

ADIL AKKOUCH

**INCORPORATION DE FIBRONECTINE ET D'ALBUMINE DE  
SÉRUM BOVIN À UN BIOPOLYMÈRE COMPOSÉ DE  
POLYPYRROLE ET DE POLY (L-ACIDE LACTIQUE) POUR  
PROMOUVOIR LA RÉGÉNÉRATION TISSULAIRE**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en médecine expérimentale  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2008

## RÉSUMÉ

Les biomatériaux jouent un rôle majeur dans le développement du génie tissulaire. Au cours des dernières années, les propriétés physiques, chimiques, et en particulier biologiques de ces matériaux ont été optimisées pour différentes applications.

Le polypyrrole (PPy) électriquement conducteur et ses matières composites sont utiles pour connecter des composants électriques, des cellules ou des tissus vivants. Des efforts ont été faits pour bio-activer le PPy en incorporant électrochimiquement des biomolécules comme l'héparine et l'acide hyaluronique. Cette méthode est cependant limitée par la petite taille des électrodes, la dénaturation des biomolécules pendant les réactions électrochimiques, le changement des propriétés physiques et surtout la conductivité du polypyrrole.

Le but de cette étude est de bio-activer le polypyrrole par l'incorporation de molécules bio-actives telles que la fibronectine et l'albumine de sérum bovin. Ce biomatériau serait d'une grande utilité dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et constituerait un support bioactif, biodégradable et électriquement conducteur pour la culture de différents types cellulaires avec de multiples applications biomédicales.

## ABSTRACT

Biomaterials play a crucial role in the development of engineered tissues and organs. In recent years, great efforts have been made to optimize the physical, chemical and particularly biological properties of scaffolds to be used for different requirements including biomedical applications.

Electrically conducting polypyrrole (PPy) and its composite materials are useful to interface electrical components and cells or living tissues. Efforts have been made to bioactivate PPy by electrochemically incorporating biomolecules such as heparin and hyaluronic acid. This method is however limited by its small size of electrode, its lack of processability, denature of biomolecules during electrochemical reaction, and change the mechanical integrity and conductivity of PPy.

The main objective of this work was to chemically bioactivate polypyrrole particules by incorporating biomolecules like fibronectin (FN) and bovine serum albumin (BSA). This material may be useful in tissue engineering as conducting bioactive and biodegradable scaffold for multiple *in vitro* and *in vivo* applications.

## AVANT-PROPOS

Le présent travail est structuré en trois chapitres :

**Chapitre I :** Une introduction générale consacrée aux rappels bibliographiques afférents à notre étude, ainsi que les hypothèses de travail.

**Chapitre II :** Un article scientifique intitulé : "Bioactivating Electrically Conducting Polypyrrole with Fibronectin and Bovine Serum Albumin" a été soumis au journal *Biomacromolecules* pour publication. Cet article regroupe les résultats de nos recherches relatives au présent mémoire. J'ai participé à toutes les manipulations pour toutes les expériences, à l'interprétation des données, aux analyses statistiques et j'ai produit la première version de l'article qui a été révisé par mon directeur de recherche le Dr. Mahmoud Rouabhia ainsi que mon codirecteur de recherche le Dr. Ze Zhang. Guixin Shi m'a initié à la polymérisation du polypyrrole et à la production des matrices.

**Chapitre III :** Une discussion générale suivie d'une conclusion du travail ainsi que les perspectives.



## REMERCIEMENTS

La direction de ce travail a été assurée par M. Mahmoud Rouabhia que je tiens à remercier pour m'avoir accueilli dans son équipe. Son attention discrète, ses recommandations mesurées et la totale autonomie qu'il m'a donnée, m'ont permis, à force de persévérance et d'opiniâtreté, de mener à bien ces recherches. J'ai particulièrement apprécié votre rigueur et votre passion dans votre métier de chercheur. Votre gentillesse et vos encouragements ont été une des clés de la construction de ce mémoire. Je ne l'oublierai jamais.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à M. Ze Zhang mon Codirecteur de recherche sans qui ce travail n'aurait sans doute jamais abouti. Merci pour vos précieux conseils, votre rigueur et votre clairvoyance scientifique, l'attention, la confiance et le temps que vous m'avez accordés.

Je voudrais aussi remercier M. Robert Guidoin pour son rôle d'examineur de ce mémoire, sa sympathie et sa bonne humeur.

Je remercie l'ensemble des membres du Groupe de Recherche en Écologie Buccale (GREB) de la faculté de médecine dentaire de l'université LAVAL et en particulier Mme Suzane Larue ainsi que tous les étudiantes et étudiants du laboratoire du Dr. Rouabhia : Séverine, Khan, Patricia, Nadège, Sabrina, Saïd, Boris, Claude, Christophe, Constant pour leur sympathie sans oublier notre cher technicien de recherche M. Gilbert Castillaux pour tous les bons moments et les discussions que nous avons abordés ensemble, ainsi que tous les stagiaires avec qui j'ai passé de très beaux moments.

Mes pensées vont plus particulièrement à Guixin Shi, en compagnie de qui j'ai effectué une grande partie de ma thèse et dont l'amitié m'est très précieuse.

Mes remerciements vont aussi aux membres de l'Institut des Biomatériaux du Québec (IBQ) de l'Hôpital Saint François d'Assise qui m'ont toujours chaleureusement accueillis, en particulier, mes coéquipiers Shiyun Meng et Nicolas Chiffot ainsi que tous les permanents et étudiants que j'ai rencontrés. Un grand merci à Pascal, Jean, Stéphane, Sébastien, Mustapha, François, Matteo, Enrico, Christian...

Une petite pensée à tous mes amis du Bled en particulier Amr, Abella, Kabil, Mouhcine... ainsi qu'à tous ceux avec qui j'ai passé quatre années inoubliables à l'université Ibn Tofail de Kénitra.

Et je finis par les personnes les plus chères pour moi, mes parents : sans leur soutien et leurs prières je ne serais jamais arrivé à ceci. Je vous remercie de m'avoir élevé dans un monde empreint de curiosité, de m'avoir toujours encouragé et soutenu dans toutes mes études. Parce que je leur dois tant, je leur dédie ce travail.

Merci bien mes frères, ma \*tit\* sœur Maha ainsi qu'à tous les membres de ma famille. Une dernière pensée à toi, Karina et un grand remerciement pour ton soutien et ta présence. Merci beaucoup...

« La vie, c'est comme une bicyclette, il faut avancer pour ne pas perdre l'équilibre »

Albert Einstein

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
ABSTRACT.....	ii
AVANT-PROPOS.....	iii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Thérapies cellulaires et tissulaires.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Ingénierie tissulaire.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Thérapie cellulaire.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Biomatériau.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Définitions.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Catégories de biomatériaux.....</b>	<b>5</b>
2.2.1. <i>En fonction de leur réponse.....</i>	5
2.2.2. <i>En fonction de leur rôle.....</i>	5
<b>3. Biocompatibilité vs Biodégradation.....</b>	<b>6</b>
<b>3.1. Implant permanent.....</b>	<b>6</b>
<b>3.2. Implant dégradable.....</b>	<b>6</b>
3.2.1. <i>Dégradation et érosion.....</i>	6
3.2.2. <i>Dégradation de masse.....</i>	9
3.2.2.1. <u>Les polymères des acides lactiques.....</u>	10
<i>a- Synthèse.....</i>	11
<i>b- Bioérosion.....</i>	12
3.2.3. <i>Dégradation de surface.....</i>	14
<b>4. Origine et classification des polymères biodégradables.....</b>	<b>15</b>
<b>4.1. Polymères naturels.....</b>	<b>15</b>

4.2. Polymères synthétiques.....	19
4.3. Polymères composites.....	20
<b>5. Polymères conducteurs.....</b>	<b>20</b>
5. 1. Rappels sur la conductivité.....	22
5.2. Les polymères conducteurs.....	23
5.3. Le polypyrrole (PPy) .....	25
5.3.1. <i>Synthèse du polypyrrole</i> .....	25
5.3.1.1. <u>Synthèse chimique du polypyrrole</u> .....	25
<i>a- Polymérisation</i> .....	26
<i>b- Optimisation de la réaction de polymérisation</i> .....	27
b-1. Choix de l'amorceur.....	27
b-2. Rapport oxydant/pyrrole.....	27
b-3. Le dopant.....	28
b-4. Choix du solvant.....	28
b-5. Durée de polymérisation.....	29
b-6. Vitesse d'agitation.....	29
b-7. Rendement de réaction.....	29
5.3.1.2. <u>Synthèse électrochimique du polypyrrole</u> .....	30
5.3.2. <i>Structure chimique du polypyrrole</i> .....	30
5.3.3. <i>Applications des polypyrroles</i> .....	31
<b>6. La fibronectine.....</b>	<b>32</b>
6.1. Structure modulaire et domaines d'affinités.....	33
6.2. Fonctions de la fibronectine.....	34
6.2.1. <i>Adhérence</i> .....	34
6.2.2. <i>Étalement et migration</i> .....	35
6.2.3. <i>Prolifération et cycle cellulaire</i> .....	35
6.2.4. <i>Différenciation</i> .....	36
6.2.5. <i>Fibronectine et architecture de la matrice extracellulaire</i> .....	36
<b>7. Albumine de sérum bovin.....</b>	<b>37</b>
7.1. Structure de la BSA.....	37
7.2. Propriétés de la BSA.....	41

<b>8. Objectif et hypothèses de recherche.....</b>	<b>43</b>
<b>CHAPITRE II. BIOACTIVATING ELECTRICALLY CONDUCTING POLYPYRROLE WITH FIBRONECTIN AND BOVINE SERUM ALBUMIN.....</b>	<b>44</b>
<b>CHAPITRE III. DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>79</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>82</b>

## LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

<b>Figure 1-1</b> : Représentation schématique d'un implant caractérisé par une dégradation de masse.....	9
<b>Figure 1-2</b> : Structure du Poly(acide lactique).....	10
<b>Figure 1-3</b> : Voies de synthèse du PLA.....	11
<b>Figure 1-4</b> : Représentation schématique d'un implant soumis à une dégradation de surface .....	14
<b>Figure 1-5</b> : Structure de différents polysaccharides.....	16
<b>Figure 1-6</b> : La conception hiérarchique du collagène.....	18
<b>Figure 1-7</b> : Structure de quelques polyesters aliphatiques biodégradables.....	19
<b>Figure 1-8</b> : Structure chimique de quelques polymères conducteurs.....	21
<b>Figure 1-9</b> : Ordre de grandeur de la conductivité de différents .....	22
<b>Figure 1-10</b> : Conductivités électriques de polymères conducteurs comparées à celles de polymères isolants et de quelques conducteurs non polymères.....	24
<b>Figure 1-11</b> : Réaction de polymérisation simplifiée du pyrrole par voie chimique.....	26
<b>Figure 1-12</b> : Structure du polypyrrole.....	31
<b>Figure 1-13</b> : Les modules de la fibronectine .....	33
<b>Figure 1-14</b> : Principaux ligands de la fibronectine.....	34
<b>Figure 1-15</b> : Adhérence d'une cellule sur son substrat via le complexe intégrines-fibronectine.....	35
<b>Figure 1-16</b> : Structure de la BSA.....	38
<b>Figure 1-17</b> : Séquence d'acides aminés de la BSA.....	40
<b>Figure 1-18</b> : Structure tertiaire de la HAS.....	41
<b>Tableau 1.1</b> : Sites de liaisons de la BSA et leurs ligands.....	42

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ala: Alanine

Asn: Asparagine

Asp: Acide aspartique

ATP: adénosine triphosphate

BSA: Albumine de sérum bovin

Cl<sup>-</sup>: Ion chlorure

CuBr<sub>2</sub>: Bromure de cuivre

CuCl<sub>2</sub>: Chlorure de cuivre

D : Dimension

DBS: Dodécylbenzènesulfonate

ESA: Albumine de sérum équine

FBGC: Foreign-body giant cell

FDA: Food and Drug Administration

Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>: Nitrate ferrique

Fe<sup>2+</sup>: Fer ferreux

Fe<sup>3+</sup>: Fer ferrique

FeCl<sub>2</sub><sup>-</sup>: Chlorure ferreux (II)

FeCl<sub>3</sub>: Chlorure ferrique (III)

FN : Fibronectine

Gln: Glutamine

Glu: Acide glutamique

Gly: Glycine

HCl : Acide chlorhydrique

HSA: Albumine de sérum humaine

kDa: kilo dalton

Leu: Leucine

Lys: Lysine

MEC: Matrice extracellulaire

MSA: Albumine de sérum de souris

OSA: Albumine de sérum de mouton

PA: Polyacétylène

PANi: Polyaniline

PCL: Polycaprolactone

PDLLA: Poly-D,L-acide lactique, poly(D,L-lactide)

PGA: acide polyglycolique

Phe: Phenylalanine

PLA: Polylactide ou poly(acide lactique)

PLLA: Poly-L-acide lactique, Poly(L-lactide)

PPP: Poly(p-phénylène)

PPS: Poly(p-phénylène sulfide)

PPy: Polypyrrole

PSA: Albumine de sérum de pore

Py : Pyrrole

RSA: Albumine de sérum de rat



SSA: Albumine de sérum de saumon

XSA: Albumine de sérum de grenouille

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

### 1. Thérapies cellulaires et tissulaires

Avec les progrès que la médecine a connus ce dernier siècle, le remplacement de tissus et d'organes tel que la cornée, les os, la peau et les valves cardiaques est devenu une opération de routine. Or, jusqu'il y a peu, les chirurgiens ne se posaient pas de questions lorsqu'ils recherchaient un tissu en vue d'une greffe, ces tissus pouvaient être de source autologue ou allogénique. Cependant, les problèmes d'incompatibilité entre le donneur et le receveur, la qualité inégale des tissus reçus et les longs délais dus à la pénurie de certains tissus les ont conduit à mener de nouvelles recherches pour produire de nouveaux tissus «synthétiques» qui pourraient combler ce manque excessif d'organes, d'où l'émergence de cette nouvelle science qui est l'ingénierie tissulaire. Ce domaine vise à mettre au point des tissus imitant les tissus naturels en modifiant et en assemblant des cellules prélevées chez l'Homme en tissus et/ou organes. Plusieurs produits sont déjà sur le marché et sont administrés à des patients de plus en plus nombreux (Gustafson *et coll.*, 2001).

Le principal but de la médecine régénératrice est de restaurer des tissus et des organes ainsi que leurs activités fonctionnelles en remplaçant les cellules déficientes ou en reconstituant les organes détruits. Le développement de la médecine régénératrice est basé sur la maîtrise de plusieurs sciences fondamentales s'occupant des processus biologiques impliqués dans la génération et le fonctionnement normal des tissus : l'embryologie, l'organogenèse, la signalisation cellulaire, les facteurs de croissance et la biologie des cellules souches.

La médecine régénératrice est utile à plusieurs domaines touchant les maladies dégénératives (ex: maladie de Parkinson), les pathologies impliquant une destruction des cellules, des tissus ou d'organes (ex : diabète), ainsi qu'à différents traumatismes accidentels. Les principaux secteurs de la médecine régénératrice sont *l'Ingénierie tissulaire* (Implantation de substituts biologiques construits *in vitro*), et la *Thérapie cellulaire* (Transplantation de cellules pour développer de nouveaux tissus).

### **1.1. Ingénierie tissulaire**

L'ingénierie tissulaire applique les principes de l'ingénierie et des sciences de la vie afin de développer des substituts biologiques qui vont restaurer, maintenir ou améliorer la fonction des tissus. C'est un champ interdisciplinaire, combinant les savoirs et les procédés venant de plusieurs disciplines telles que la physique, la chimie, la biologie cellulaire, la biologie moléculaire, les sciences de la matière... Pour ces fins, l'ingénierie tissulaire fait appel à plusieurs techniques et méthodes en faisant intervenir différents types de cellules vivantes comme matériel de base afin de développer soit des tissus inertes (ex: valves cardiaques), des tissus issus d'une autre partie du corps du patient lui-même, d'un autre patient (ex: transplantation) ou la reconstruction d'organes *ex-vivo*.

