

Les films polyélectrolytes multicouches bioactifs et la régénération des tissus

Catherine Picart

Résumé Au cours de la dernière décennie, l'auto-assemblage de matériaux naturels s'est considérablement développé en raison de la versatilité qu'il offre et de la possibilité de reproduire certains aspects du vivant. Les films multicouches de polyélectrolytes, élaborés à partir de biopolymères, offrent de nombreuses possibilités pour élaborer des couches minces à façon, sur différents types de supports, et leur conférer des propriétés variées (biochimique, mécanique, spatiale). Cet article décrit les développements dans le domaine des films multicouches en tant que matrice biomimétique et présente deux aspects complémentaires des films auto-assemblés à base de biopolymères : leur utilisation pour des études biophysiques – grâce au piégeage de protéines bioactives et à la présentation de ces protéines par le biomatériau pour cibler directement des récepteurs cellulaires –, et leur utilisation pour fonctionnaliser la surface d'implant et la rendre ainsi bioactive, avec une application à la régénération des os.

Mots-clés **Auto-assemblage, polyélectrolytes, biomatériaux, surface, facteur de croissance, signalisation cellulaire, implants.**

Abstract **Bioactive polyelectrolyte multilayer films: from the understanding of fundamental processes to bone regeneration**

In the past decade, the self-assembly of natural materials has gained strong interest in view of its versatility and the possibility to reproduce some aspects of living matter using various building blocks. Polyelectrolyte multilayer films based on biopolymers offer numerous possibilities to engineer functional surface coatings and provide them with various properties (biochemical, mechanical, spatial). This article describes the recent developments in this field and presents two complementary aspects of self-assembled films based on biopolymers: their use for biophysical studies, thanks to the ability to trap bioactive proteins and to present them to cells in a spatially-controlled manner in order to directly target cellular receptors, and their use to functionalize implant surfaces and to render it bioactive, with a specific application to bone regeneration.

Keywords **Self-assembly, polyelectrolytes, biomaterials, surface, growth factors, cell signaling, implants.**

Contexte

Les biomatériaux sont de plus en plus utilisés dans notre quotidien pour aider notre organisme à suppléer une fonction défaillante ou réparer un tissu lésé. Les exemples ne manquent pas : pansements pour guérir une plaie de la peau, lentilles de contact en polymères pour remplacer les lunettes de vue, prothèse de hanche pour retrouver une mobilité fonctionnelle de la marche, ou encore stents placés dans les vaisseaux sanguins pour permettre au sang de circuler normalement dans des vaisseaux obstrués. Leur développement est guidé par l'amélioration de la qualité de vie, le vieillissement de la population, mais aussi par l'accroissement des pratiques sportives et la sollicitation croissante de nos organes et tissus. Bien qu'il existe des biomatériaux d'origine naturelle, extraits d'algues, de tissus animaux ou produits par des bactéries, la majorité des biomatériaux actuels est d'origine synthétique et met à profit les grandes catégories de matériaux pour des applications ciblées : les métaux, largement utilisés historiquement, en raison de leurs propriétés mécaniques leur permettant de résister à de fortes contraintes ;

les céramiques, qui miment la composition des os et des dents, ce qui leur permet d'être employées dans les domaines orthopédiques et dentaires ; et les polymères de synthèse, dont la versatilité permet de moduler les propriétés mécaniques, optiques et leur dégradabilité dans un milieu biologique. L'évolution de ce domaine est d'arriver à mieux mimer la réelle composition de nos tissus en employant des matériaux qui soient naturels, et en visant à recréer la complexité du vivant [1].

In vivo, nos tissus sont constitués d'une matrice (figure 1A), appelée matrice extracellulaire*, qui est composée de matière organique, notamment des protéines (collagène, fibronectine, fibrine, laminines...), de polysaccharides (acide hyaluronique, ou hyaluronane) et, pour les tissus minéralisés, de matière inorganique (phosphates de calcium). Cette matrice, hormis la partie minéralisée, est un matériau mou. Parmi les principaux constituants de la famille des polysaccharides, appelés les glycosaminoglycanes, on trouve des polysaccharides chargés négativement, tels que le hyaluronane, la chondroïtine sulfate et les héparanes sulfate qui font partie de la famille de l'héparine (figure 1B-D).

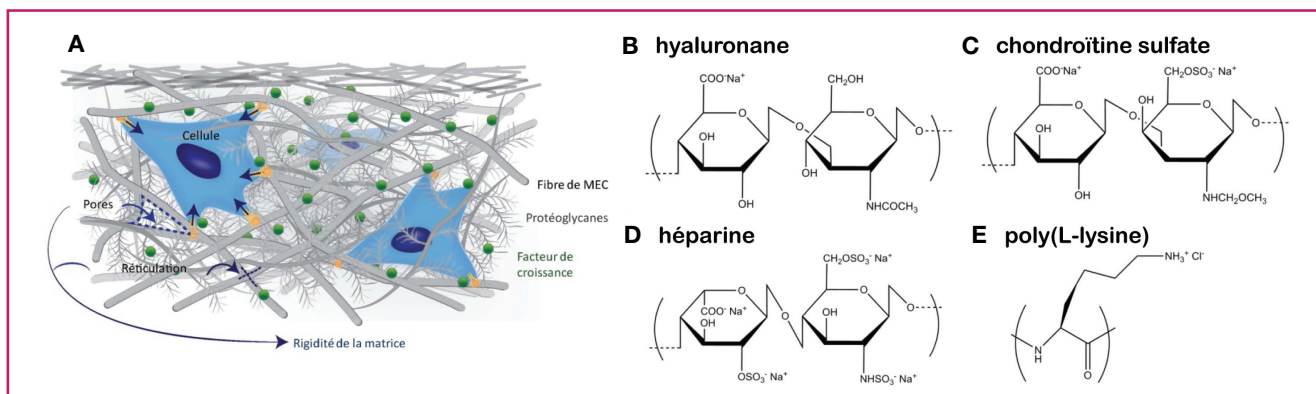


Figure 1 - **Matrice extracellulaire et glycosaminoglycannes.** (A) Représentation schématique de la matrice extracellulaire (MEC) dans laquelle les cellules sont entourées de fibres enchevêtrées qui sont réticulées entre elles. Cette matrice possède une certaine rigidité et porosité. Des facteurs de croissance (en vert) se trouvent piégés dans la matrice extracellulaire et interagissent avec les protéines et protéoglycannes (association de protéines et sucre) qui la constituent. À droite, exemples de glycosaminoglycannes présents dans les MEC : trois polyanions avec des charges négatives carboxylique et sulfate – hyaluronane (B), chondroïtine sulfate (C), héparine (D) (la forme présente dans les matrices étant plutôt l'héparane sulfate). La poly(L-lysine) (E), qui peut être auto-assemblée *via* des interactions électrostatiques et hydrogène avec chacun des polysaccharides, n'est pas présente en tant que telle dans la MEC mais les groupements lysine y sont nombreux au sein des protéines.

