., Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering, *J. Dent. Res.*, **2001**, *80*, p. 2025.
- [37] Stoltz J.-F., Bensoussan D., Decot V., Netter P., Cirre A., Gillet P., Cell and tissue engineering and clinical applications: an overview, *Bio-medical Mater. & Engin.*, **2006**, *16*, p. S3.
- [38] Nassif N., Bouvet O., Rager M.N., Roux C., Coradin T., Livaige J., Living bacteria in silica gels, *Nature Mater.*, **2002**, *1*, p. 42.
- [39] Avnir D., Coradin T., Lev O., Livaige J., Recent bio-applications of soft-gel materials, *J. Mater. Chem.*, **2006**, *16*, p. 1013.
- [40] Patrick G.L., *Chimie pharmaceutique*, De Boeck, Bruxelles, **2003**.
- [41] Lynn D.M., Anderson D.G., Putnam D., Langer R., Accelerated discovery of synthetic transfection vectors: parallel synthesis and screening of a degradable polymer library, *J. Amer. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, p. 8155.
- [42] Fontanille M., Gnanou Y., *Chimie et physico-chimie des polymères*, Dunod, Paris, **2002**.



Y. Arntz



V. Ball



N. Benkirane-Jessel



F. Boulmedais



C. Debry



M. Dimitrova



R. Elkaim



Y. Haikel



J. Hemmerlé



P. Lavalley



F. Meyer



S. Muller



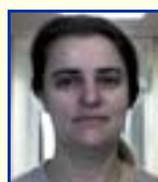
J. Ogier



P. Schaaf



B. Senger



V. Stanic



H. Tenenbaum



D. Vautier



C. Vodouhé



D. Volodkin



J.-C. Voegel



S. Werner

Youri Arntz¹⁻² et **Maria Dimitrova**¹⁻² sont maîtres de conférences associés, **Vincent Ball**¹⁻² (*auteur correspondant*) est professeur en sciences des matériaux, **Youssef Haikel**²⁻³ est professeur d'université, praticien hospitalier et doyen, **Florent Meyer**¹⁻² est maître de conférences et praticien hospitalier, **Joëlle Ogier**¹⁻² et **Henri Tenenbaum**²⁻³ sont professeurs et praticiens hospitaliers, **Dominique Vautier**¹⁻³ est ingénieur d'études, **Sandra Werner**¹⁻³ est professeur associée, à la Faculté de chirurgie dentaire de Strasbourg.

Nadia Benkirane-Jessel¹⁻² et **Philippe Lavalley**² sont chargés de recherche, **Joseph Hemmerlé**² est ingénieur de recherche, **Sabine Muller**¹⁻², **Vesna Stanic**¹⁻² et **Dmitry Volodkin**¹⁻² sont chercheurs postdoctoraux, **Bernard Senger**¹⁻² et **Jean-Claude Voegel**¹⁻³ sont directeurs de recherche, à l'INSERM (Unité 595).

Fouzia Boulmedais est chargée de recherche au CNRS, Institut Charles Sadron (UPR 22)⁴.

Christian Debry est professeur des Universités et praticien hospitalier en ORL, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg^{3,5}.

René Elkaim est directeur de la société Parogène⁶.

Pierre Schaaf est professeur à l'École Européenne de Chimie, des Polymères et Matériaux de Strasbourg^{4,7}.

Constant Vodouhé est actuellement chargé de recherche au Centre Européen d'Étude du Diabète¹⁻².

¹ INSERM, UMR 595 « Biomateriaux : processus biophysiques et biologiques aux interfaces », 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex. Courriel : vincent.ball@medecine.u-strasbg.fr

² Faculté de chirurgie dentaire, 1 place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg.

³ Équipe de recherches technologiques 1061, « Applications biomédicales des films multicouches de polyélectrolytes », 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex.

⁴ CNRS, UPR 22, Institut Charles Sadron, 6 rue Boussingault, 67083 Strasbourg Cedex.

⁵ Département de chirurgie otorhinolaryngologique, Hôpital de Hautepierre, Avenue Molière, 67200 Strasbourg.

⁶ Parogène, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex.

⁷ École Européenne de Chimie, des Polymères et Matériaux de Strasbourg, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex 2.