Parmi les nombreuses composantes employées dans l'ingénierie tissulaire nous citons les six principales :

#### **-La matrice :**

Les biomatériaux sont employés pour diriger l'organisation, la croissance et la différenciation des cellules, en apportant un support physique et des signaux chimiques ou électriques.

#### **-Les cellules :**

Elles peuvent être d'origine variées, les cellules peuvent être autologues, allogéniques ou xénogéniques, différenciées ou cellules souches.

#### **-Les aspects biomécaniques des tissus originaux :**

Caractériser les propriétés des tissus originaux pour identifier les propriétés minimales requises afin d'assurer le bon fonctionnement, l'efficacité et la sécurité des tissus fabriqués.

**-Les biomolécules :**

Elles regroupent tous les facteurs angiogéniques, les facteurs de croissance, les facteurs de différenciation et les protéines.

**-Le design tissulaire :**

L'expansion cellulaire en 2D et la croissance tissulaire en 3D qui nécessite le design de bioréacteurs pour une meilleure vascularisation et distribution des cellules et tissus.

**-L'informatique :**

Le séquençage génique et protéomique et l'analyse de patron d'expression.

L'analyse quantitative d'imagerie cellulaire et les outils de gestion de données.

**1.2. Thérapie cellulaire**

Les thérapies cellulaires préviennent ou traitent les pathologies humaines par l'administration de cellules qui ont été choisies, multipliées et pharmacologiquement traitées ou modifiées en dehors du corps (*ex vivo*).

Les thérapies cellulaires peuvent être développées à partir de cellules différenciées fonctionnelles ou de cellules souches. Le but de la thérapie cellulaire est de remplacer, réparer, ou d'augmenter la fonction des tissus ou organes endommagés, les cellules peuvent provenir du patient, d'un donneur, d'une autre espèce ou d'une lignée cellulaire. Il existe deux principales stratégies de traitement en thérapie cellulaire :

- L'utilisation de cellules souches pouvant se substituer aux cellules ciblées.
- L'utilisation de cellules saines pouvant produire une substance dont l'organisme a besoin.

Les principaux facteurs de la croissance et le développement des recherches dans le domaine des biomatériaux liés à la médecine régénératrice sont le manque important de donneurs d'organes pour la transplantation, le vieillissement de la population qui souffre d'insuffisances organiques, ainsi que le fort degré de rejet des greffes et les effets secondaires constituant un problème pour le développement des allogreffes, en plus il faut citer les progrès remarquables de la recherche dans le domaine des cellules souches et des biomatériaux qui présentent une alternative nécessaire pour l'avancement de la médecine régénératrice.

Par contre, les coûts et la longue période de validation des produits avant toute utilisation clinique sont parmi les facteurs qui ralentissent l'ingénierie tissulaire. (Ministère délégué à l'enseignement supérieur et à la recherche. *Thérapies cellulaires et ingénierie tissulaire, Attractivité et compétitivité de la France, 2007*).

## **2. Biomateriau**

### **2.1. Définitions**

« Un biomateriau est un matériau d'origine naturelle ou synthétique, utilisé seul ou combiné avec un principe actif, comme partie intégrante d'un dispositif, pour le traitement, l'accroissement ou le remplacement de tissus ou organes, sans causer de dommage aigu ou chronique à son hôte, tout en assurant son efficacité biologique et/ou physique prévue, pendant sa durée de service *in vivo*. » : *National Institutes of Health Consensus Conference* (1982).

Cette définition met le point sur deux aspects souvent ignorés qui sont les effets secondaires ou indésirables et la durée de service de l'implant (Bruck, 1990). Cette définition englobe le sens que l'on attribue actuellement à la biocompatibilité. En fait, les implants à libération contrôlée sont aussi bien intégrés dans cette définition du biomateriau, tant au niveau de la tolérance que du rôle de ces systèmes (Park et Park, 1996).

## 2.2. Catégories de biomatériaux

### 2.2.1. En fonction de leur réponse

Selon Mallapragada et Narasimhan (1999), on peut classer les biomatériaux en matériaux inertes qui induisent une réponse très faible de l'hôte et en matériaux interactifs, impliqués dans des réponses spécifiques (voire orientées) comme une adhésion ou une croissance du tissu adjacent à la surface ou dans l'implant. Ce genre de matériaux est utilisé dans les systèmes à libération contrôlée (Mallapragada et Narasimhan, 1999). Des matériaux viables, ce sont des matériaux contenant des cellules vivantes et qui sont traités par l'hôte comme une matrice tissulaire normale. Finalement nous retrouvons les matériaux replants : il s'agit d'un matériau de tissu natif cultivé *in vitro* à partir des cellules du patient, c'est l'exemple des greffes hétérologues et autologues avec une étape intermédiaire de culture *in vitro* entre la biopsie et l'implantation utilisées dans la régénération tissulaire.

### 2.2.2. En fonction de leur rôle

Selon la fonction qu'ils sont appelés à jouer, les biomatériaux sont répartis en quatre catégories (Chandra et Rustgi, 1998) :

- Remplacement d'un tissu pathologique ou non fonctionnel : articulations, valves cardiaques, dents et lentilles oculaires.
- Assistance à la réparation d'un tissu : fils de sutures, implants chirurgicaux pour les réductions de fractures et dispositifs de réparation de ligaments et tendons.
- Remplacement complet ou partiel de la fonction d'un organe majeur : hémodialyse (reins), assistance respiratoire (poumons) et cardiaque (coeur), perfusion (foie et/ou reins), libération d'insuline (pancréas), sang artificiel (sang).
- Libération d'un principe actif : libération ciblée à une région localisée (tumeur) ou systémique avec un taux soutenu dans le temps (insuline, contraceptifs).

### **3. Biocompatibilité vs Biodégradation**

#### **3.1. Implant permanent**

On appelle implant inerte tout matériau implantable qui reste chimiquement stable même lors des changements de la composition chimique et enzymatique du milieu environnant (Woodward, 1999). Ceci favorise le maintien de l'implant pendant très longtemps car leur stabilité chimique était considérée comme la clé de leur biocompatibilité (Pulapura et Kohn, 1992).

Même si la liste de ce type de matériaux est longue, seuls quelques uns présentent les qualités requises d'un biomatériau pouvant échapper aux modifications et aux effets du milieu environnant. Parmi ces matériaux nous trouvons certains disques de silicone, les tiges orthopédiques en Teflon<sup>®</sup> et certaines prothèses en acier inoxydable (Pulapura et Kohn, 1992).

Des implants métalliques d'apparence inerte subissent en fait une corrosion lente produisant ainsi des ions et par conséquent une perte de biocompatibilité à long terme pouvant expliquer la laxité aseptique observée avec des prothèses orthopédiques métalliques (Woodward, 1999). Ces ions métalliques peuvent jouer le rôle d'haptène et se fixer à une protéine formant ainsi un complexe capable de déclencher une réaction immunitaire à médiation cellulaire (Remes et Williams, 1992).

Tout comme les métaux, les céramiques non dégradables ou à très lente dégradation ont été considérées comme des biomatériaux inertes. Cependant, il est reconnu que certaines céramiques peuvent activer le système du complément et/ou induire un recrutement et une activation des phagocytes (Remes et Williams, 1992).

#### **3.2. Implant dégradable**

##### **3.2.1. Dégradation et érosion**

Le but principal de développer de nouveaux implants biodégradables est, qu'une fois implantés, on n'a pas besoin d'une deuxième intervention chirurgicale pour leur retrait et

par conséquent on évite les réactions inflammatoires parfois chroniques causées par les corps étrangers, d'où vient leur très grande importance dans les domaines de recherche et des applications chimiques (Ali *et coll.*, 1993; Langer et Peppas, 1981).

De nombreux matériaux biodégradables ont été intégrés dans des applications cliniques comme l'irradiation du cancer local, le développement de vaccins, la fabrication de nanoparticules, l'autorégulation de systèmes à libération contrôlée (Orloff *et coll.*, 1997; Park et Park, 1996).

D'une manière générale, la dégradation des polymères, se fait par étapes : un polymère se décompose en oligomères puis en monomères. La taille de l'implant et sa masse molaire représentent le paramètre idéal pour évaluer sa dégradation au cours du temps (Göpferich, 1996). D'autres procédés tel que le gonflement, la dissolution et la diffusion des oligomères et/ou monomères et les changements structuraux comme ceux de la rugosité de surface, de la porosité et de la cristallinité du polymère (Anderson et Shive, 1997), doivent être pris en considération pour évaluer la dégradation du polymère.

Selon Bruck, le terme « biodégradation » devrait être réservé à la dégradation *in vivo*, des polymères qu'elle soit de type hydrolytique, oxydante ou enzymatique (Bruck, 1990), malgré l'utilisation, *in vitro*, de milieux pseudo-biologiques avec parfois la présence d'enzymes. Les polymères d'origine naturelle tels que les polysaccharides, les protéines (gélatine et collagène), les poly( $\beta$ -hydroxyacide), les poly(hydroxybutyrate) et les poly(hydroxyvalerate) se dégradent essentiellement par réaction enzymatique (Pulapura et Kohn, 1992). En revanche, le principal mode de dégradation des polymères synthétiques est l'hydrolyse dont la vitesse est essentiellement liée à la nature des liaisons chimiques dans ces polymères (Göpferich, 1996).

D'autres facteurs régulent la dégradation comme le pH et la prise d'eau; la vitesse de dégradation d'un polymère peut être régulée par l'ajout d'excipients qui modifient le pH.



Dans le cas des systèmes à libération contrôlée, le principe actif lui-même peut remplir cette fonction (Göpferich, 1996).

Il semble que des changements physico-chimiques du polymère qui se produisent au cours de sa dégradation, comme la cristallisation des oligomères et des monomères ou la variation du pH, agissent en rétrocontrôle sur cette dégradation (Anderson et Shive, 1997). Comme exemple, la prise d'eau pour les systèmes à libération contrôlée, est un paramètre particulièrement important qui, dans le cas des hydrogels, devient plus décisif pour la performance de l'implant et sa dégradation (Park et Park, 1996). La cristallisation des oligomères et monomères, résultats de la dégradation du polymère, fait diminuer la vitesse de dégradation du même polymère, sachant que la concentration de ses produits de dégradation peut augmenter au cours de la dégradation et donc diminuer encore la vitesse de dégradation (Anderson et Shive, 1997; Pulapura et Kohn, 1992; Li *et coll.*, 1990).

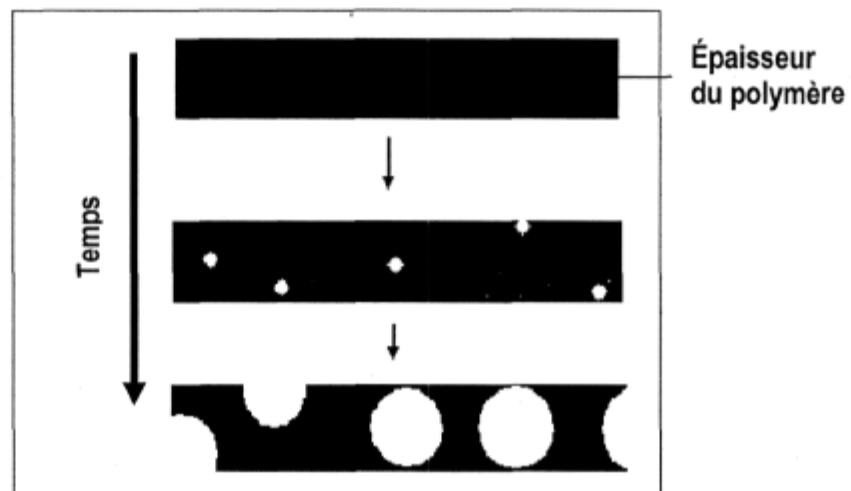
Enfin, il faut aussi penser au devenir de principes actifs instables tel que des protéines ou peptides ainsi que les cellules vivantes quand ils sont impliqués dans un environnement en évolution chimique «continue» tel qu'un polymère en dégradation (Göpferich, 1996).

La durée d'élimination *in vivo* d'un matériau dégradé est déterminée par la nature des liaisons chimiques du polymère, la solubilité des produits de dégradation, la dimension, forme et densité de l'implant, le principe actif, les additifs, la masse molaire du polymère et le site d'implantation (Orloff *et coll.*, 1997). Tous ces paramètres soulèvent de nombreux points d'interrogation sur la biocompatibilité d'un implant dégradé (Göpferich, 1996; Zange et Kissel, 1997). Il est préférable qu'un matériau se dégrade en sous-produits biologiques comme des acides ou alcools, qui sont éliminés par les voies métaboliques de l'hôte (Langer, 1990; Orloff *et coll.*, 1997). La dégradation d'un matériau ne doit pas en aucune manière être nuisible à l'hôte ; les sous-produits ne doivent pas être toxiques même à faibles concentrations ; la dégradation ne doit pas être trop rapide pour réduire l'accumulation des sous-produits initialement sans danger à des concentrations faibles (Göpferich, 1996; Zange et Kissel, 1997).

### 3.2.2. Dégradation de masse

La plupart des polymères dégradables ont une dégradation de masse (Peppas et Langer, 1994). La scission des chaînes polymères s'effectue au hasard dans toute l'épaisseur de l'implant (Figure 1-1) (Langer, 1990).

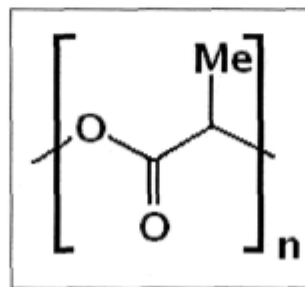
D'une manière générale, la dégradation de masse commence par la pénétration de l'eau dans le réseau polymère provoquant ainsi le gonflement de l'implant, ce qui favorise la dégradation chimique du polymère par scission aléatoire des chaînes et ce qui donne naissance à des oligomères et monomères. Les produits de dégradation ont habituellement des propriétés acido-basiques qui modifient le pH du polymère. La dégradation progressive change la microstructure de la masse polymère par la formation de pores à travers lesquels les oligomères et les monomères sont libérés, entraînant la perte de masse du polymère (érosion) (Göpferich, 1996).



**Figure 1-1** : Représentation schématique d'un implant caractérisé par une dégradation de masse.

### 3.2.2.1. Les polymères des acides lactiques

Le polylactide ou poly(acide lactique) (PLA) (Figure 1-2) est un polyester aliphatique synthétisé soit par condensation à partir d'un  $\alpha$ -hydroxy acide (l'acide lactique), soit par polymérisation par ouverture de cycle, à partir d'un monomère cyclique : le lactide. On peut utiliser le PLA pour réaliser des objets par injection ou moulage, on peut l'étirer sous forme de films ou de fibres et son domaine d'application s'étend de l'industrie de l'emballage aux applications biomédicales (sutures, implants, libération contrôlée...).



**Figure 1-2 :** Structure du Poly(acide lactique)

Le PLA est un polymère biorésorbable avec des propriétés thermoplastiques très élevées. Par contre, ses propriétés mécaniques dépendent fortement de la voie de synthèse, de la qualité du polymère synthétisé (composition, pureté, masse molaire...) et de la concentration en isomères L ou D (Yin *et coll.*, 1998).