La poly(L-lysine) représentée *figure 1E* n'est pas à proprement parler un constituant de la matrice, mais l'acide aminé lysine est présent dans de nombreuses protéines. Dans chaque tissu se trouvent différents types de cellules ayant une fonction propre. On peut citer les fibroblastes* qui vont produire le tissu conjonctif, et les ostéoblastes*, qui vont produire la matrice osseuse minéralisée. Dans la matrice se trouvent également des molécules bioactives, telles que les facteurs de croissance* (*figure 1A*), qui vont pouvoir interagir avec certaines cellules *via* des récepteurs qui se trouvent à la surface des cellules. Ces récepteurs sont en quelque sorte les « antennes » de la cellule, qui lui permettent de sonder son environnement et d'y répondre activement. Ainsi une cellule est en permanence en interaction avec son environnement, dont elle reçoit des signaux, et à son tour, après intégration de ces signaux, elle va envoyer des signaux vers l'extérieur. C'est un mécanisme de rétroaction perpétuelle, qui va conditionner le destin de la cellule, c'est-à-dire les processus qu'elle enclenche. Pour la plupart des cellules, un des premiers processus cellulaires est l'adhésion, car la cellule doit s'ancre à la matrice extracellulaire *via* des récepteurs d'adhésion. Puis la cellule va proliférer en se multipliant, interagir avec ses voisines, pour progressivement se différencier et former un tissu en produisant sa propre matrice extracellulaire. Les facteurs de croissance sont précisément des molécules bioactives très puissantes, qui vont influencer les processus de formation et régénération tissulaire, *via* leur interaction avec les récepteurs cellulaires. On peut citer les protéines morphogénétiques osseuses (notées BMP*), qui ont la capacité à induire la différenciation des cellules souches en cellules osseuses et, de façon beaucoup plus large, sont impliquées dans un grand nombre de processus physiologiques et pathologiques [2].

Ces signaux bioactifs vont permettre d'enclencher des processus cellulaires à un niveau bien supérieur à ce que peut faire un matériau seul. C'est pourquoi, de plus en plus, les biomatériaux de nouvelle génération visent à procurer aux cellules non seulement une architecture spatiale mais aussi ces signaux bioactifs qui vont accélérer de façon spécifique des processus cellulaires [3]. Ainsi, il est judicieux de combiner des propriétés tridimensionnelles de biomatériaux (appelées encore architecture) avec des propriétés de surface

adaptées, car les cellules vont en premier lieu interagir avec la surface des biomatériaux.

Glossaire

Les termes suivis d'un astérisque* dans l'article sont définis ci-dessous.

BDNF (« brain derived neuronal factor ») : facteur de croissance neurotrophique. Présent dans le cerveau et le système nerveux périphérique, il est impliqué dans la croissance et la différenciation de nouveaux neurones et des synapses.

BMP (« bone morphogenetic proteins ») : protéines morphogénétiques osseuses. Ces protéines sont impliquées dans les processus de morphogénèse, qui est l'ensemble des lois déterminant la forme, la structure des tissus, des organes et des organismes. Leur nom est un « faux-ami » au sens où ces protéines sont impliquées dans de nombreux processus de morphogénèse, et pas uniquement pour l'os, mais aussi pour le cerveau, l'œil, le cœur et le système gastro-intestinal.

BMP-2 (« bone morphogenetic protein 2 ») : protéine de la grande famille des BMP, plus particulièrement impliquée dans la formation du cartilage et de l'os.

Facteur de croissance : en biologie, un facteur de croissance est une substance nécessaire à la croissance d'un organisme ou micro-organisme. Dans le cas particulier de l'ingénierie tissulaire, ces protéines ont un effet biologique sur les processus cellulaires (adhésion, prolifération, migration, différenciation...). Ceci est possible car elles interagissent avec des récepteurs cellulaires situés à la membrane des cellules. Leur effet est donc spécifique à un ou plusieurs types de cellules, au sens où, pour être réceptives à ce facteur, les cellules doivent en posséder les récepteurs.

FGF (« fibroblast growth factor ») : facteur de croissance agissant sur les fibroblastes, en stimulant leur prolifération.

Fibroblastes : cellules du tissu fibreux.

Intégrines : récepteurs présents sur la membrane plasmique qui permettent à la cellule d'interagir avec son microenvironnement.

Matrice extracellulaire (MEC) : espace situé autour des cellules qui leur permet de former un échafaudage. Elle est constituée de protéines, de polysaccharides et de facteurs de croissance.

Ostéoblastes : cellules du tissu osseux.

VEGF (« vascular endothelial growth factor ») : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire. Il est impliqué dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, qui est associée à tout processus de régénération tissulaire.

On comprend aussi qu'il est important de bien contrôler ces interactions afin que le système ne devienne pas hyper-réactif et n'enclenche pas une réaction excessive. Ces études pour mettre au point les biomatériaux et étudier les réponses cellulaires sont réalisées dans des laboratoires, où les cellules sont mises en contact avec les biomatériaux et leur réponse suivie pas à pas. Les cellules y sont principalement cultivées dans des flasques, des boîtes de Petri ou encore des plaques multipuits qui vont permettre de recréer *in vitro* des modèles de culture de tissus biologiques. Mais ces supports utilisés pour la culture cellulaire ont une rigidité très élevée et sont loin d'être biomimétiques.

Développement historique des films multicouches de polyélectrolytes : vers des applications biomédicales

La méthode de dépôt couche par couche de polyélectrolytes, introduite il y a plus de vingt ans par Moehwald, Lvov et Decher [4], permet précisément de modifier la surface d'un matériau, en venant y déposer de façon alternée des couches de polyélectrolytes. Ces films minces auto-assemblés, qui peuvent être assemblés sur quasiment tout type de surface de matériaux, de tailles et formes variables [5], sont hautement modulables : outre les briques de base qui peuvent être variées avec un nombre quasi infini de possibilités, les conditions physico-chimiques d'élaboration (pH, force ionique, tampon...) et les méthodes de dépôt peuvent être variées selon les besoins [6]. Cette méthode trouve des applications dans de nombreux domaines de l'ingénierie, dont le photovoltaïque, l'optique, les couches minces magnétiques... et les couches minces pour le biomédical, en particulier pour la modification de surface des biomatériaux. Les méthodes de dépôt sont très nombreuses, en fonction du type de support qui doit être recouvert, que ce soit par immersion, spin coating, assemblage fluide, électromagnétique, ainsi que des méthodes non conventionnelles d'assemblage [5].