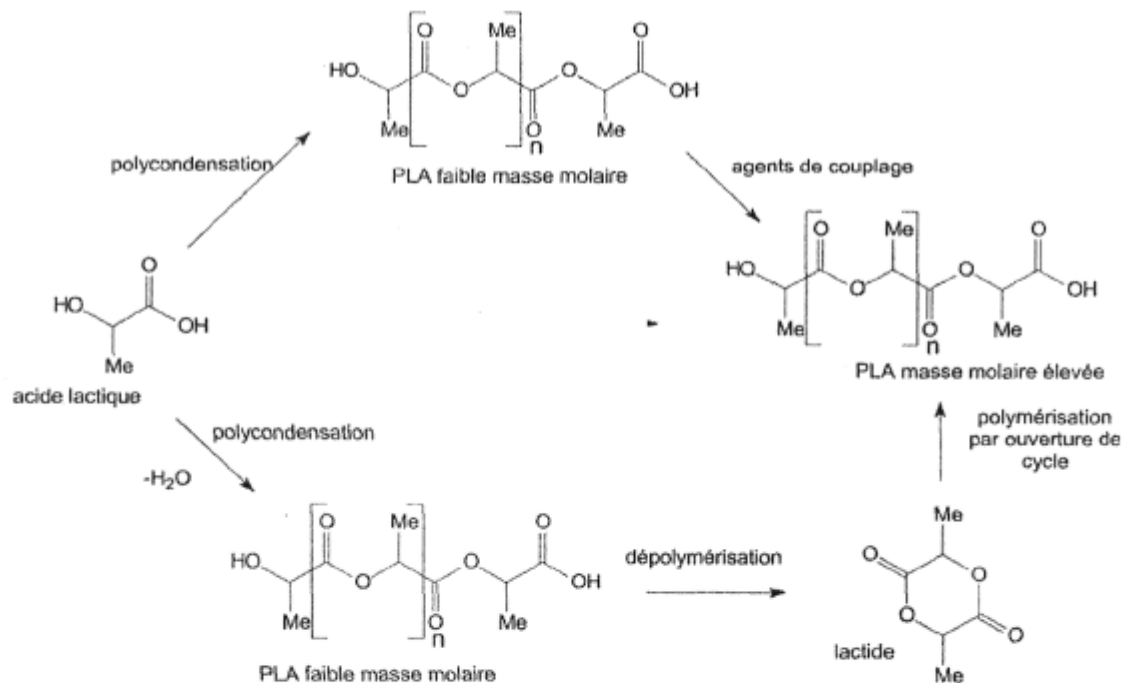
La présence d'un carbone asymétrique, permet à la molécule d'acide lactique d'adopter trois formes optiquement actives : la forme lévogyre (L), la forme dextrogyre (D), et le racémique (D, L). Ces trois formes confèrent à la molécule des propriétés mécaniques distinctes. Le PDLLA possède une structure amorphe (atactique) et un point de transition entre 50 et 60°C (Kulkurani *et coll.*, 1971), alors que le PLLA est plutôt semi-cristallin (isotactique), avec un point de fusion d'environ 180°C mais un point de transition vitreuse entre 50 et 60°C (Kalb *et coll.*, 1980). Le PLLA est soluble dans tous les solvants chlorés

par contre le PDLLA n'est soluble que dans le chloroforme, le dichlorométhane, le tétrahydrofurane et l'acétone avec une solubilité plus élevée que celle du PLLA.

La dégradation «normale» du PLA se fait par une simple hydrolyse à pH neutre, sans intervention d'enzymes. La vitesse de cette dégradation peut s'étendre de quelques mois à quelques années selon la composition du polymère et la taille et l'épaisseur de l'échantillon. Le taux d'hydrolyse dépend bien sûr de la température, de la quantité de monomères résiduels et d'acides présents. La possibilité de contrôler cette vitesse de dégradation présente un grand intérêt dans les domaines biomédical et/ou pharmaceutique (Vert *et coll.*, 1991).

### a- Synthèse

La synthèse du PLA peut se faire selon deux voies principales de polymérisation (Figure 1-3).



**Figure 1-3 :** Voies de synthèse du PLA

Dans la première voie, l'acide lactique est polymérisé par polycondensation, ce qui donne un polymère de faible masse molaire (qui est la plupart du temps inutilisable tel quel), il faut utiliser des agents de couplage en raison de nombreuses réactions secondaires de terminaison dues à la présence d'impuretés, d'eau, à la viscosité du mélange réactionnel et aux réactions de retrocission qui conduisent à la formation de cycles lactides (Ajioka *et coll.*, 1995).

Dans la deuxième voie le polylactide est obtenu par polymérisation par ouverture de cycle d'une dilactone à 6 atomes, le lactide. Compte tenu du contrôle cinétique partiel de la réaction, les valeurs de la masse molaire du polymère sont bien plus élevées que dans la méthode précédente (plus de 100.000g/mol).

#### ***b- Bioérosion***

De manière générale, la dégradation *in vitro* s'effectue en plusieurs étapes distinctes (Gombotz et Pettit, 1995; Göpferich, 1996; Hurrell et Cameron, 2001; Hurrell et Cameron, 2002) : Après pénétration de l'eau dans l'implant PLA, la dégradation dite de type hydrolytique s'active et attaque les chaînes du polymère ce phénomène provoque une diminution de la masse molaire de l'implant jusqu'à un seuil critique où les produits de dégradation sont capables de diffuser vers l'extérieur de l'implant. Ce mécanisme provoque à son tour la diminution de la masse de l'implant et la pénétration de l'eau pour combler les espaces libres.

En milieu acide ou basique, l'hydrolyse de la liaison ester est plus rapide que dans un milieu à pH neutre (Anderson et Shive, 1997; Göpferich, 1996). En milieu basique, la dégradation est plus accélérée. En effet, même si la scission de la liaison ester est catalysée, les acides carboxyliques terminaux sont neutralisés (Anderson et Shive, 1997).

La libération de produits acides de dégradation par les implants de PLA doit être surveillée pour s'assurer de leur biocompatibilité. D'une manière générale, les oligomères et les

monomères de l'acide lactique sont bien tolérés par les tissus et sont finalement éliminés par la voie du cycle de Krebs (Göpferich, 1996; Zange et Kissel, 1997).

*In vivo*, toutes les étapes de dégradation décrites *in vitro* restent valables mais la vitesse pourrait être accrue par les enzymes, les radicaux libres et les changements de pH produits par l'activité des cellules inflammatoires (Ali *et coll.*, 1993a; Therin *et coll.*, 1992; Holy *et coll.*, 1999). Les macrophages et les cellules géantes à l'interface de l'implant produisent des agents acides qui diminuent le pH localement et accélèrent la dégradation (Anderson et Shive, 1997). De plus, il faut mentionner la phagocytose par les macrophages qui accélère aussi la vitesse de dégradation *in vivo* (Anderson et Shive, 1997; Holy *et coll.*, 1999; Prior *et coll.*, 2002). Le PLA induit une réaction inflammatoire bénigne impliquant des cellules géantes en réaction aux corps étrangers. Le nombre et le rôle de ces cellules augmentent en fonction des concentrations croissantes des produits d'hydrolyse, puis diminuent spontanément lorsque le polymère est finalement dégradé.

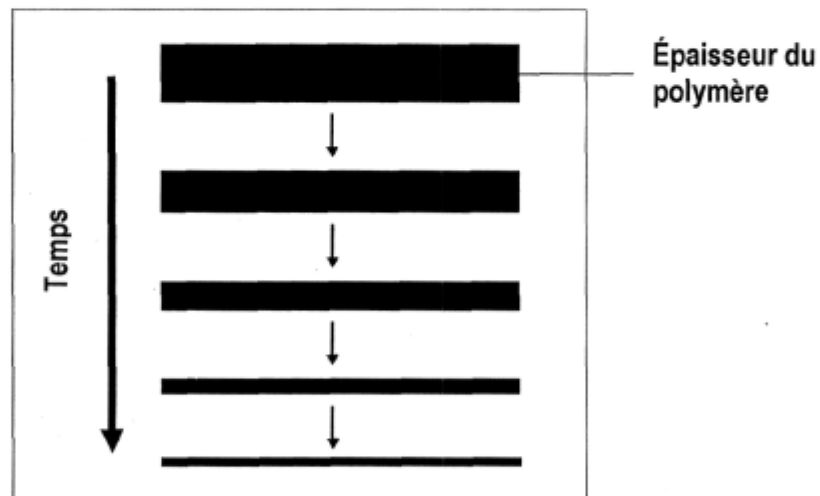
L'acide lactique est oxydé en acide pyruvique par la déshydrogénase lactique (Fiume, 1998). L'acide pyruvique est ensuite transformé, avec formation de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), en acétylcoenzyme A, point de départ de plusieurs voies métaboliques telles que le cycle de Krebs, également producteur de CO<sub>2</sub> et d'eau. Le CO<sub>2</sub> est finalement évacué à l'extérieur de l'organisme par les poumons via la circulation sanguine (Guyton, 1982).

La forme lévogyre (L) de l'acide polylactique (PLLA), utilisée dans notre étude est prédominante dans la nature; elle est métabolisée intracellulairement par simple conversion en pyruvate. Le PLLA est un polymère semi-cristallin hydrophobe résistant à la scission par hydrolyse. La présence de groupes méthyles dans l'acide lactique protège les carbones du groupe carbonyle d'un contact avec les fluides environnants. Plus les chaînes sont ordonnées, plus la protection hydrophobique de -CH<sub>3</sub> est efficace.

### 3.2.3. Dégradation de surface

La dégradation de surface est une dégradation hétérogène où les polymères perdent leur matériel uniquement à partir de leur surface (Göpferich, 1996), ce qui donne à ce type de dégradation un certain avantage si on parle de prévision des caractéristiques du polymère. Ce mode de dégradation de surface est très souhaitable pour le développement de système à libération contrôlée (Peppas et Langer, 1994; Pulapura et Kohn, 1992), permettant ainsi la régulation de la vitesse de dégradation du dispositif. La vitesse de libération du principe actif fixée au polymère dépend de la dégradation de ce dernier (Göpferich, 1996; Langer, 1990).

Du fait que la dégradation se fait uniquement en surface, l'implant à libération contrôlée, peut se dégrader en gardant sa forme géométrique, alors il devient de plus en plus petit avec le temps sans se fragmenter en petits morceaux (Figure 1-4) (Langer, 1990a).



**Figure 1-4 :** Représentation schématique d'un implant soumis à une dégradation de surface.

Finalement, il faut ajouter l'intervention des cellules du système immunitaire *in vivo*, où la dégradation de surface peut se faire même si le matériau semblait inerte. Il s'agit d'un

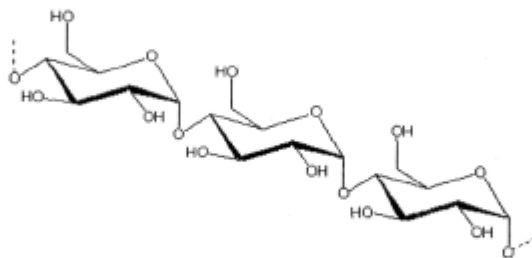
mécanisme de dégradation par réaction enzymatique active (Göpferich, 1996). Parmi les polymères pouvant subir une dégradation hydrolytique de surface il y a les céramiques biodégradables (Remes et Williams, 1992), les polyorthoesters et les polyanhydrides (Peppas et Langer, 1994; Pulapura et Kohn, 1992).

#### 4. Origine et classification des polymères biodégradables

Les polymères biodégradables peuvent être divisés en trois familles distinctes: les polymères naturels, les polymères synthétiques et les polymères composites provenant de mélanges des polymères des deux autres familles.

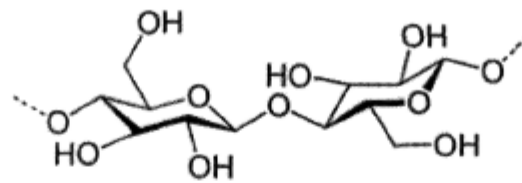
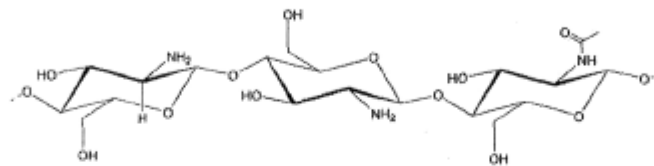
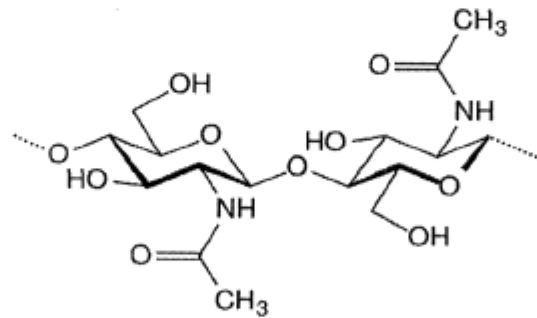
##### 4.1. Polymères naturels

Les polymères naturels sont formés, dans la nature, au cours des cycles de croissance de tous les organismes, leur synthèse est généralement catalysée par une enzyme (Chandra *et coll.*, 1998). Parmi les polymères naturels, il y a la famille des polysaccharides. La cellulose et l'amidon sont deux polymères formés par la répétition de la même unité glucopyranose, mais dans une conformation différente. Par contre, l'hydrolyse des liaisons entre les unités monomères est assurée par différentes enzymes pour les différents polymères. De même que pour tous les polysaccharides, il est possible de greffer des groupements afin d'ajuster leur vitesse de dégradation (Chandra *et coll.*, 1998). La figure 1-5 montre quelques exemples de structure de polysaccharides.



**Amylose**



**Cellulose****Chitosane****Chitine****Figure 1-5 :** Structure de différents polysaccharides

Dans la nature on peut trouver de l'amidon dans la pomme de terre, le maïs, le blé ou le riz; il est formé principalement d'amylose, polymère linéaire et cristallin et de l'amylopectine, polymère ramifié et amorphe. Selon la proportion d'amylose et d'amylopectine, les matériaux obtenus à partir de l'amidon auront des propriétés mécaniques et de

biodégradabilité différentes (Fredriksson *et coll.*, 1998; Ratnayake *et coll.*, 2001). La biodégradation de l'amidon est assurée par l'amylase et la glucosidase (Chandra *et coll.*, 1998; Yukata *et coll.*, 1990). Les produits résultants de cette dégradation ne sont pas toxiques, ce qui donne à ce polymère naturel de fortes potentialités pour être utilisé comme matériau biodégradable. L'amidon est généralement utilisé sous forme thermoplastique. Pour cela, l'amidon natif est mélangé à l'eau et à un plastifiant, généralement le glycérol, et subit de fortes températures et pressions. Suivant les conditions, on peut obtenir un matériau de l'état vitreux à caoutchoutique (Averous *et coll.*, 2001).

La cellulose, principal constituant des parois cellulaires végétales, est un polymère linéaire très long formé par la répétition d'une seule unité monomère. Elle est donc particulièrement cristalline et insoluble dans tous les solvants. La biodégradation de la cellulose procède par oxydation. Une des enzymes nécessaire à sa dégradation est la peroxydase.

La chitine est une macromolécule que l'on trouve dans les coquilles de crustacés et d'insectes. Elle peut être dégradée par la chitinase. Une des applications potentielles de la chitine est la fabrication de la peau artificielle ou de fils de sutures absorbables. La chitine et la chitosane sont biocompatibles.

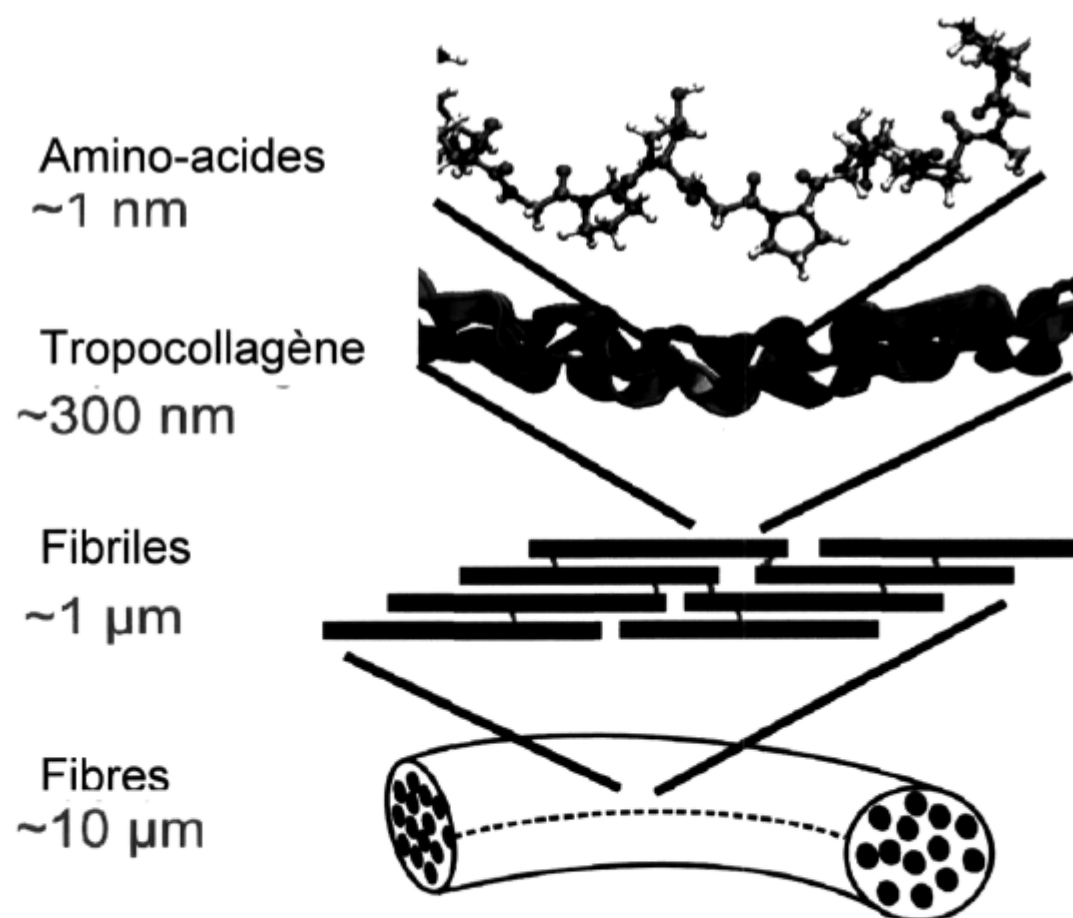
D'autres polymères naturels peuvent être utilisés pour produire des matériaux biodégradables comme les protéines (la gélatine, la caséine, la soie et la laine). Les protéines sont des copolymères constitués d'arrangements réguliers de différents acides  $\alpha$ -aminés. Elles ne sont, généralement, pas solubles et elles sont alors utilisées à l'état natif. La gélatine, en revanche, est soluble dans l'eau et trouve de nombreuses applications industrielles, pharmaceutiques et biomédicales. La biosynthèse des protéines est un processus complexe qui fait intervenir différentes enzymes. En revanche, la biodégradation des protéines est beaucoup plus simple: les protéases hydrolysent la fonction amide (Chandra *et coll.*, 1998).

Le collagène est la protéine la plus abondante et omniprésente dans le corps humain

(Figure 1-6), ses fonctions allant de la biomécanique au service des fonctions essentielles de l'os, de la peau, des tendons et des ligaments (Nimni et Harkness, 1988).

Le collagène est l'un des matériaux les plus populaires utilisés pour le développement d'implants médicaux résorbables. Le collagène est à la base de plusieurs modèles développés pour la régénération de la peau (Yannas et Burke, 1981), des nerfs périphériques (Li et *coll.*, 1990), du tissu oral (Altman et Li, 1990), du ménisque articulaire (Stone et *coll.*, 1997) et des tissus vasculaires (Amadori et *coll.*, 2007).

Une variété d'autres modèles à base de collagène sont en cours d'élaboration pour la régénération et la réparation des tissus. (Goldstein et *coll.*, 1989; Ma et *coll.*, 1990).

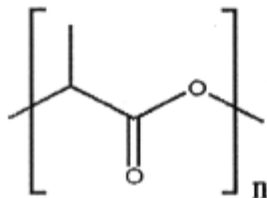


**Figure 1-6** : La conception hiérarchique du collagène (M.J. Buehler, 2006).

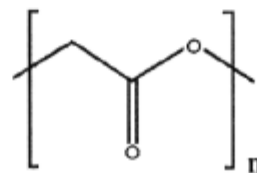
#### 4.2. Polymères synthétiques

Les polymères synthétiques, issus de la pétrochimie, comme les polyoléfines, ne sont pas biodégradables. En revanche, les polymères renfermant des liaisons hydrolysables, comme les esters ou les amides, sont susceptibles d'être biodégradables dans certaines conditions.

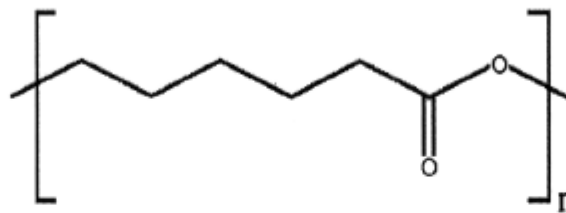
Les premières recherches, concernant les polyesters, ont porté sur les polyesters aliphatiques comme les poly(acide glycolique), les poly(acide lactique) et le polycaprolactone (Figure 1-7), ainsi que sur leurs mélanges. Ils trouvent principalement leurs applications dans le domaine médical (Vert *et coll.*, 1997).



**Poly(acide glycolique) PGA**



**Poly(acide lactique) PLA**



**Polycaprolactone PCL**

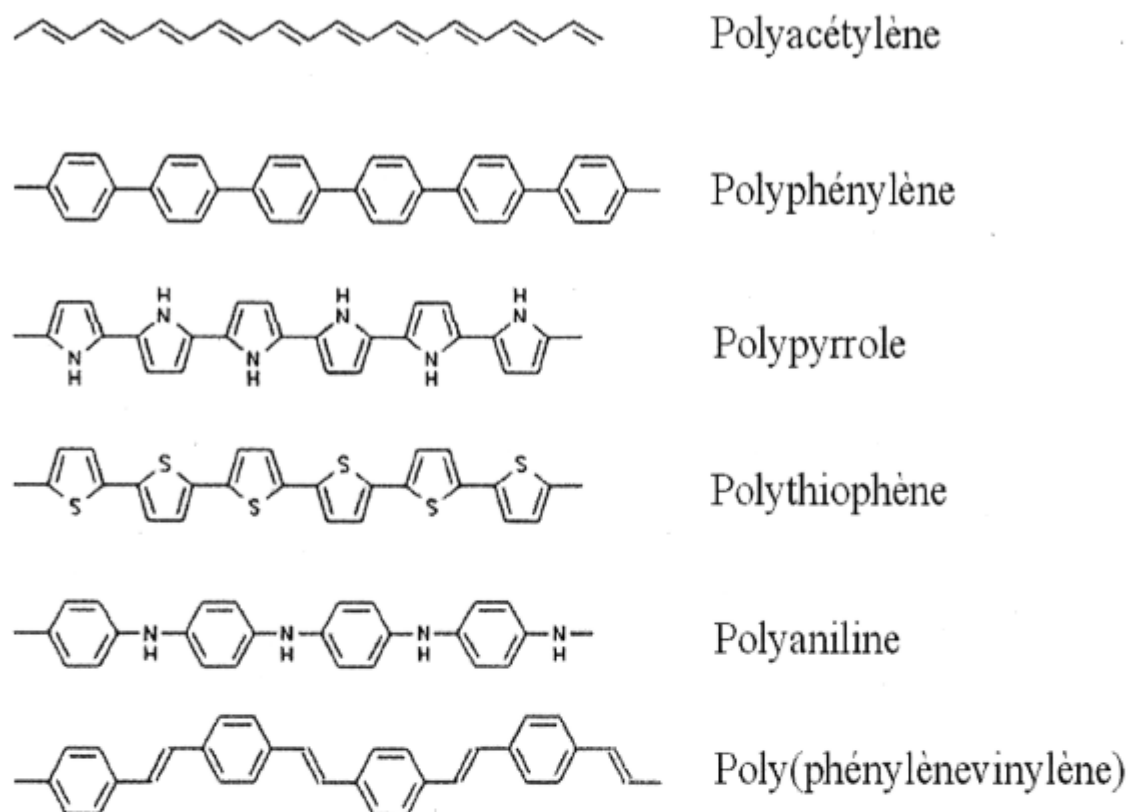
**Figure 1-7 :** Structure de quelques polyesters aliphatiques biodégradables

### 4.3. Polymères composites

Des matériaux composites biodégradables sont fabriqués à partir de polymères synthétiques biodégradables et de produits naturels comme l'amidon. D'autres matériaux composites sont formés de polymères biodégradables et de polymères non biodégradables. Ce type de polymères a été développé dans notre laboratoire avec succès en mélangeant du poly(L-lactique acide) et du polypyrrole pour former des membranes jouant le rôle de support pour culture cellulaire (Shi *et coll.*, 2004) . Le polypyrrole est un polymère électriquement conducteur, ce qui confère une caractéristique supplémentaire à ce type de biomatériau, qui est néanmoins, la stimulation des cellules cultivées par des stimuli électriques. La biocompatibilité du matériau a été testée avec succès (Wang *et coll.*, 2004). La présence de poly(L-lactique) acide majoritaire, permet une biodégradation souhaitable du composite pour des applications en régénération tissulaire.

### 5. Polymères conducteurs

Vers la fin des années 1970, trois scientifiques (Heeger, MacDiarmid et Shirakawa, Prix Nobel de Chimie en 2000) ont découvert qu'un polymère, le polyacétylène, pouvait être rendu conducteur presque comme un métal : les films de polyacétylène devenaient  $10^9$  fois plus conducteurs après une exposition à des vapeurs d'iode, de chlore ou de brome (Shirakawa *et coll.*, 1977). Cette découverte a attiré l'attention de nombreux autres scientifiques sur le polyacétylène, puis progressivement sur la polyaniline, le polypyrrole et les polythiophènes, qui présentent l'avantage d'être chimiquement plus stables que le polyacétylène au contact de l'air. Ils constituent aujourd'hui les polymères conducteurs les plus étudiés (Figure1-8).



**Figure 1-8 :** Structure chimique de quelques polymères conducteurs (Roth 1995).

La conductivité de ces polymères est due à la présence de liaisons doubles conjuguées (c'est-à-dire qu'il y a une succession de liaisons simples et doubles) le long du squelette du polymère. Chaque liaison contient ainsi une liaison  $\sigma$ , et chaque double liaison contient une liaison  $\pi$ , plus faible. Toutefois, cette structure conjuguée n'est pas suffisante pour rendre un polymère conducteur, il est aussi nécessaire d'introduire des porteurs de charge sous la forme d'électrons ou de trous au sein du matériau. C'est ce que permet de faire le dopage, qui consiste en une réaction d'oxydation ou de réduction chimique.

### 5. 1. Rappels sur la conductivité

Commençons par rappeler la loi empirique à la base de tout ce qui va suivre : la loi d'Ohm :  $U$ , la tension aux bornes d'un conducteur ohmique est égale au produit de sa résistance  $R$  par l'intensité  $I$  du courant qui le traverse :  $U = RI$ .

La plupart des matériaux suivent cette loi pour des tensions relativement faibles. À des tensions élevées, les semi-conducteurs et les chaînes unidimensionnelles de polymères ont un comportement qui dévie par rapport à la loi d'Ohm. Dans les matériaux ohmiques, la résistance est proportionnelle à la longueur de l'échantillon considéré, et inversement proportionnelle à sa section utile. On a donc

$R = \rho l/A$  où  $\rho$  est la résistivité,  $l$  est la longueur de l'échantillon et  $A$  sa section transversale.

L'inverse de la résistivité est la conductivité,  $\sigma$ , qui se mesure en  $\Omega^{-1}.m^{-1}$  ou  $S.m^{-1}$ . La conductivité dépend de la densité de porteurs de charge et de leur mobilité dans le matériau considéré. Dans les métaux, les porteurs de charge à considérer sont les électrons. Dans les semi-conducteurs, il faut également considérer les trous, porteurs de charges positives. La conductivité varie également en fonction de la température: pour des métaux, elle diminue lorsqu'on augmente la température, tandis que le comportement inverse est observé pour des semi-conducteurs ou des isolants.

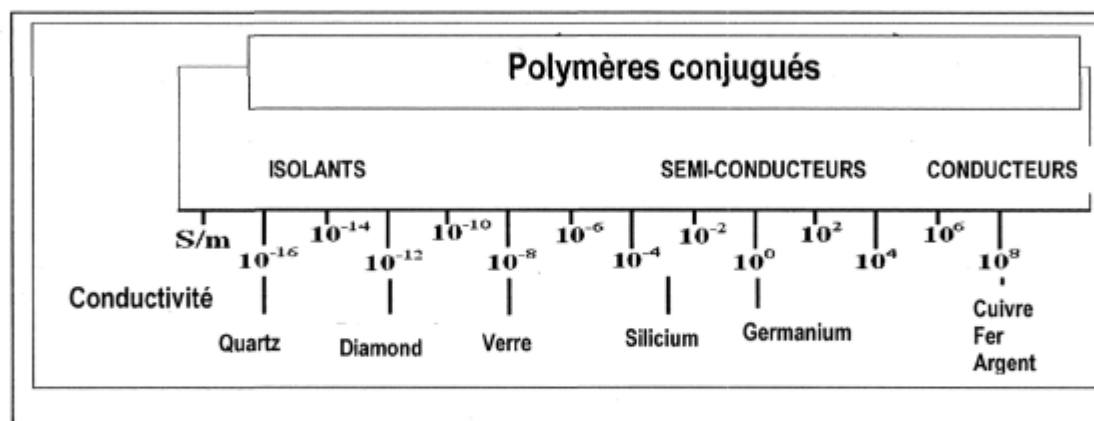


Figure 1-9 : Ordre de grandeur de la conductivité de différents matériaux.

On considère généralement qu'un matériau est conducteur lorsque  $\sigma > 10^5$  S/m, isolant lorsque  $\sigma < 10^{-7}$  S/m et semi-conducteur lorsque sa conductivité est comprise entre ces deux valeurs. Ces valeurs peuvent différer selon les ouvrages consultés. Les polymères dits "conducteurs" sont généralement des semi-conducteurs (Figure 1-9).