Progressivement, le domaine a évolué (figure 2). Initialement, les études s'intéressaient au mécanisme de croissance des films et à leur caractérisation par des méthodes physico-chimiques pointues (microscopie à force atomique, microbalance à cristal de quartz, spectroscopie optique, mesure du potentiel zêta, spectroscopie infrarouge). Ces premières études étaient focalisées essentiellement sur des polyélectrolytes synthétiques, dont le système « modèle » poly(styrène sulfonate)/poly(allylhydrochloride) (PSS/PAH) pour lequel l'épaisseur croît de façon linéaire avec le nombre de couches. Le premier article clé du domaine a été celui de Decher dans *Science* en 1997 [7]. C'est en 2001 qu'apparurent les premiers films constitués de polypeptides, présentant l'avantage d'être des polymères naturels, et les premières études sur l'adhésion de cellules mammifères. Une première étude a montré que des cellules de mélanome répondent spécifiquement à une hormone peptidique qui était greffée à la poly(L-lysine) (PLL) et incorporée dans des films avec l'acide poly(L-glutamique). C'est également la même année que des films contenant le polysaccharide hyaluronane et le polypeptide PLL ont été publiés. Ces films se sont révélés être particuliers en raison de leur forte incorporation d'eau et de la croissance exponentielle de leur épaisseur en fonction du nombre de couches déposées [8]. Cette croissance remarquable a pu être attribuée à la diffusion de la poly(L-lysine) au sein des films.

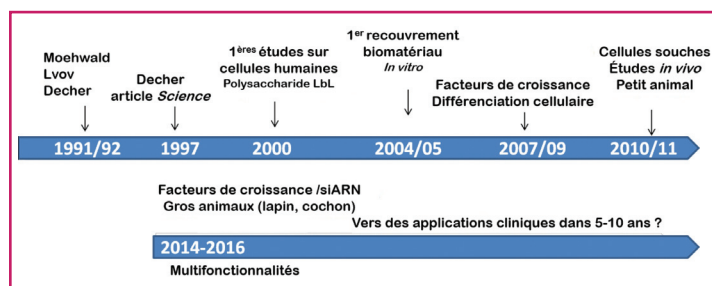


Figure 2 - Grandes étapes du développement des films multicouches de polyélectrolytes pour les applications biomédicales et la régénération de tissus humains. Ce développement a débuté par la caractérisation physico-chimique des assemblages polyélectrolytes, puis l'incorporation de principes actifs, avant de s'orienter vers les premières études d'implants recouverts de films polyélectrolytes, d'abord *in vitro* puis sur des modèles animaux. La voie vers des applications médicales est ouverte, mais nécessite plusieurs années pour valider toutes les étapes précliniques.

Les premières applications des films multicouches au recouvrement de surface de biomatériau ont émergé en 2004. Une étude pionnière a montré que des implants poreux pouvaient être recouverts de films multicouches, ouvrant ainsi des perspectives pour l'utilisation de ces films dans la délivrance de molécules actives et le contrôle des comportements cellulaires. Les molécules bioactives guidant l'adhésion et la destinée cellulaire peuvent être des protéines de la famille des facteurs de croissance, des peptides dérivés de protéines de la matrice extracellulaire ou des facteurs de croissance. Entre 2007 et 2009, plusieurs études ont introduit le concept de délivrance des facteurs de croissance aux cellules *via* les films couche-par-couche par des méthodes complémentaires décrites ci-après. Pour étudier la réponse des cellules à de tels films, la première étape est d'étudier les comportements cellulaires *in vitro* pour des cellules cultivées sur les films bioactifs dans une plaque de culture. Une fois que la preuve de concept est faite, l'étape suivante est d'étudier *in vivo* chez le petit animal (souris, rat) les films chargés en facteurs de croissance ou molécules actives. Dans le cas de l'os, ceci a été réalisé en 2011. L'étape suivante est de réaliser des études sur de plus gros animaux (cochon, lapin). Un certain nombre d'études ont été publiées sur les gros animaux mais les résultats ne sont pas toujours convaincants, comme c'est le cas dans le domaine de l'ingénierie tissulaire vasculaire. En fonction des avancées actuelles des études *in vivo* pour de nombreuses applications, dans le domaine des vaisseaux, de l'os, des implants neuroprothétiques, on peut entrevoir que les prochains développements porteront sur de nouveaux produits pour des applications cliniques [9]. Étant donné que les barrières réglementaires pour le développement de ces nouveaux produits dans ce domaine sont élevées, on peut estimer qu'il faudra encore cinq à dix ans pour arriver à un produit abouti.

Ingénierie de couches minces biomimétiques aux propriétés biophysiques modulables pour mimer la matrice extracellulaire

Les films minces auto-assemblés sont hautement modulables : outre les briques de base, qui peuvent être variées avec un nombre quasi infini de possibilités, et les conditions physico-chimiques d'élaboration (pH, force ionique, tampon...), il est possible de leur procurer de multiples

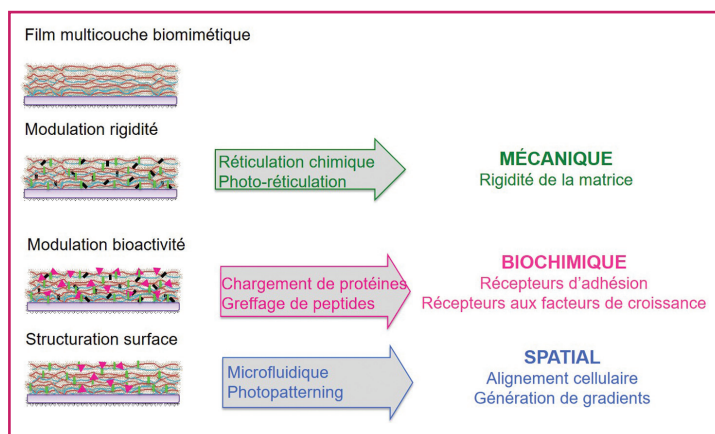


Figure 3 - Les trois principales propriétés modulables des films multicouches de polyélectrolytes. Les propriétés mécaniques peuvent être modulées par différentes méthodes permettant de créer des liens covalents ou non au sein des films. La fonctionnalité biochimique peut également être modulée, en plus des propriétés intrinsèques des polyélectrolytes constituant le film, en ajoutant des peptides ou des protéines bioactives pouvant cibler spécifiquement les récepteurs cellulaires. Les propriétés spatiales peuvent être contrôlées en combinant les films avec différentes techniques issues de la microfabrication et de la microfluidique.

fonctionnalités. Nous allons ici porter notre attention sur trois grands types de propriétés : modulation de la rigidité, modulation de la bioactivité et structuration spatiale du film multicouche (figure 3).