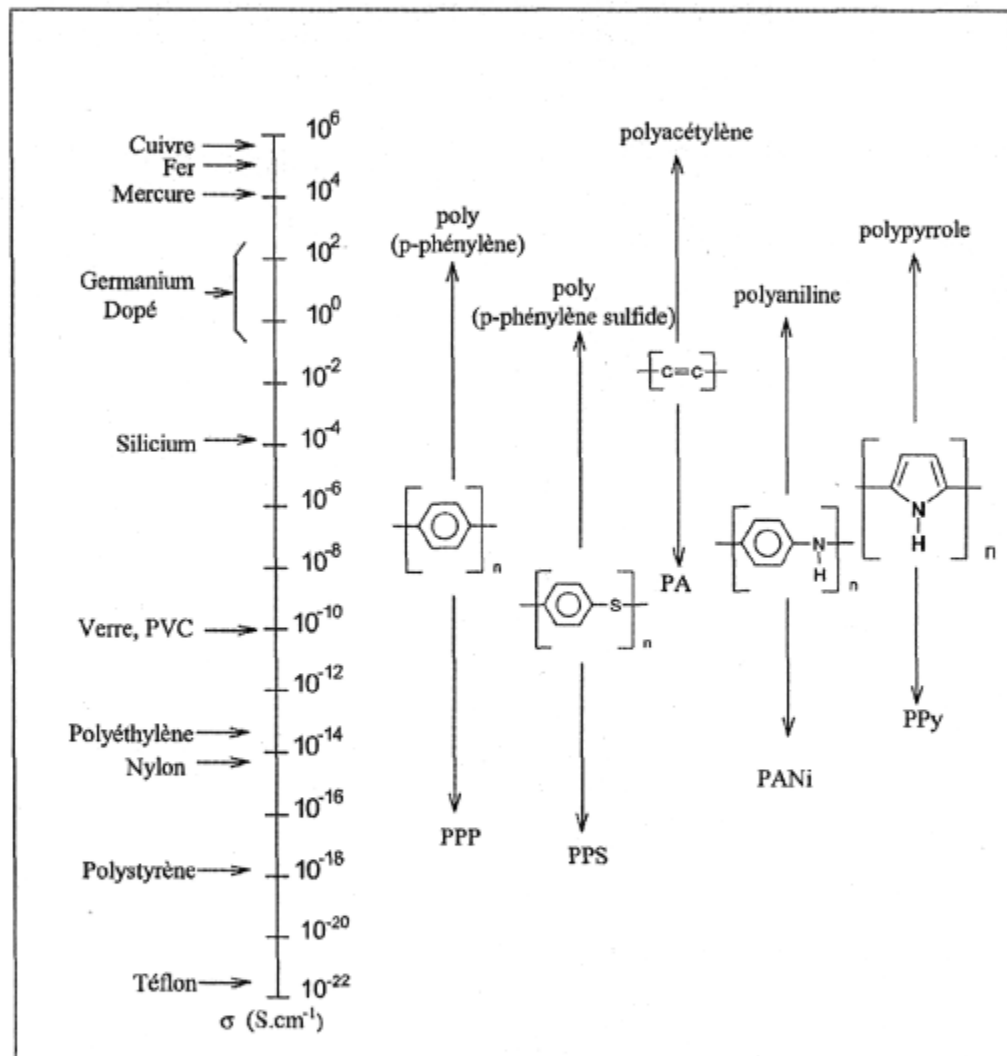
## 5.2. Les polymères conducteurs

Depuis quelques années, les polymères conducteurs ont démontré qu'ils peuvent être d'excellents candidats pour les nouvelles technologies. Ainsi, ils combinent à la fois les excellentes propriétés électriques et optiques des métaux ou des composés inorganiques à celles généralement associées aux polymères, telles qu'une faible densité, une mise en œuvre facile ainsi qu'une versatilité dans leur synthèse. En effet, depuis la découverte du premier polymère conducteur (le polyacétylène) en 1961 par Hatamo *et coll.*, on ne cesse de découvrir de nouveaux polymères qui possèdent des propriétés similaires tels que, les poly(paraphénylène)s (Ivory *et coll.*, 1979), les polypyrrole (Diaz *et coll.*, 1979) et les polyanilines (Dall'Olio *et coll.*, 1968).

L'alternance de liaisons simples et doubles confère à ce type de polymères une grande rigidité rendant la plupart de ces matériaux infusibles et pratiquement insolubles dans les solvants organiques usuels. Toutefois, l'introduction de groupements latéraux flexibles, comme les chaînes alkyles (Leclerc *et coll.*, 1999) et les chaînes oxyéthylènes (Lévesque *et coll.*, 1996) ou encore l'incorporation de fonctions polaires comme les sulfonates (Leclerc *et coll.*, 1999) ou les ammoniums quaternaires (Balanda *et coll.*, 1999), ont permis de contrer ce problème en améliorant les interactions polymère-solvant, rendant ainsi ces polymères solubles et facilitant, de part le fait même, leur mise en œuvre. Pouvant maintenant manipuler ces polymères avec aisance, il n'est pas étonnant de rencontrer ces matériaux dans de nombreux dispositifs comme par exemple, les transistors organiques, les piles rechargeables (Diaz *et coll.*, 1995), les fenêtres électrochromes (Duck *et coll.*, 1992), les revêtements antistatiques (Nalwa *et coll.*, 1997), les diodes électroluminescentes (Burroughes *et al.*, 1990), les blindages électromagnétiques (Kaynak *et coll.*, 1994; Siehel *et coll.*, 1982), les catalyseurs (Audebert *et coll.*, 1986; Bidan *et coll.*, 1984).



Les polymères conducteurs comportent plusieurs niveaux d'oxydation dotés d'une conductivité électrique allant progressivement de  $10^{-17}$  S/cm à plus de  $10^5$  S/cm (figure 1-10).



**Figure 1-10 :** Conductivités électriques de polymères conducteurs comparées à celles de polymères isolants et de quelques conducteurs non polymères.

### 5.3. Le polypyrrole (PPy)

Parmi tous les polymères conducteurs connus, le polypyrrole est le plus étudié grâce aux multiples applications dues à la stabilité de sa conductivité et de sa capacité de former des homopolymères ou des composites avec des propriétés mécaniques optimales (Rodriguez *et coll.*, 1997).

#### 5.3.1. Synthèse du polypyrrole

La synthèse du polypyrrole à partir du pyrrole se fait par polymérisation de ce dernier, qui peut se faire chimiquement ou électrochimiquement. La méthode chimique donne l'avantage et la possibilité d'une production de masse à des coûts très faibles, contrairement aux méthodes électrochimiques (Reynolds *et coll.*, 1987). Par contre, les méthodes électrochimiques produisent des matériaux dotés d'une meilleure conductivité. Pour les applications concernant la fabrication d'appareils électroniques, elles offrent la possibilité d'une polymérisation *in situ* (Rodriguez *et coll.*, 1997a).

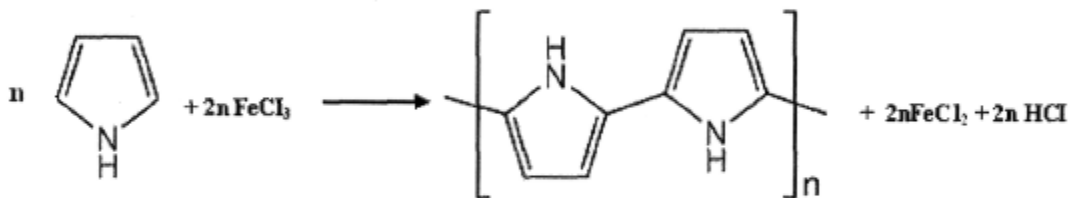
##### 5.3.1.1. Synthèse chimique du polypyrrole

Le pyrrole a été polymérisé pour la première fois en 1916 (Angeli, Angeli et Alessandri) par oxydation du pyrrole avec le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) ce qui permet d'obtenir un produit amorphe sous forme de poudre, appelé noir de pyrrole, qui s'est révélé insoluble dans les solvants organiques. La plupart des noirs de pyrrole furent préparés en présence de réactifs oxydants les plus variés tels que le dioxyde de plomb, le peroxyde d'hydrogène en solution acétique, le chlorure ferrique, l'acide nitrique, les quinones ou l'ozone. La méthode chimique, à l'aide d'acide ou de peroxyde a permis d'obtenir des matériaux isolants plutôt oxydes (Gardini 1973, Nalwa *et coll.*, 1985) en raison de la saturation des cycles de pyrrole. Ces polymères initialement isolants peuvent être dopés par des accepteurs d'échelons halogènes, tels que le brome et l'iode, pour obtenir une conductivité stable de l'ordre de  $10^{-5}$  S/cm (Salmon *et coll.*, 1982).

### a) Polymérisation

On peut obtenir du polypyrrole par simple mélange de deux solutions aqueuses concentrées de pyrrole et de chlorure ferrique, qui donne après quelques minutes une poudre noire caractéristique du polypyrrole : la polymérisation et l'oxydation sont simultanées, le polymère obtenu est directement dans une forme dopée.

Plusieurs méthodes et techniques d'analyse ont été utilisées pour déterminer les mécanismes «complexes» de polymérisation du pyrrole (Kazuyoschi *et coll.*, 1989), toutefois on peut en donner un schéma simplifié correspondant à la réaction de polymérisation du pyrrole en présence de  $\text{FeCl}_3$  (figure1-11) :



**Figure 1-11** : Réaction de polymérisation simplifiée du pyrrole par voie chimique (François 1993)

La présence d'électrons  $\pi$  conjugués confère aux polymères conducteurs intrinsèques la propriété d'être électriquement conducteurs, cette capacité de conduire le courant électrique résulte en la mobilité de porteurs de charges. Ces porteurs de type polarons et/ou bipolarons (Groupement français des polymères G.F.P., 1992), sont présents en nombre beaucoup plus important que dans le cas des semi-conducteurs (Aldissi, 1989); ils portent des charges positives compensées par des anions, appelés dopants (ou contre-ions), insérés dans le polymère.

## **b) Optimisation de la réaction de polymérisation**

Plusieurs études ont été menées afin d'améliorer les propriétés des produits obtenus (rendement, stabilité, conductivité, morphologie) soit par changement de l'oxydant, le rapport oxydant/pyrrole, le dopant, le solvant, le temps de réaction ou la température...

### **b-1. Choix de l'amorceur**

Certains oxydants non métalliques ont été utilisés comme amorceur tels que l'eau oxygénée et l'ozone. Mais les polymères obtenus contiennent de l'oxygène et des cycles saturés de dérivés de pyrrolidine ne sont pas bons conducteurs électroniques (Machida *et coll.*, 1989).

Il est préférable de choisir un métal de transition comme amorceur (un oxydant). Les composés à métaux de transition les plus utilisés sont à base de fer(III), tel que  $\text{FeCl}_3$  ou  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ , de cuivre(II), tels que  $\text{CuBr}_2$  ou  $\text{CuCl}_2$ . En pratique,  $\text{Fe}^{3+}$  est principalement utilisé sous la forme  $\text{FeCl}_3$  qui n'induit pas de réaction secondaire et dont la forme réduite  $\text{Fe}^{2+}$  est facilement éliminable du polymère (Planche, 1994).

Le potentiel d'oxydation du milieu  $\text{FeCl}_3$  peut être contrôlé par ajout de  $\text{FeCl}_2$ . On peut ainsi observer une conductivité maximale pour un potentiel d'oxydation proche de 500mV durant la polymérisation (Machida *et coll.*, 1989). Sans ajout de  $\text{FeCl}_2$  le potentiel d'oxydation est très élevé au départ puis diminue au cours de la polymérisation. En absence de  $\text{FeCl}_2$  la conductivité est réduite (Machida *et coll.*, 1989).

### **b-2. Rapport oxydant/pyrrole**

Les auteurs utilisent en général un rapport oxydant/pyrrole de 2.2 à 2.4, correspondant à 2 molécules d'oxydant par cycle de pyrrole pour permettre la polymérisation. Meyers et ses collaborateurs montraient que le rendement croît linéairement pour des rapports de 0 à 2 avant de se stabiliser pour des rapports supérieurs (Myers *et coll.*, 1986).

### **b-3. Le dopant**

Dans le cas du polypyrrole le dopant peut être soit le contre-ion (Cl<sup>-</sup>) du sel métallique (Armes, 1987; Walker *et coll.*, 1987) soit un anion plus encombrant comme le dodécylbenzènesulfonate (DBS) (Armes, 1987), voire un polymère comme le poly(styrène sulfonique) (Ohtani *et coll.*, 1989). Pour un même oxydant, la conductivité du pyrrole varie selon le dopant utilisé.

Le choix du dopant est également important pour les propriétés de vieillissement du polymère obtenu (au sens de la diminution de conductivité dans le temps). Quelques dopants minéraux conduisent à des polymères de bonnes conductivités, mais vieillissent vite (Diaz *et coll.*, 1983). Les polypyrroles dopés avec des produits organiques sont en général plus stables, notamment ceux dopés avec des ions arylsulfonates (Samuelson *et coll.*, 1986; Munstedt, 1988; Wang *et coll.*, 1991). Une conductivité stable est obtenue lorsque l'on utilise des dopants qui migrent peu, c'est à dire avec un fort encombrement stérique.

Lorsque deux dopants potentiels sont présents dans le milieu réactionnel (un sulfonate aromatique et un anion minéral), une incorporation sélective du dopant organique se produit (Hyodo *et coll.*, 1990). Pour ces raisons, les dopants de type naphtalène sulfonate sont couramment employés maintenant, privilégiant la stabilité au dépens de la conductivité.

### **b-4. Choix du solvant**

Le solvant idéal est celui dans lequel l'oxydant, le monomère et l'éventuel stabilisant sont solubles et qui permet d'obtenir un polymère de bonne qualité. L'eau, les alcools, l'éther ou des mélanges de ces derniers (Mandal *et coll.*, 1995) ont été utilisés. De manière générale, les solvants protiques conduisent à des polymères présentant une meilleure conductivité.

### **b-5. Durée de polymérisation**

La plupart des auteurs choisissent des temps de polymérisation compris entre 20 min et 60 min, ce qui favorise la conductivité au dépend du rendement. Rapi *et coll.*, (1988) ont expliqué ceci par la copolymérisation d'un produit secondaire, la 2,5-bis(2-pyrrolyl)pyrrolidine, apparaissant en milieu acide. Ce monomère engendre une diminution de la longueur de conjugaison dans les chaînes de polypyrrole, et donc une décroissance de la conductivité.

D'autres travaux (Machida *et coll.*, 1989) ont montré, par analyse élémentaire, que le taux de dopant diminue lui aussi avec le temps de polymérisation, les dérivés de pyrrolidine ne pouvant être dopés. La durée de polymérisation doit cependant être en accord avec la cinétique de polymérisation; la polymérisation est généralement terminée au bout de 24 h.

### **b-6. Vitesse d'agitation**

L'influence de la vitesse d'agitation n'a pas été étudiée de manière systématique (Planche, 1994); on trouve des travaux effectués sous forte ou faible agitation, voire sans agitation du tout. Il semble important d'agiter le milieu afin de garder un milieu homogène durant la polymérisation.

### **b-7. Rendement de réaction**

Les rendements de réaction de polymérisation sont variables, ils dépendent de la géométrie du réacteur (Planche, 1994)... Cette discordance de résultats a été interprétée comme due à l'évaporation de pyrrole lors de la réaction de polymérisation (Planche, 1994a). La température d'ébullition du pyrrole étant de 130°C, ces mêmes auteurs ont suggéré la formation d'un azéotrope entre le pyrrole et l'eau. Il est donc préférable d'effectuer les polymérisations en réacteur fermé.

Notons finalement que la température de polymérisation influe aussi sur la réaction de polymérisation. Dans l'eau on peut travailler à température ambiante ou à une température comprise entre 0 et 5°C, ce qui conduit à des polymères possédant de meilleures caractéristiques (Myers, 1986; Liang *et coll.*, 1992).

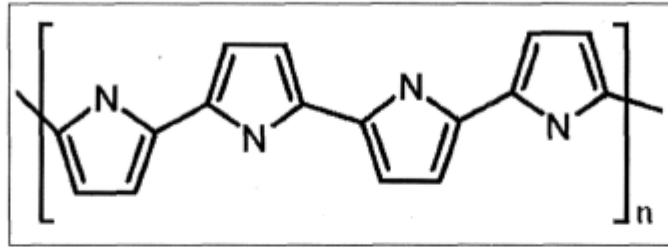
#### 5.3.1.2. Synthèse électrochimique du polypyrrole

L'oxydation électrochimique du pyrrole est largement utilisée pour former un film mince uniforme de polypyrrole. La solution d'électrolyse contient simplement le monomère et un sel et/ou un acide servant d'électrolyte support. La couche mince croît à la surface de l'électrode dans son état conducteur, ce qui permet le transfert de charge nécessaire à la poursuite du processus de croissance. Des épaisseurs de plusieurs millimètres peuvent être obtenues par des techniques galvanostatique, potentiostatique ou potentiodynamique (Heinze, 1990).

L'électropolymérisation donne l'avantage de former des films PPy d'une forte conductivité, la possibilité de greffage direct du PPy sur un substrat conducteur et la réalisation d'une première caractérisation *in situ* du polymère. Les films de PPy préparés par une méthode électrochimique sont extrêmement souples et stables aussi bien dans l'air et dans l'eau.