Modulation des propriétés mécaniques

Il est bien reconnu que les propriétés mécaniques peuvent avoir une grande influence sur les processus cellulaires, et notamment sur la différenciation cellulaire [10]. Réticuler les films polyélectrolytes permet de renforcer leurs propriétés mécaniques et peut s'avérer particulièrement intéressant pour des films à base de biopolymères qui sont plus fragiles que les films synthétiques. La modulation des propriétés mécaniques peut être réalisée par des méthodes i) physiques, notamment *via* l'incorporation de nano-objets, ii) ioniques, *via* des liaisons électrostatiques, ou iii) chimiques, *via* des groupements fonctionnels permettant de photo-réticuler, de créer des ponts disulfure ou des liaisons amide, ou encore des molécules naturelles telles que la génipine ou l'enzyme β -galactosidase [11] dont la conformation est sensible à l'étiement mécanique (figure 4A). La réticulation peut être réversible ou irréversible selon le protocole choisi. À noter qu'elle influence la biodégradabilité des films car les sites de coupure par des enzymes naturelles sont moins accessibles.

Au sein de notre équipe, nous avons mis au point un protocole permettant de réticuler chimiquement les groupements charges présents au sein de ces films biomimétiques, notamment les groupes carboxylique et amine, afin de les renforcer mécaniquement. Ainsi, il est possible de contrôler finement la rigidité de ces films en modulant la concentration d'agent réticulant – le carbodiimide 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) –, ce que nous avons vérifié à la fois par des techniques spectroscopiques telles que la spectrométrie infrarouge qui apporte une signature spectrale des groupements fonctionnels (carboxyliques, amide) et des mesures de nano-indentation par spectroscopie de force, utilisée pour déterminer le module d'élasticité apparent (E_0) (encore appelé module de Young) [12].

Modulation de la bioactivité

Les principales méthodes permettant de conférer une bioactivité aux films multicouches par incorporation de petites molécules de type médicament, de peptides ou de protéines sont présentées en figure 4B-D [13]. Une méthode très simple consiste à adsorber des protéines de la matrice extracellulaire à la surface des films ou de les enfouir au sein des films. Quand des fragments de protéines doivent être incorporés, tels que des peptides extraits des protéines de la matrice (de longueur inférieure à 25 acides aminés), il est alors préférable de les greffer à l'un des polyélectrolytes puis d'intégrer celui-ci au film (figure 4C). Ainsi, par le choix judicieux du peptide, il est possible de cibler différents types de récepteurs à la surface des cellules, les plus communément ciblés étant les récepteurs d'adhésion de type intégrines*. Nous avons récemment montré que des peptides couplés à l'acide poly(L-glutamique) pouvaient être ajoutés en dernière couche d'un film polyélectrolyte et étaient bioactifs [14] : un peptide d'adhésion contenant le motif RGD (Arg-Gly-Asp), issu de la protéine matricielle collagène, favorise l'adhésion, l'étalement cellulaire et la différenciation des cellules musculaires. Nous avons identifié que cette adhésion se fait spécifiquement *via* l'intégrine $\beta 3$. En revanche, un autre peptide extrait de la protéine matricielle laminine, ciblant d'autres récepteurs (appelés syndécanes), induit la formation de protrusions cellulaires, accroît la vitesse de migration cellulaire

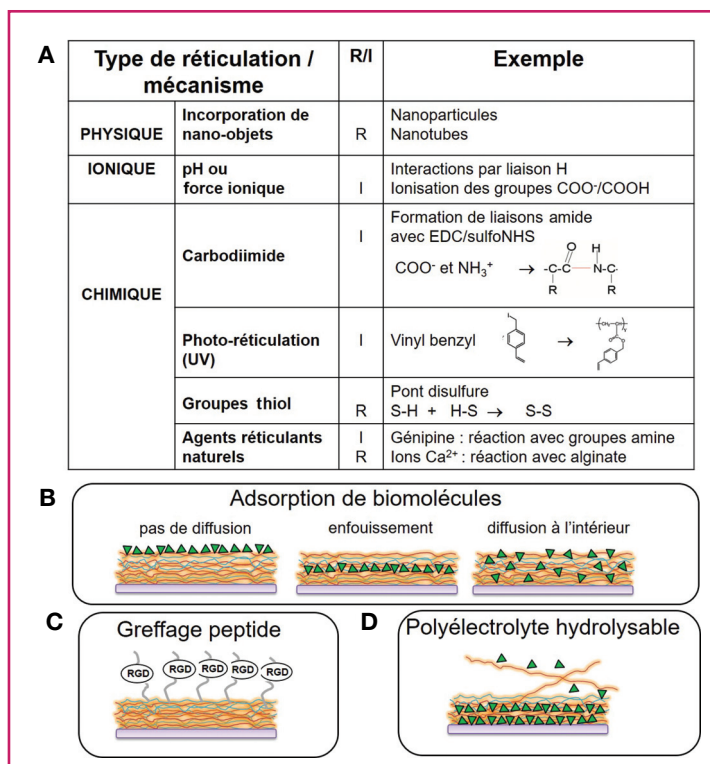


Figure 4 - Réticulation des films multicouches et méthodes de chargement en molécules bioactives. (A) Aperçu des principales stratégies utilisées pour moduler les propriétés mécaniques des films multicouches de polyélectrolytes, basées essentiellement sur de la réticulation ionique, de la réticulation chimique et physique. La réticulation est réversible (R) et/ou irréversible (I). (B) Les différentes possibilités d'incorporer des molécules bioactives à l'intérieur ou en haut des assemblages multicouches. (C) Pour les très petites molécules, telles que des peptides bioactifs, il est possible de les greffer à l'un des polyélectrolytes. Si l'un des constituants est hydrolysable (D), alors la molécule bioactive peut être délivrée en solution lors de la dissolution du film.

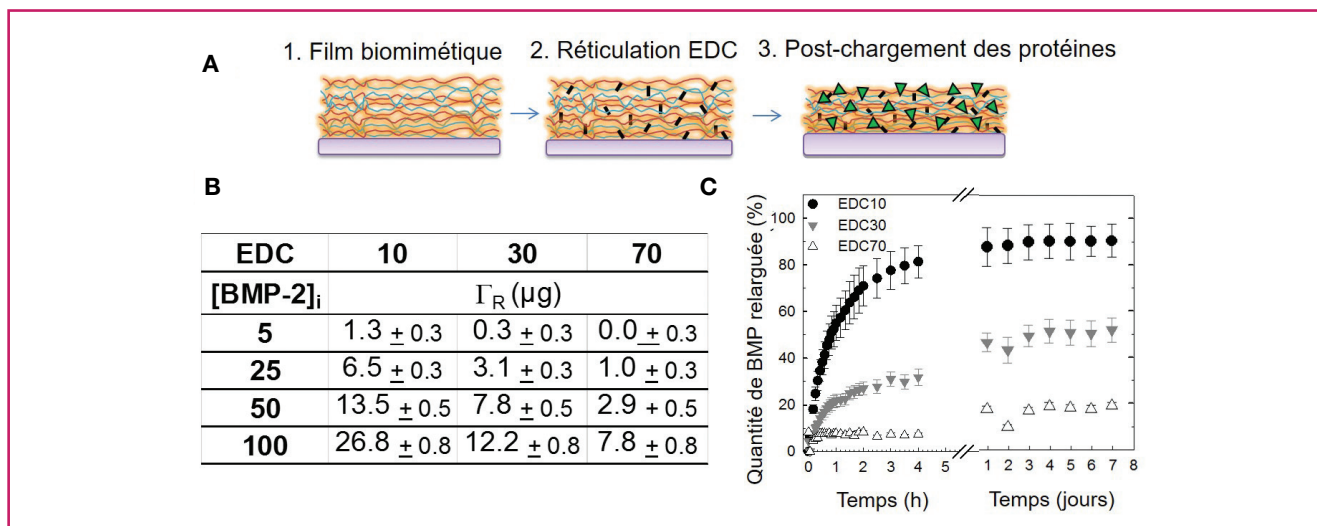


Figure 5 - Piégeage des protéines BMP-2 au sein des films biomimétiques. (A) Principe du chargement en protéines BMP dans les films biomimétiques constitués de poly(L-lysine) et d'acide hyaluronique. (B) Les quantités de protéines chargées au sein des films sont quantifiées par spectroscopie de fluorescence après marquage de la BMP-2. La quantité absolue de protéine relarguée par les films (Γ_R en μg) est mesurée en fonction de la concentration initiale en protéine BMP-2 (dans la solution de chargement) et pour plusieurs degrés de réticulation (notés EDC 10, 30 et 70) ; ceci correspond à la concentration en EDC utilisée lors de la réaction. (C) Relargage de la protéine au cours du temps suivi sur plusieurs jours.

et la prolifération cellulaire, mais diminue la différenciation des cellules musculaires. Nous avons montré que les effets de ce peptide font également intervenir le récepteur d'adhésion intégrine $\beta 1$.

On voit donc qu'un choix judicieux du peptide greffé sur les films permet de guider les cellules dans leur destinée.

Plus gros que les peptides car ce sont des protéines entières, les facteurs de croissance sont de très puissantes biomolécules pouvant interagir avec des récepteurs spécifiques et enclencher des cascades de signalisation complexes menant à la formation de tissus biologiques. Dans la matrice extracellulaire, ils se présentent en étant liés à la matrice *via* des interactions avec les protéines qui la constituent (figure 1). Les propriétés physico-chimiques (point isoélectrique, solubilité) des facteurs conditionnent les interactions avec les protéines de la matrice et avec leurs récepteurs. Différents types de facteurs de croissance ont été incorporés au sein des films multicouches dans le but de contrôler les processus cellulaires. Parmi les plus courants, on peut citer : le « fibroblast growth factor » (FGF*) impliqué dans la prolifération cellulaire, le « brain derived neuronal growth factor » (BDNF*) qui permet la croissance de cellules nerveuses, le « vascular endothelial growth factor » (VEGF*) qui entre en jeu lors du processus de formation de nouveaux vaisseaux, lié à tout processus de régénération tissulaire, et les « bone morphogenetic proteins » (BMP*) qui sont notamment impliquées dans la formation de l'os et du cartilage. Ces facteurs de croissance peuvent être par exemple adsorbés ou incorporés au sein des films multicouches. Si le film est lui-même biodégradable, alors le facteur va être progressivement relargué dans le milieu.

Nous avons choisi de travailler sur la protéine BMP-2* qui est déjà utilisée en pratique clinique pour réparer les os dans des situations critiques, mais dont le mode de délivrance actuel et la dose utilisée sont controversés [15]. Pour incorporer ces protéines BMP au sein des films multicouches de polyélectrolytes, nous procédons d'abord à la réticulation d'un film biomimétique (en utilisant EDC), puis procédons à leur chargement par simple post-diffusion (figure 5). La

concentration en protéines BMP chargée au sein des films peut être modulée *via* deux paramètres : la concentration initiale de BMP dans la solution de chargement mise au contact du film biomimétique, et l'épaisseur du film polyélectrolyte. Elle ne dépend pas du taux de réticulation du film. Les protéines BMP ayant une très forte affinité pour le film, une grande quantité est incorporée dans celui-ci lorsque la concentration initiale en BMP-2 est modulée (figure 5B). La réticulation EDC du film intervient dans le relargage de la protéine lors des rinçages du film : plus elle est faible, c'est-à-dire plus le maillage du film est grand, plus les BMP sont relarguées (figure 5C). L'ensemble de ces étapes permet d'obtenir un film biomimétique bioactif qui peut être déposé sur tous types de supports, que ce soient des matériaux utilisés pour la culture cellulaire *in vitro*, tels que des lamelles de verre et des boîtes de Petri en polystyrène, ou des biomatériaux implantables utilisés pour des applications cliniques. Ces biomatériaux peuvent être constitués de métal, céramique ou polymères naturels ou synthétiques.

Modulation des propriétés spatiales

Le contrôle spatial des assemblages multicouches [9] peut être réalisé par un grand nombre de techniques qui ne seront pas décrites ici, et dont les principales sont : la combinaison à une méthode permettant de microstructurer spatialement le film, la microfluidique, l'impression par jet d'encre, la photo-réticulation, ou encore micro-impression par contact. Selon les configurations expérimentales, ce contrôle spatial peut concerner le dépôt sur film lui-même, sur des surfaces préalablement structurées, ou venir structurer une protéine à la surface des films à l'aide d'impression, de microcontacts ou de flux spatialement localisés. La bonne stabilité des films à sec, y compris les films de biopolymères lorsqu'ils ont été stabilisés par réticulation chimique [16], et leur grande adaptabilité au dépôt sur tous types de matériaux quelle que soit leur nature chimique leur confèrent un grand avantage pour leur combinaison aux différentes techniques permettant de réaliser cette structuration spatiale.