En revanche, l'électropolymérisation anodique est considérablement affectée par de nombreux facteurs tels que la nature et la composition de l'électrolyte, la taille et la forme des électrodes, la géométrie de la cellule de réaction. Il est difficile d'établir une relation claire entre les conditions de synthèse et les propriétés du PPy obtenu. De plus la polymérisation *in situ* est limitée par la taille des électrodes ce qui présente un inconvénient pour une production de masse (Rodriguez *et coll.*, 1997).

#### **5.3.2. Structure chimique du polypyrrole**



**Figure 1-12 :** Structure du polypyrrole

Le polypyrrole est formé d'unités de pyrrole couplées aux positions 2 et 5 (Figure 1-12), cette structure fournit un degré maximal de conjugaison et par conséquent la conductivité la plus élevée. Cependant, il existe des unités de pyrrole liées aux positions 2 et 3, ce qui introduit des défauts dans l'architecture de la chaîne linéaire et hypothétique du polymère, défauts qui réduisent la longueur des chaînes latérales et, donc la conductivité du polymère. Les unités de pyrrole peuvent se regrouper de façon désordonnée parce que l'oxydation initiale des monomères de pyrrole produit des cations radicalaires qui sont très réactifs. Bien que les liaisons 2,5 soient théoriquement favorisées, les liaisons 2,3, qui sont moins souhaitables, ne requièrent pas beaucoup plus d'énergie.

### **5.3.3. Applications des polypyrroles**

Le polypyrrole a trouvé son application dans différents champs industriels grâce à sa stabilité typique, sa synthèse simple et non coûteuse, sa capacité de se combiner à des substrats variés et sa conductivité relativement élevée. Le polypyrrole a été utilisé dans la fabrication et le développement des biosenseurs (Cosnier *et coll.*, 1992; Kajiya *et coll.*, 1987), des piles rechargeables (Bittihm *et coll.*, 1987; Memillod *et coll.*, 1986), des films d'emballage antistatiques (Stanke *et coll.*, 1993; Bhat *et coll.*, 1994), des écrans électromagnétiques (Kaynak *et coll.*, 1994; Sichel, 1982), des textiles et des tissus conducteurs (Gregory *et coll.*, 1989; Kudoh 1993), le plaquage électrique (Beator *et coll.*, 1992), et les catalyseurs (Bidan *et coll.*, 1984; Mao *et coll.*, 1989), de plus le polypyrrole trouve d'importants potentiels pour des applications dans les domaines de la médecine et spécialement dans la fabrication de biomatériaux électriquement conducteurs, représentant ainsi un substrat pour la culture cellulaire avec lequel on a la possibilité de moduler les



activités cellulaires par stimulation électrique.

Plusieurs études utilisent le polypyrrole comme substrat pour la culture cellulaire couplé avec une stimulation électrique stimulant ainsi le développement des neurites de cellules PC-12 (Schmidt *et coll.*, 1997). Afin d'améliorer les propriétés physico-chimiques du polypyrrole et d'améliorer son potentiel pour des applications en génie tissulaire, de l'acide hyaluronique (Collier *et coll.*, 2000) ou de l'héparine (Garner *et coll.*, 1999; Meng *et coll.*, 2008) ont été incorporés au PPy.

D'autres études ont été réalisées sur des tissus de polyester recouverts de polypyrrole et démontrèrent les mêmes résultats avec des tissus de polyester non recouverts (Zhang *et coll.*, 2000). De plus, le polypyrrole a été mélangé avec un polymère biodégradable pour former des membranes à la fois électriquement conductrices et biodégradables supportant la culture cellulaire de fibroblastes (Shi *et coll.*, 2004) et de cellules neurales (PC-12) (Zhang *et coll.*, 2007) et modulant l'activité cellulaire à la suite d'un stimulus électrique (Shi *et coll.*, 2007). Les tests de biocompatibilité et de dégradation *in vivo* démontrèrent la non toxicité des implants et une biodégradation similaire à celle d'implants à base de poly(D,L-lactide) (PDLLA) (Wang *et coll.*, 2004).

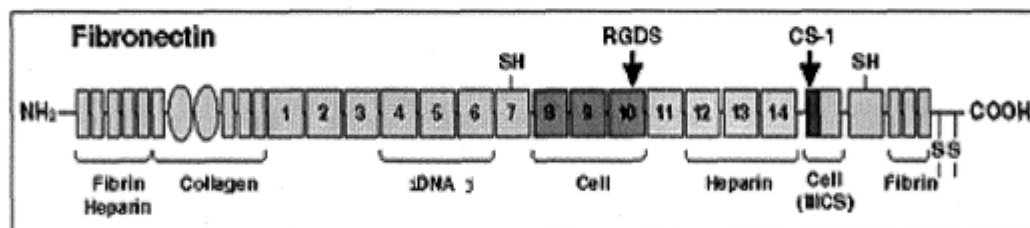
## **6. La fibronectine**

La matrice extracellulaire est constituée d'un réseau complexe de glycoprotéines et d'autres carbohydrates (Aplin *et coll.*, 1982), qui permet le maintien des tissus et joue le rôle de support pour les cellules qui les constituent. La matrice extracellulaire est principalement constituée de collagène, de protéoglycans, d'élastine, d'acide hyaluronique et de protéines d'adhésion. Ces protéines d'adhésion sont d'une importance majeure dans l'adhésion, la croissance, la prolifération et l'expression du phénotype de nombreux types cellulaires tel que les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales.

La fibronectine (FN) est une glycoprotéine dimérique de 450 à 500 kDa présente chez tous les vertébrés. Elle est impliquée dans de très nombreux processus physiologiques comme l'embryogenèse, la cicatrisation, et la coagulation. La FN peut être trouvée sous forme soluble, circulant dans le sang à une concentration de 300 à 400 mg/L, ayant une affinité pour la fibrine et les plaquettes. La fibronectine peut également être incorporée sous forme fibrillaire au sein des matrices extracellulaires, des tissus conjonctifs, des membranes basales et des cellules en culture jouant un rôle important dans l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire (Peters *et coll.*, 1990).

### 6.1. Structure modulaire et domaines d'affinités

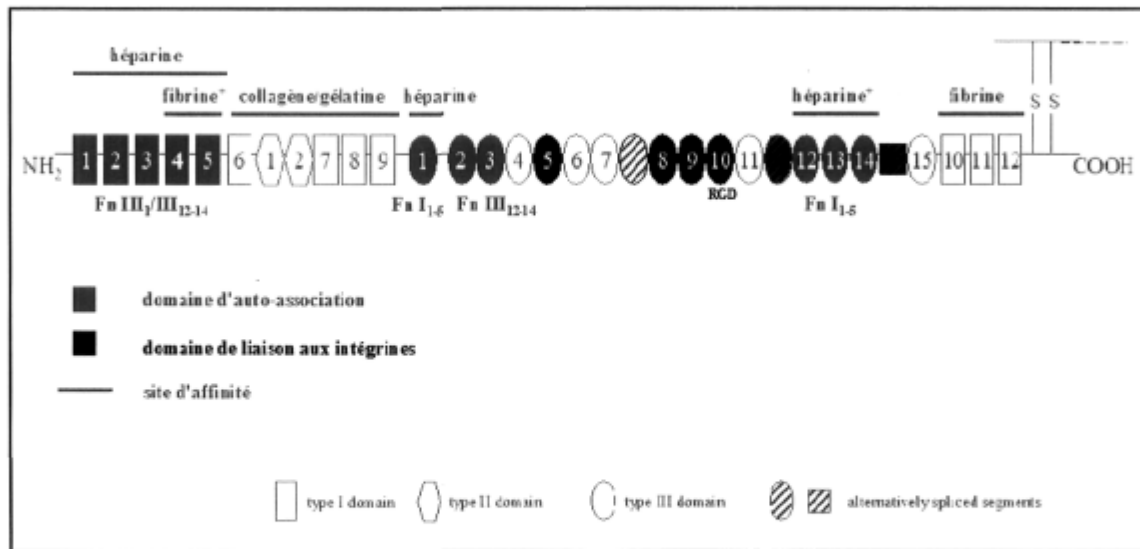
La FN est constituée de deux chaînes polypeptidiques d'une masse moléculaire de 220 kDa, reliées en leur extrémité C-terminale par deux ponts disulfures. Chaque chaîne est formée de modules de type I, II et III (figure 1-13).



**Figure 1-13 :** Les modules de la fibronectine. (Takara Bio.USA. Inc)

La combinaison de modules de type I, II et III est représentée pour un seul des deux brins du dimère. A l'intérieur d'un type, chaque module est identifié par un numéro correspondant à sa position dans le monomère, en partant de l'extrémité N-terminale.

La structure modulaire de la fibronectine lui confère une affinité pour de très nombreux ligands de la matrice extracellulaire (figure 1-14) (Ruoslahti *et coll.*, 1982; Hahn et Yamada, 1979).

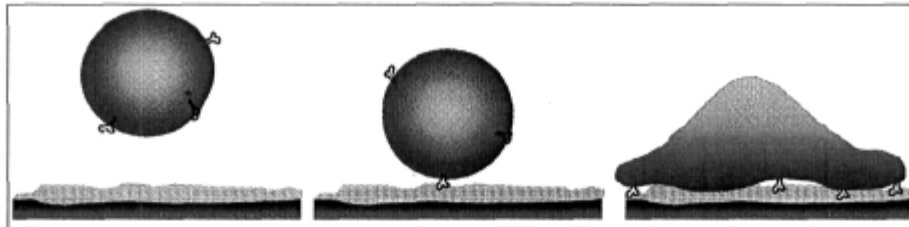


**Figure 1-14 :** Principaux ligands de la fibronectine.

## 6.2. Fonctions de la fibronectine

### 6.2.1. Adhérence

La fibronectine favorise l'adhésion des cellules à leur substrat par l'intermédiaire des intégrines et principalement par l'hétérodimère  $\alpha_5\beta_1$  (figure 1-15). L'étalement de patches de fibronectine sur une surface non adhésive dirige l'adhérence de cellules endothéliales sur ces patches, indépendamment de la topologie du substrat (Mrksich *et coll.*, 1996). Cette stimulation de l'adhérence est l'une des premières propriétés de la fibronectine à avoir été mise en évidence sur des hépatocytes (Hook *et coll.*, 1977). On sait depuis que la fibronectine stimule l'adhérence de plusieurs types cellulaires, tel que les fibroblastes (Grinnell *et coll.*, 1980), les cellules endothéliales (Iuliano *et coll.*, 1993), les cellules osseuses (Yang *et coll.*, 2003; Yang *et coll.*, 2001; McFarland *et coll.*, 1999; Dennis *et coll.*, 1992), et les chondrocytes (Wyre et Downes, 2002).



**Figure 1-15 :** Adhérence d'une cellule sur son substrat via le complexe intégrines-fibronectine.

### 6.2.2. *Étalement et migration*

L'adhérence d'une cellule à la matrice, via les intégrines, entraîne une réorganisation du cytosquelette et l'émission d'extensions cytoplasmiques et par conséquent l'étalement cellulaire : Dans le cas des fibroblastes l'étalement se fait généralement en 1 heure, via l'activation de voies de signalisation intracellulaires intégrines-dépendantes (Price *et coll.*, 1998). Cette liaison à la fibronectine permet à la cellule de migrer au cours de l'embryogenèse (Beauvais-Jouneau *et coll.*, 1997; Winklbauer *et coll.*, 1996) ou lors de la cicatrisation (Greiling et Clark, 1997) et même dans le cas des cellules cancéreuses lors de l'invasion tumorale (Margolis *et coll.*, 1996).

### 6.2.3. *Prolifération et cycle cellulaire*

La FN intervient aussi dans la prolifération cellulaire. Sottile et ses collaborateurs (1998) ont ajouté de la FN «exogène» dans le milieu de culture de cellules ne la synthétisant pas, ils ont noté une augmentation remarquable de la prolifération de ces cellules d'un rapport 2 à 5. Par contre le désassemblage de la protéine annule cet effet, ce qui a poussé les auteurs à suggérer que la stimulation de la prolifération cellulaire est directement corrélée à l'organisation supramoléculaire de la protéine (Sottile *et coll.*, 1998). L'assemblage d'une matrice morphologiquement différente de la FN native par délétion du domaine III<sub>1-7</sub> provoque un retard de croissance en bloquant le passage en phase S du cycle cellulaire (Sechler et Schwarzbauer, 1998).

#### **6.2.4. Différenciation**

La FN joue un rôle important dans les étapes précoces de l'ostéogenèse et en particulier dans la différenciation des ostéoblastes à la surface de la matrice osseuse. Au cours de l'ostéogenèse, la fibronectine est synthétisée et déposée majoritairement dans les régions de recrutement des précurseurs des ostéoblastes (Weiss et Reddi, 1981). L'inhibition de la reconnaissance de la fibronectine par les cellules prévient la différenciation d'ostéoblastes en culture (Moursi *et coll.*, 1997) et par conséquent leur minéralisation (Moursi *et coll.*, 1996). Cette différenciation ostéoblastique par la fibronectine implique l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  (Stephansson *et coll.*, 2002; Moursi *et coll.*, 1997) et dépend étroitement de son substrat d'adsorption, faisant appel au lien étroit entre les fonctions de la fibronectine et sa conformation dans la matrice. De plus la fibronectine est un élément essentiel pour la survie de ces cellules différenciées, car son absence entraîne leur mort par apoptose (Globus *et coll.*, 1998).

#### **6.2.5. Fibronectine et architecture de la matrice extracellulaire**

La fibronectine joue aussi un rôle important dans l'organisation de la matrice extracellulaire, par le biais du collagène et en particulier de type I. Lorsque la matrice de fibronectine est désassemblée, la thrombospondine, comme le collagène de type I, sont présents sous forme disséminée dans la matrice extracellulaire. Lorsque la polymérisation de la fibronectine est maintenue, la thrombospondine et le collagène, sous forme fibrillaire, montrent une nette colocalisation avec la fibronectine (Sottile et Hocking, 2002). Le collagène de type I, est la protéine majoritaire des tissus conjonctifs. Son organisation en fibres au sein des matrices extracellulaires confère aux tissus leurs propriétés mécaniques d'élasticité ou de résistance. Sans fibronectine, les fibroblastes sont incapables d'organiser le réseau de collagène de type I et III. L'addition de fibronectine suffit à promouvoir la fibrillogénèse des deux types de collagène (Velling *et coll.*, 2002). De plus, l'incorporation d'autres protéines à la matrice extracellulaire nécessite également la présence d'une matrice de fibronectine.

## 7. Albumine de sérum bovin

L'albumine de sérum a été une des protéines le plus abondamment étudiée pendant de nombreuses années. C'est la protéine la plus abondante dans le plasma sanguin avec une concentration typique de 50 g/l et fonctionne comme une protéine de transport pour de nombreuses substances endogènes et exogènes. Son rôle principal est le règlement de la pression osmotique sanguine. Elle fournit environ 80% de la pression osmotique et est responsable du maintien du pH sanguin (Carter et Ho, 1994). Beaucoup de chercheurs ont étudié les structures, les fonctions et les propriétés de différentes albumines de sérum pour comprendre leurs actions réciproques avec d'autres molécules et ligands. Certaines de ces albumines sont l'albumine de sérum humain (HSA), l'albumine de sérum bovin (BSA), l'albumine de sérum équin (ESA) et l'albumine de sérum de rat (RSA). Les molécules et ligands qui ont été étudiés incluent des acides gras, des ions métalliques, des pigments et de nombreux médicaments (McLachlan et Walker, 1977).

Joseph F. Foster est le premier à suggérer un modèle d'albumine qui était constitué d'une liaison flexible de domaines semi-indépendants (Foster, 1960). L'albumine de sérum a été une protéine modèle pendant de nombreuses années pour les études physiologiques.