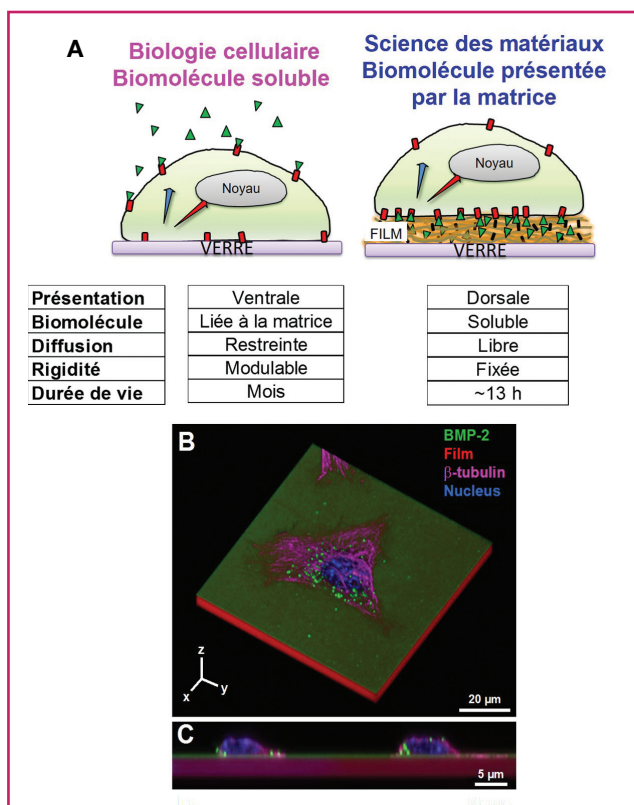


Figure 6 - Différences entre les modes de présentation des BMP-2 par le film biomimétique et une délivrance en solution.

(A) À gauche : mode de présentation traditionnel d'une biomolécule active aux cellules, employé en biologie cellulaire pour des cellules cultivées sur des substrats rigides (plastiques, verre). À droite : présentation par le film biomimétique dont la rigidité peut être modulée. Ces deux modes de présentation induisent des différences importantes dans les propriétés des biomolécules (diffusion, durée de vie) et la rigidité de la matrice (fixe ou modulable). (B) Cellule en interaction avec un film biomimétique contenant de la BMP-2 (en vert). La BMP-2 peut être internalisée par les cellules et apparaît alors sous forme de petits agrégats. En vue transversale (C), la cellule apparaît posée sur le film biomimétique et la BMP-2 est dispersée au sein de la cellule.

La délivrance localisée de protéines via les films biomimétiques permet de révéler des effets biologiques jusque là masqués

En quoi ces films biomimétiques innovants permettent-ils de mieux reproduire *in vitro* l'environnement physiologique *in vivo* ? La figure 6A présente les différences fondamentales entre le mode de culture cellulaire employé actuellement pour l'étude des molécules bioactives et le mode de culture par les biomatériaux que sont les films biomimétiques. En culture cellulaire « classique », les cellules se trouvent sur un substrat dont la rigidité est élevée et fixée. La molécule bioactive est ajoutée en solution dans le milieu de culture des cellules où elle peut librement diffuser. Dans ces conditions, elle va être en contact avec la face « dorsale » des cellules. Sa durée d'activité biologique sera courte (une demi-journée environ) car d'autres molécules se trouvent dans le milieu de culture et vont entrer en compétition avec elle et la dégrader. En revanche, quand une cellule est cultivée sur le film biomimétique de rigidité modulable, la molécule bioactive est confinée spatialement et présentée à la surface ventrale des cellules.

Nous appelons ce mode de présentation « lié à la matrice » car la molécule bioactive est liée au film biomimétique par des liens non covalents. La molécule étant piégée dans le film biomimétique, sa diffusion est quasi inexistante, ce qui va permettre d'optimiser son interaction avec les récepteurs cellulaires au facteur de croissance. En outre, nous avons montré que la durée de vie de la molécule bioactive ainsi piégée est considérablement allongée, et peut atteindre plusieurs mois [16]. Enfin, la cellule possède, à sa face ventrale, des récepteurs d'adhésion cellulaire qui vont lui permettre de renforcer son adhésion au film.

Nos travaux récents réalisés en collaboration entre le Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique (LMGP) et l'Institut of Advanced Biosciences (IAB, Grenoble, équipe de C. Albigès-Rizo) ont montré que ce contexte particulier de présentation ventrale du facteur de croissance permet de révéler un jeu croisé entre récepteurs : récepteur au facteur de croissance BMP et récepteur d'adhésion intégrines [17]. Ce jeu croisé a été révélé grâce au contrôle de la rigidité du film, car l'effet combiné est particulièrement mis en évidence dans des conditions où cette rigidité est basse. En effet, quand la rigidité est élevée, les effets sont masqués par le fait que la cellule adhère et s'étale sur une surface rigide, et ce indépendamment de la présence du facteur de croissance. Au contraire, sur une surface de basse rigidité, les cellules adhèrent et s'étalent peu : le fait d'y présenter le facteur de croissance induit une adhésion et un étalement cellulaire, qui sont spécifiquement dus à la présence du facteur de croissance. Ce changement de comportement cellulaire provient d'une conjonction de faits :

- la concentration en ligand BMP est localement très élevée et même si un lien ligand/récepteur se rompt, d'autres peuvent se reformer très rapidement ; de plus, les BMP diffusent très peu dans cette configuration ;
- les récepteurs aux BMP et les récepteurs d'adhésion se trouvent dans une proximité spatiale et sont sous forme d'amas (clusters), car ils ont été activés par leur ligand ; cette proximité spatiale va leur permettre de coopérer entre eux.

Ainsi, dans le cas précis des protéines BMP, nous avons mis au jour un couplage réciproque entre, d'un côté l'adhésion et la migration cellulaire, et de l'autre, la différenciation cellulaire qui mène à la formation osseuse : le facteur de croissance influence l'adhésion et la migration cellulaire, qui est principalement médiée par les récepteurs d'adhésion intégrines. Réciproquement, le récepteur d'adhésion joue un rôle dans la différenciation cellulaire osseuse, qui elle est médiée par les BMP. Nous avons également mis en évidence que les protéines BMP présentées par le biomatériau sont internalisées par les cellules (figure 6B) et que la signalisation biochimique associée à cette internalisation va dépendre de la rigidité du film biomimétique [18].

Ces travaux ouvrent la porte vers d'autres études fondamentales des processus cellulaires, dans différents contextes cellulaires, qui permettront de révéler des phénomènes jusque là masqués par les conditions expérimentales de culture cellulaire sur les substrats rigides.

Régénération osseuse induite par les films de polyélectrolytes biomimétiques

Un nombre croissant d'équipes travaillent dans le monde sur les applications des films multicouches au domaine de la régénération tissulaire et des dispositifs implantables [9].

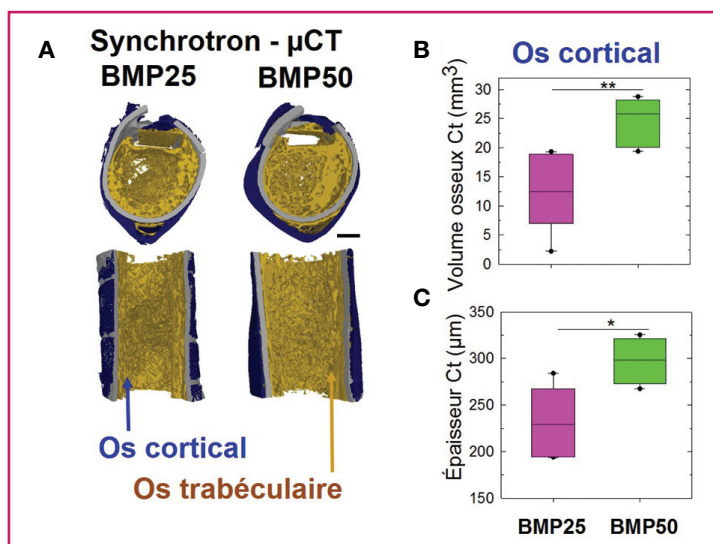


Figure 7 - Reconstruction osseuse d'un défaut fémoral volumique chez le rat obtenue par association d'un implant cylindrique en PLGA (en gris) et du revêtement biomimétique ostéoinducteur. Les couches minces biomimétiques ont été déposées par auto-assemblage à la surface du cylindre et forment un film de quelques micromètres d'épaisseur. (A) Images de reconstruction osseuse à deux doses de chargement en protéine BMP, obtenues par tomographie à rayons X à haute résolution à l'ESRF de Grenoble (vues transverses et longitudinales). L'os cortical est représenté en bleu et l'os trabéculaire en jaune. Volume cortical osseux (B) et épaisseur de la corticale (C) en fonction de la dose de BMP-2 dans le film biomimétique.

Le domaine de la régénération osseuse est en pleine expansion car il y a de forts besoins de reconstruction, notamment pour les défauts de taille critique : dans le cas des traumatismes dus à des accidents ou chocs, ou de cancers nécessitant d'opérer pour retirer le tissu tumoral. Au sein de notre équipe, nous avons débuté des études *in vivo* sur des animaux pour tester la potentialité de ces films à réparer des os dans un contexte physiologique. Dans ce cadre, nous avons choisi plusieurs types de biomatériaux support déjà utilisés en clinique dans le domaine de la chirurgie osseuse et maxillo-faciale : alliages de titane, matériaux céramiques et polymère biodégradable (acide polylactique coglycolique, PLGA). Nous avons également optimisé le film lui-même : son épaisseur, la quantité de BMP chargée qui peut être modulée en fonction des propriétés physico-chimiques du film (figure 5). La première étape a été de prouver que les films biomimétiques chargés en BMP et déposés sur des implants étaient ostéoinducteurs, c'est-à-dire capables d'induire activement la régénération osseuse. Ceci a été réalisé par implantation dans un site musculaire chez la souris et suivi, par microtomographie à rayons X et histologie, de la formation de nodules osseux [16].

Très récemment, en collaboration avec l'équipe du Pr. Bettega (CHU de Grenoble), nous avons montré qu'il est possible de régénérer un défaut osseux de taille critique dans le fémur de rat (figure 7) [19]. Nous avons employé pour cela des petits cylindres creux en PLGA, biomatériau couramment utilisé en chirurgie maxillo-faciale. Le film a été déposé à la surface du cylindre et l'ensemble implanté durant huit semaines. Une étude préliminaire nous a permis de cibler les doses de BMP et de définir quatre conditions expérimentales qui ont été étudiées de façon plus approfondie (deux conditions de réticulation du film EDC10/EDC30 et deux conditions de chargement en BMP, BMP25/BMP50). Nous avons suivi

la cinétique de réparation osseuse au cours du temps en prenant des radiographies, puis le tissu néoformé a été analysé et quantifié par des analyses histologiques et par tomographie à rayons X. Les images acquises à haute résolution à l'ESRF de Grenoble (figure 7), grâce à une collaboration avec l'équipe de F. Peyrin, montrent que l'os s'est formé autour et au sein de l'implant cylindrique, qui était initialement entièrement vide. La quantité et la qualité d'os formé dépendent de la concentration initiale de BMP chargée. Nous avons pu visualiser la formation d'os spongieux et cortical, ainsi que la présence de vaisseaux dans l'os néoformé.

Conclusions

Les résultats extrêmement encourageants obtenus sur différents types de films biomimétiques à base de multicouches de polyélectrolytes ouvrent des perspectives pour l'application de ces films à différents domaines biomédicaux, dont la chirurgie de construction osseuse, la chirurgie vasculaire, la stimulation neuronale ou encore la réparation de lésions cutanées. La modularité des assemblages couche-par-couche qui s'assemblent tels des jeux de Lego et leur combinaison avec des échafaudages plus ou moins architecturés offrent un grand nombre de possibilités pour la bioingénierie d'une nouvelle génération d'implants et dispositifs *in vivo*. Il reste néanmoins plusieurs étapes à franchir pour utiliser chez les patients ces films biomimétiques combinés à des biomatériaux. En effet, leur efficacité et leur sécurité doivent d'abord être validées par des tests précliniques sur animaux. Pour notre équipe, la prochaine étape est de prouver que des défauts de plus grande taille peuvent être réparés. De plus, il faudra franchir les barrières réglementaires pour que ce nouveau dispositif médical puisse être accepté par les autorités médicales.

D'un point de vue fondamental, le concept de présentation des biomolécules actives à la face ventrale des cellules et la modularité des films auto-assemblés de polyélectrolytes ouvrent de nombreuses pistes pour des études fondamentales des processus cellulaires dans le cadre de la biophysique et de la régénération tissulaire. De nombreuses équipes dans le monde, dont la nôtre, travaillent sur la délivrance de plusieurs types de principes actifs (facteurs de croissance, peptides, petites molécules). Ces films biomimétiques pourraient ainsi être utilisés pour mettre au point des modèles *in vitro* de tissus, en vue de thérapie cellulaire ou encore pour tester des médicaments dans des conditions plus physiologiques.

L'auteur remercie ses collaborateurs et l'ensemble des personnels de son équipe (doctorants, postdoctorants, personnel technique, stagiaires) qui ont participé aux différents travaux, ainsi que l'ANR et la communauté européenne (European Research Council, BIOMIM GA259370, OSCODI GA334966, BIOACTIVECOATINGS GA692924) pour leur support financier.