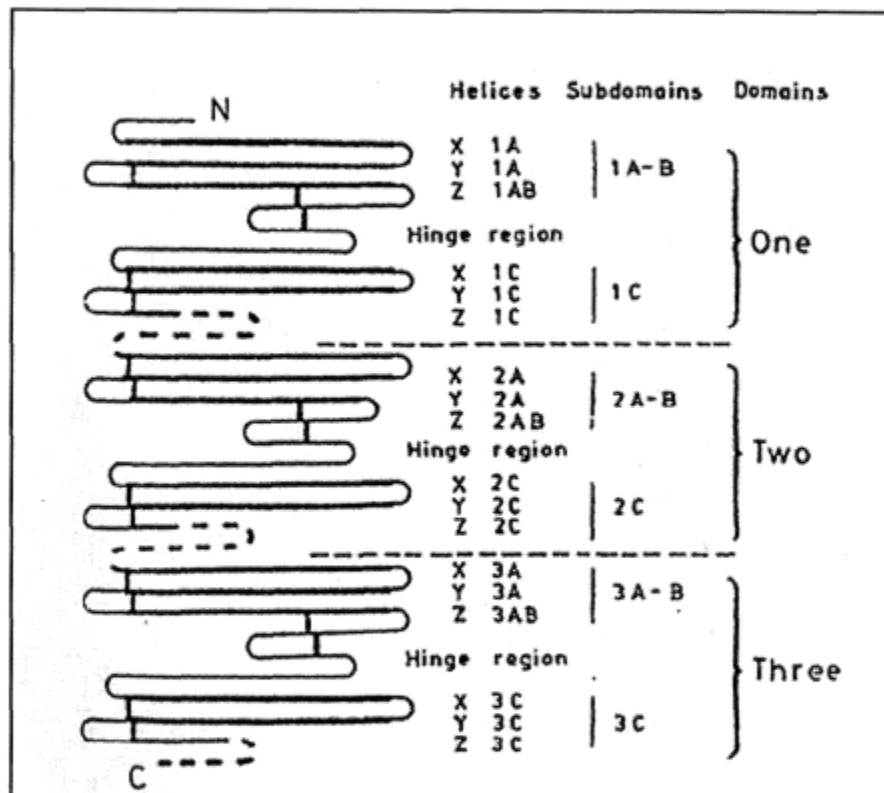
À part la HSA, la ESA et la RSA, la structure primaire de plusieurs albumines de sérums comme l'albumine de sérum de souris (MSA), l'albumine de sérum de porc (PSA), l'albumine de sérum de mouton (OSA), l'albumine de sérum de grenouille (XSA), l'albumine de sérum de saumon (SSA) a été déterminée. La BSA (Brown, 1975) et la HSA (Behrens *et coll.*, 1975) étaient les premières dont la séquence primaire a été déterminée.

### 7.1. Structure de la BSA

La séquence primaire de la BSA a été présentée dans la même année que la HSA (Brown, 1975; Brown, 1976). Brown a montré que la BSA était composée de 582 résidus d'acides aminés. La séquence avait 17 liaisons disulfures résultant dans neuf boucles formées par des ponts. La BSA contient une cystéine simple et huit paires de liaisons disulfures

arrangées dans un enchaînement semblable à celui de la HSA (He et Carter, 1992). La BSA contient aussi un haut contenu d'Asp, Glu, Ala, Leu et des résidus Lys qui ressemble à la HSA et à la RSA.

Selon la séquence d'acides aminés proposée par Brown, les caractéristiques structurales de la BSA montrent qu'elle est composée de trois domaines homologues. Chacun a environ 190 résidus, liés par une chaîne peptidique représentée dans la figure 1-16 et 1-17.



**Figure 1-16 :** Structure de la BSA (Kragh-Hansen, 1981)

Chaque domaine peut être subdivisé en deux sous-domaines, nommés A-B et C. Les domaines contiennent surtout une longue boucle et une région de charnière intra-domainale. Chaque sous-domaine peut être davantage subdivisé en trois hélices "X", "Y" et "Z" (Figure 1-15). Brown a comparé les trois domaines (I, II et III) de la BSA, qui correspondent aux résidus 1-190, 191-382 et 383-582, respectivement. Si les domaines I

et II sont alignés et comparés, ils montrent une identité de 25%, les domaines II et III et les domaines I et III présentent une identité de 21 % et de 18 % respectivement. Cela démontre que les domaines I et II sont plus proches l'un à l'autre que l'un ou l'autre au domaine III.

Dans la structure secondaire de la BSA, il a été suggéré que les  $\alpha$ -hélices sont uniformément placées dans les sous-domaines et dans les connexions entre les domaines. La plupart des résidus dans les longues boucles (sauf à la fin) et aux sections reliant les domaines forment les  $\alpha$ -hélices, alors que les régions de charnière intra-domaine sont des structures surtout non hélicoïdales. Trois longues hélices dans le sous-domaine sont considérées comme les éléments principaux de la structure. Ceux-ci sont parallèles l'un avec l'autre et une dépression est formée par suite de l'hélice du milieu (Y) et donc légèrement plus bas. Les hélices sont surtout liées par les ponts disulfures (Kragh-Hansen, 1981).

Presque tous les résidus hydrophobes sont présents à l'intérieur de la structure et entre les hélices, alors que les résidus polaires sont surtout observés à l'extérieur. Les sous-domaines adhèrent entre eux formant un domaine (Figure 1-17), et les trois domaines forment par la suite une molécule d'albumine de sérum (Kragh-Hansen, 1981).



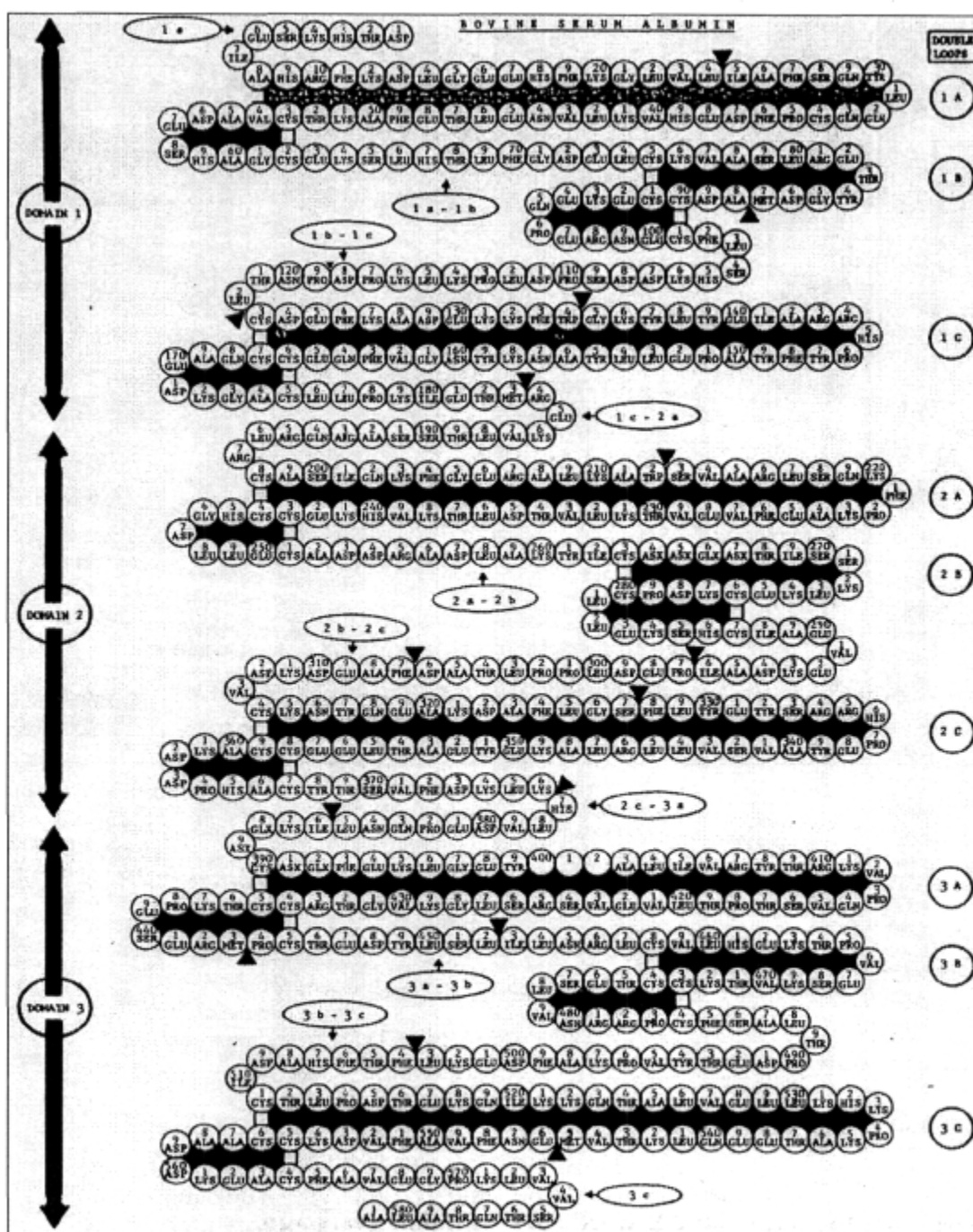
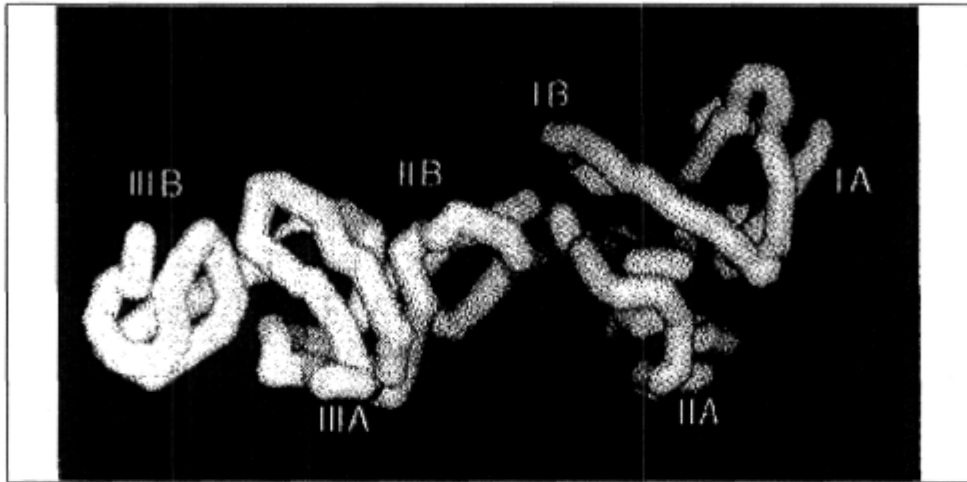


Figure 1-17 : Séquence d'acides aminés de la BSA (Brown, 1976).

En comparaison avec la BSA, la structure tertiaire de la HSA démontre une forte présence de molécule de cystéine avec 17 ponts disulfure, et trois domaines structurellement homologues. Chaque domaine est composé de deux sous-domaines nommés A et de B qui correspondent au modèle A-B et C de Brown (exemple 2A-B et 2C les domaines de BSA sont correspondus à IIA et aux domaines IIB de la HSA) (Figure 1-18).



**Figure 1-18:** Structure tertiaire de la HAS. Elle présente trois domaines et chaque domaine est formé de deux sous-domaines (IA, IB), (IIA, IIB) et (IIIA, IIIB) (Carter *et coll.*, 1989).

Les Sous-domaines IA, IB et IIA se regroupent fermement pour former une tête élargie de la molécule alors que la queue prolongée est constituée par le sous-domaine IIB, IIIA et IIIB (Carter *et coll.*, 1989). La structure primaire de la BSA est identique à 80% à la structure primaire de la HSA (Peters, 1985). Ce résultat suggère que la BSA et la HSA sont des protéines homologues qui pourraient avoir des fonctions biologiques très semblables.

## 7.2. Propriétés de la BSA

La propriété la plus intéressante de l'albumine de sérum est sa haute affinité pour différentes sortes de ligands et de molécules négativement chargées qui se lient à

différentes régions de l'albumine de sérum. Kragh-Hansen a proposé un certain nombre de sites de liaisons à la molécule d'albumine (Tableau 1.1). La caractéristique la plus exceptionnelle des actions réciproques albumine-ligand est la présence de quelques hautes affinités attachant des sites et un certain nombre d'affinités basses attachant des sites qui communiquent avec les différentes sortes de ligands comme les acides gras et les métaux (Kragh-Hansen, 1981).

**Tableau 1.1** : Sites de liaisons de la BSA et leurs ligands

Sites de liaisons	Domaine	Ligands
1	III	Acides gras
2	II or III	Tryptophane, Octanoate
3	II	Bilirubine
4	N-terminal	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$
5	II	Hème

Comparé aux études proposées pour les ligands de la BSA, les principales régions de liaison de la HSA ont été trouvées dans les sous-domaines IIA et IIIA de la molécule. Beaucoup de ligands, par exemple le tryptophane, les acides gras et la bilirubine sont trouvés pour réagir préférentiellement dans les régions contenant les sites IIIA et IIA (He et Carter, 1992). Ces résultats sont conformes au modèle de Kragh-Hansen.

## **8. Hypothèses et objectifs de recherche**

Il est très connu que la stimulation électrique module les activités cellulaires comme l'adhésion, la croissance et la migration des cellules, la synthèse d'ADN et la production de protéines. Les polymères conducteurs et notamment le polypyrrole sont utilisés pour la fabrication de matrices conductrices pour cultures cellulaires. Le PPy a fait sujet de plusieurs études dans le domaine des biomatériaux à cause de sa préparation simple, de sa stabilité et de sa biocompatibilité. En revanche, le PPy est un matériau biologiquement inerte, d'où est venue l'hypothèse de notre travail qui consiste à introduire des protéines et nous avons choisi comme modèle la fibronectine et l'albumine de sérum bovin en tenant compte de leurs propriétés et de leurs fonctions biologiques, dans le but d'améliorer les interactions cellule/PPy et par conséquent cellule/implant.

Le but précis de notre recherche est de bioactiver le PPy en introduisant de la FN et de la BSA et de tester ce nouveau composé pour ses propriétés physiques, chimiques et de biocompatibilité. Nos objectifs spécifiques sont :

- 1-Synthétiser du polypyrrole enrichi avec de la fibronectine.
- 2-Synthétiser du polypyrrole enrichi avec de l'albumine de sérum bovin.
- 3-Produire une matrice composée de polypyrrole enrichi et de poly(L,lactique) acide.
- 4-Étudier l'effet de l'introduction de la FN et de la BSA sur l'adhésion et la prolifération des fibroblastes.

**CHAPITRE II**  
**ARTICLE SCIENTIFIQUE**

**Bioactivating Electrically Conducting Polypyrrole  
with Fibronectin and Bovine Serum Albumin**

Ce chapitre fait l'objet d'un article scientifique qui a été soumis au journal  
*Biomacromolecules* pour publication.

## Résumé de l'article scientifique

Le développement des polymères conducteurs et semi-conducteurs a connu un essor important ces vingt dernières années grâce à leurs propriétés mécaniques et électroniques. Plus récemment, le polypyrrole (PPy) a fait l'objet d'études pour des applications dans le domaine des biomatériaux et de la médecine régénératrice. Le but de cette étude est d'optimiser les propriétés biologiques du PPy en incorporant la fibronectine (FN) et l'albumine de sérum bovin (BSA) et mélanger le PPy enrichi avec le poly(L-lactique acide) pour former des matrices à la fois biodégradables et électriquement conductrices pour utilisation en médecine régénératrice. **Méthode :** La synthèse du polypyrrole a été réalisée chimiquement en émulsion d'eau dans l'huile. La présence des biomolécules dans les particules PPy a été confirmée en utilisant la spectroscopie ESCA et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR). La morphologie de la surface des particules PPy a été effectuée par microscopie électronique à balayage (MEB). La conductivité a été mesurée à l'aide d'un générateur de courant muni d'une tête de mesure à quatre pointes (four-point probes) et la toxicité/biocompatibilité des biomatériaux a été testée par culture cellulaire en étudiant l'adhésion et la prolifération des fibroblastes humains. **Résultats :** L'incorporation de la FN et de la BSA n'a provoqué qu'une légère diminution de la conductivité des PPy particules, contrairement à la littérature dont la conductivité a été nettement diminuée. Ceci est soutenu par le maintien d'une morphologie microporeuse réalisée par l'assemblage régulier de particules PPy. Les fibroblastes cultivés sur des membranes PPy/PLLA enrichies en FN ont démontré une morphologie normale et une adhérence plus élevée que sur des membranes non modifiées, ainsi que sur les membranes enrichies en BSA où on observe une diminution de l'adhérence cellulaire. **Conclusion :** Nous avons réussi à incorporer chimiquement, et pour la première fois, des biomolécules dans le polypyrrole afin de le rendre bioactif tout en conservant ses propriétés physiques, structurales et surtout électriques pour des applications en médecine régénératrice.