Références

- [1] Hudalla G.A., Murphy W.L., Biomaterials that regulate growth factor activity via bioinspired interactions, *Adv. Funct. Mater.*, **2011**, 21, p. 1754.
- [2] Wagner D.O., Sieber C., Bhushan R., Borgermann J.H., Graf D., Knaus P., BMPs: from bone to body morphogenetic proteins, *Sci Signal*, **2010**, 3, p. mr1.
- [3] Place E.S., Evans N.D., Stevens M.M., Complexity in biomaterials for tissue engineering, *Nat. Mater.*, **2009**, 8, p. 457.
- [4] Decher G., Hong J.D., Schmitt J., Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process. III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces, *Thin Solid Films*, **1992**, 210-211, p. 831.

- [5] Richardson J.J., Cui J., Bjornmalm M., Braunger J.A., Ejima H., Caruso F., Innovation in layer-by-layer assembly, *Chem. Rev.*, **2016**, *116*, p. 14828.
- [6] Richardson J.J., Bjornmalm M., Caruso F., Multilayer assembly: technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms, *Science*, **2015**, *348*, p. aaa2491.
- [7] Decher G., Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites, *Science*, **1997**, *277*, p. 1232.
- [8] Picart C., Mutterer J., Richert L., Luo Y., Prestwich G.D., Schaaf P., Voegel J.-C., Lavalle P., Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, p. 12531.
- [9] Monge C., Almodovar J., Boudou T., Picart C., Spatio-temporal control of LbL films for biomedical applications: from 2D to 3D, *Adv. Healthc Mater.*, **2015**, *4*, p. 811.
- [10] Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L., Discher D.E., Matrix elasticity directs stem cell lineage specification, *Cell*, **2006**, *126*, p. 677.
- [11] Rios C. *et al.*, A new biomimetic route to engineer enzymatically active mechano-responsive materials, *Chem. Commun. (Camb)*, **2015**, *51*, p. 5622.
- [12] Schneider A., Francius G., Obeid R., Schwinté P., Frisch B., Schaaf P., Voegel J.-C., Senger B., Picart C., Polyelectrolyte multilayer with tunable Young's modulus: influence on cell adhesion, *Langmuir*, **2006**, *22*, p. 1193.
- [13] Smith R.C., Riollano M., Leung A., Hammond P.T., Layer-by-layer platform technology for small-molecule delivery, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2009**, *48*, p. 8974.
- [14] Gribova V., Pignot-Paintrand I., Fourel L., Auzely-Velty R., Albigès-Rizo C., Gauthier-Rouvière C., Picart C., Control of the proliferation/differentiation balance in skeletal myoblasts by integrin and syndecan targeting peptides, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2016**, *2*, p. 415.
- [15] Carragee E.J., Hurwitz E.L., Weiner B.K., A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned, *Spine J.*, **2011**, *11*, p. 471.
- [16] Guillot R., Gilde F., Becquart P., Sailhan F., Lapeyriere A., Logeart-Avramoglou D., Picart C., The stability of BMP loaded polyelectrolyte multilayer coatings on titanium, *Biomaterials*, **2013**, *34*, p. 5737.
- [17] Fourel L., Valat A., Fauribert E., Guillot R., Bourrin-Reynard I., Ren K., Lafanechere L., Planus E., Picart C., Albigès-Rizo C., $\beta 3$ integrin-mediated spreading induced by matrix-bound BMP-2 controls Smad signaling in a stiffness-independent manner, *J. Cell. Biol.*, **2016**, *212*, p. 693.
- [18] Gilde F., Guillot R., Pignot-Paintrand I., Okada T., Fitzpatrick V., Boudou T., Albigès-Rizo C., Picart C., Cellular internalization of matrix-bound BMP-2 and associated endocytosis pathways, *Acta Biomaterialia*, **2016**, *46*, p. 55.
- [19] Bouyer M., Guillot R., Lavaud J., Plettinx C., Olivier C., Curry V., Boutonnat J., Coll J.L., Peyrin F., Josserand V., Bettega G., Picart C., Surface delivery of tunable doses of BMP-2 from an adaptable polymeric scaffold induces volumetric bone regeneration, *Biomaterials*, **2016**, *104*, p. 168.



Catherine Picart

est professeur à l'Institut Polytechnique de Grenoble*.

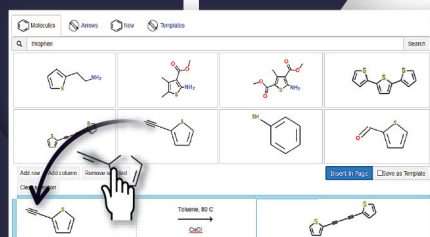
Elle a reçu la Médaille d'argent du CNRS en 2016.

* IPG, Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique (LMGP), 3 parvis Louis Néel, F-38031 Grenoble Cedex 01.

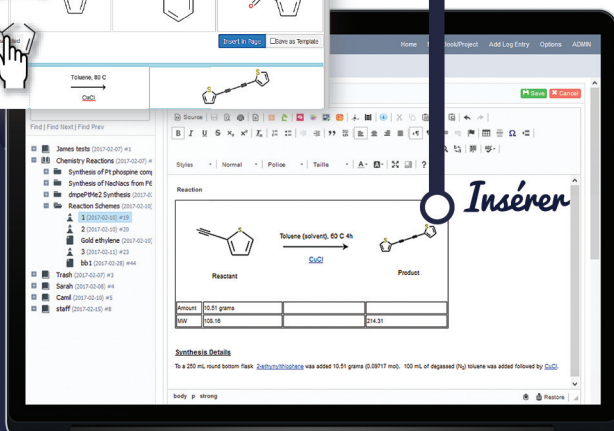
Courriel : Catherine.Picart@grenoble-inp.fr

LabCollector
www.labcollector.com

Trouver



Construire



Insérer



SOLUTION MODULAIRE DE CAHIER ET DE GESTION DE LABORATOIRE

CENTRALISE LA GESTION DE VOTRE INVENTAIRE
gestion de stocks, système de code barres intégré

OPTIMISE LA TRAÇABILITÉ DE VOS ÉCHANTILLONS
emplacement, historique des entrées/sorties

RÉPERTORIE VOS RÉSULTATS GRÂCE AU CAHIER
DE LABORATOIRE ÉLECTRONIQUE (ELN)
signature électronique, partage sécurisé



Scientists to Scientists



AgileBio Paris, 01 41 79 15 85
contact@agilebio.com

Solution adoptée dans plus de 600 laboratoires dans le monde !