## **Bioactivating Electrically Conducting Polypyrrole with Fibronectin and Bovine Serum Albumin**

Adil Akkouch<sup>1,2</sup>, Guixin Shi<sup>1,2</sup>, Ze Zhang<sup>1</sup> and Mahmoud Rouabhia<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche de l'Hôpital Saint-François d'Assise, CHUQ, Département de chirurgie, Faculté de médecine, Université Laval, Québec (QC), Canada

<sup>2</sup> Groupe de recherche en écologie buccale, Faculté de médecine dentaire, Université Laval, Québec (QC), Canada

Running title: Protein bioactivation of polypyrrole

Key words: Biomaterial, polypyrrole, proteins, fibronectine, BSA,

Correspondence and reprint request: Dr Rouabhia, Groupe de Recherche en Écologie Buccale, Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, Québec, Qc, Canada.

**Email:** [mahmoud.rouabhia@fmd.ulaval.ca](mailto:mahmoud.rouabhia@fmd.ulaval.ca)

## Abstract

Electrically conducting polypyrrole (PPy) and its composite materials are useful in interfacing electrical components and cells or living tissue. In recent years, significant efforts have been made to bioactivate PPy by incorporating biomolecules. The main objective of this work was to chemically bioactivate polypyrrole particles by incorporating fibronectin (FN) and bovine serum albumin (BSA). Modified PPy particles were synthesized through a water-in-oil emulsion polymerization. XPS and FTIR confirmed the presence of biomolecules on the PPy particles and the surface morphology was observed by SEM. A four-point probe was used to measure the conductivity of the new synthesized PPy particles, which was in the range of  $10^{-1} \text{ S.cm}^{-1}$ . Conductive biodegradable membranes were prepared with 5 and 10% (wt/wt) PPy to poly(L,L-lactide) (PPy/PLLA). The contact angles of each synthesized membrane were approximately  $75^\circ$ , supporting their usefulness for cell culture. Human skin fibroblasts cultured demonstrated normal morphology and significantly higher adhesion and spreading on the PPy/PLLA~FN membrane than on the unmodified PPy/PLLA membrane. On the other hand, the PPy/PLLA~BSA membranes showed decreased cell adhesion. Bioactivated PPy may be useful in tissue engineering to fabricate conducting biodegradable scaffolds with either improved or reduced cell adhesion properties for various cell culture and *in vivo* applications.



## Introduction

Using scaffolds in tissue engineering is to provide an initial temporary substrate for cells to grow until the functional architecture of the tissue or organs is generated. Synthetic scaffolding biomaterials must often be bioactivated to become either cell-adhesive, to promote cell adhesion and proliferation, or non-adhesive to avoid non-specific interactions. Multiple techniques have been used to bioactivate the surfaces of synthetic biomaterials, such as protein adsorption and self-assembly (1), direct surface chemical modification (2, 3), synthesis of novel graft-copolymers with desired functional groups (4), and the incorporation of reactive groups into the polymer backbone through the use of functional monomers and the subsequent copolymerization with standard monomers (5). Once incorporated, these functional groups can then undergo further reactions with the desired bioactive molecules, such as cell adhesion peptides, growth factors, or antibodies. Surface activation to promote cell adhesion and growth can be obtained by incorporating cell-adhesive proteins such as fibronectin (FN), a glycoprotein containing two subunits of 250 kDa each found in plasma and other body fluids in soluble form, and in extracellular matrices in insoluble form. Within each subunit there is a series of tightly folded globular domains, each specialized in binding to other molecules or to cells (6). Fibronectin is involved in multiple biological phenomena including cell adhesion and maintenance of normal cell morphology, cell migration, homeostasis and thrombosis, wound healing and oncogenic transformation (7, 8), and the protection against programmed cell death or apoptosis. In contrast, bovine serum albumin (BSA) is considered to be a soft protein, implying that its molecules not only display a high potential to undergo structural changes upon adsorption onto interfaces but also stabilize a variety of important small molecules

and ions (9). BSA is known to inhibit cell attachment and to block non-specific binding (10, 11).

Polypyrrole (PPy) is of great interest in biomedical engineering because of its electrical conductivity, its flexible preparation method (12), its easy surface modification (13), its excellent environmental stability (14) and ion exchange capacity (15), and its biocompatibility both *in vitro* and *in vivo* (16, 17). Biomolecules, such as heparin and FN, have been incorporated into PPy through electrochemical synthesis (18, 19). We have developed a conductive biodegradable composite based on PPy nano/micro particles and poly(L,L-lactide) (PLLA) (20). We have also demonstrated that biomolecules, such as heparin, can be chemically incorporated into PPy particles without using electrochemistry or surface grafting, and that heparin-containing PPy is beneficial in terms of electrical stability and fibroblast adhesion (21). It is believed that PPy particles bioactivated by various types of biomolecules provide a valuable method in rendering materials both electrically conductive and biologically specific. As both FN and BSA play important physiological roles, it was hypothesized that FN and BSA be added to PPy particles and that these enhanced particles could be used to construct conductive biodegradable membranes with specific extracellular properties affecting cell adhesion and proliferation.

## Materials and Methods

### Polypyrrole synthesis and membrane fabrication

Pyrrole (98%, Laboratoire MAT Inc., Beauport, QC, Canada) was distilled under reduced pressure and stored in a refrigerator at 4°C prior to use. To synthesize the PPy particles, ferric chloride ( $\text{FeCl}_3$ , Laboratoire MAT Inc.) dissolved in  $\text{H}_2\text{O}$  was added to an emulsion system consisting of sodium dodecyl sulfate (DBS, Laboratoire MAT Inc.) aqueous solution, hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , Laboratoire MAT Inc.), and chloroform ( $\text{CHCl}_3$ , Laboratoire MAT Inc.). Pyrrole was then introduced dropwise into the emulsion system under vigorous stirring to trigger an oxidative polymerization in nitrogen atmosphere. To form the bioactivated PPy particles, FN (Sigma-Aldrich Canada, Ltd, Oakville, ON, Canada) or BSA (Sigma-Aldrich) was added to the emulsion system prior to polymerization. The polymerization continued at room temperature for 4 h to obtain PPy particles, which were then washed repeatedly with methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , Laboratoire MAT Inc.) to remove any remaining emulsifier and  $\text{FeCl}_2$ . As is shown in Table 1, different protein-rich PPy materials were prepared.

To prepare the conductive biodegradable membranes, PPy particles were added to a poly(L,L-lactide) (PLLA, Hycail B.V., Noordhorn, The Netherlands) solution in  $\text{CHCl}_3$  under high speed stirring, in which the weight ratio of PPy to PLLA was 5 and 10% (wt/wt). The PPy/PLLA solution was cast onto polytetrafluoroethylene (PTFE) plates and dried in room temperature to form membranes. Both protein-rich PPy and PPy-PLLA materials were subjected to different characterizations.

**Scanning electron microscopy**

A scanning electron microscope (SEM) (JEOL 6360 LV, Soquelec Inc., Montréal, QC, Canada) operated at an accelerating voltage of 30 kV was used to investigate the morphology of the protein-rich PPy particles. Specimens were sputter-coated with gold prior to observation. Images were collected at various magnifications.

**X-ray photoelectron spectroscopy**

The surface elemental composition of the PPy particles was analyzed using a Perkin Elmer PHI model 5600 X-ray photoelectron spectrometer (XPS) (Eden Prairie, MN, USA). A standard magnesium source (1253.6 eV) was used to measure the surface chemistry of the samples. The photoelectrons emitted from the surface of the samples under X-ray excitation were collected at a take-off angle of 45° and analyzed with a hemispheric electron energy analyzer operating at a pass energy of 187.9 eV (survey scans) or 5.85 eV (high-resolution scans). During the analysis, the base chamber pressure was in the order of  $10^{-10}$  Torr. The high-resolution spectra were curve-fitted using the software provided by the manufacturer. The PPy particles (0.05g) were mechanically pressed (Pellet Press, Parr Instrument Co., Moline, IL, USA) into pellets and stored under vacuum prior to use.

**Fourier transform infrared spectroscopy**

PPy particles were analyzed by FTIR using a Nicolet Magna 550 Fourier transform infrared spectrometer (Thermo-Nicolet, Madison, WI, USA) equipped with a germanium-coated KBr beamsplitter and a DTGS/KBr detector. Spectra were recorded in ATR mode using a Split Pea (Harrick Corporation, Ossining, NY, USA) featuring a 200  $\mu\text{m}$  Si internal

reflection element. One hundred fifty scans were recorded at a resolution of  $4 \text{ cm}^{-1}$ . OMNIC (Nicolet Co.) software was used for data acquisition and spectrum processing.

### **Contact angle measurement**

The surface hydrophilicity of the PPy/PLLA membranes was determined by measuring the contact angle of water on each membrane in air at  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , using a VCA 2500 XE system (AST, Billerica, MA, USA). Drops of deionized water ( $1 \mu\text{l}$ ) were placed on each membrane surface and the contact angles were measured within 3 seconds. At least 3 drops per sample were used and three samples per membrane type were analyzed.

### **Conductivity measurement**

The surface resistance ( $R$ ) of mechanically pressed PPy pellets was measured by four-point resistance measurements using a Jandel Multiheight Probe (Jandel Engineering, Linslade, Bedfordshire, UK) equipped with a Keithley 2700 digital multimeter (Keithley Instruments Inc., Cleveland, OH, USA). The electrical resistivity ( $\rho$ , ohm.cm) was calculated according to the following formula:

$$\rho = \frac{\pi}{\ln(2)} t R f_1 f_2 = 4.5324 t R f_1 f_2$$

where  $R$  is the surface resistance measured by the four-point probe,  $t$  is the sample thickness,

$f_1$  is the finite thickness correction, and  $f_2$  is finite width correction. Conductivity ( $\sigma$ ,  $\text{S.m}^{-1}$ ) is the opposite of electrical resistivity ( $\rho$ ).

**Cell culture**

Human skin fibroblasts were grown in 75 cm<sup>2</sup> cell culture flasks (Falcon, Becton-Dickinson, Cockeysville, MD, USA) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) with 10% fetal calf serum (FCS, Invitrogen Life Technologies), 100 IU/ml penicillin G, 25 µg/ml streptomycin and 0.5 µg/ml fungizone (Sigma-Aldrich Canada, Ltd.). The cultured cells were then incubated at 37°C in 98% humidity, and 5% CO<sub>2</sub>. Cell culture medium was changed every 2-3 days. When the cultures reached 90% confluence, the cells were detached from the flasks using a 0.05% trypsin-0.1% EDTA solution, washed twice, and placed on the test membranes, as described below. The cells in passages 3 to 5 were used for each experiment.

**Cell culture on PPy/PLLA membranes**

For the cell culture experiments, the membranes were punched into circular specimens and sterilized with ethylene dioxide (EO) gas at 37°C according to standard industrial procedures. Cylindrical specimens 1.5 cm in diameter were cut from the protein-rich PPy/PLLA membranes and pre-incubated in cell culture medium for 24 h prior to cell seeding. The pre-incubation was performed to further wash away any residual chemicals on the specimens. To assess the impact of the protein bioactivation of PPy/PLLA on cell adhesion and proliferation, the specimens were seeded with fibroblasts ( $25 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>) and incubated in DMEM with or without 10% fetal calf serum in a 5% CO<sub>2</sub> humid atmosphere at 37°C. Six specimens of each type of membrane were cultured for 24, 48, and 72 hours. Tissue culture Petri dishes were used as controls.

**Cell viability test (MTT assay)**

Following each culture period, cell viability was analyzed using the MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid)] test (Sigma-Aldrich Canada Ltd.). MTT test is an established spectrophotometric measurement of the mitochondrial activity in living cells. MTT reading is proportional to the number of cells. Protein-rich PPy/PLLA membranes containing fibroblasts were transferred to another 24-well culture plate with fresh culture medium. A stock solution (5 mg/ml) of MTT was prepared and added to each culture well at 1% (v/v). The cultures were then incubated for 4 h at 37°C, after which time the supernatant was removed and 2 ml HCl in isopropanol (0.04N) was added to each well. The incubation continued for an additional 15 min. Finally, 200 µl (in triplicate) of solution was transferred from each well to a 96-well flat-bottom plate and the absorbance of the MTT (formazan) was determined at 550 nm using an ELISA reader (Model 680, BioRad Laboratories, Mississauga, ON, Canada).

**Microscopic observation of the cells on protein-rich PPy/PLLA membranes**

Following each culture period, the polymer specimens were transferred into a 24-well plate, washed, and fixed with 75% methanol (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, USA) and 25% glacial acetic acid (Laboratoire MAT Inc.) solution (v/v). Each well was then supplemented with 0.5 ml Hoechst dye (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in PBS (1/100 dilution) and the specimens were incubated for 10 min at room temperature before being extensively washed with distilled water, observed under an epifluorescence light microscope (Axiophot, Zeiss, Oberkochen, Germany), and photographed using a digital camera.

### **Ultrastructural analyses of fibroblasts using SEM**

Following cell culture, in order to investigate the ultrastructure of the cells cultured on the PPy/PLLA membranes, the specimens were first rinsed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min, then washed 4 times with distilled water. Dehydration was performed in a series of ethanol solutions of increasing concentrations (50, 70, 90, and twice at 100%), with a 5-min dehydration treatment in each solution and a 5-min interval between treatments. The dehydrated specimens were kept overnight in a vacuum oven at room temperature. Specimens were sputter-coated with gold and examined/photographed with a JEOL JSM 35 scanning electron microscope (Soquelec Inc.) operating at a 15 kV accelerating voltage.

### **Statistical analyses**

Each experiment was performed at least six times. The experimental values are given as means  $\pm$  SD. The statistical significance of the differences between the control and test values was evaluated using a one-way ANOVA. Results were considered significant if  $p$ -values  $< 0.05$ . The data were analyzed using SigmaPlot 2002 software (2004 Systat Software, Inc., Chicago, IL USA).



## Results

### 1. Morphology of the protein-rich PPy particles

Figure 1 shows the morphology of the PPy particles with or without proteins. Both the pure and protein-rich PPy showed a similar microporous morphology apparently made by the assembly of PPy particles. Because the individual particles were aggregated, identifying their morphology was difficult. However, the diameter of the rod-like structure (see arrows, Fig. 1d) was approximately 100 nm. Each type of PPy particle displayed similar morphology, indicating that the incorporation of either type of protein (FN or BSA) into PPy had no effect on the morphology of this material.

### 2. Wettability of the protein-rich PPy/PLLA membranes

Figure 2 shows the wettability of the membranes, as measured by contact angles. A lower contact angle indicates higher hydrophilicity. A significant difference was found between the membranes made of bioactivated and those composed of pure PPy particles. The surface of the membranes made of pure PPy particles showed a relatively high contact angle (approximately  $90^\circ$ , as both PPy and PLLA are hydrophobic). On the other hand, most of the membranes containing the protein-modified PPy particles showed significantly decreased contact angles (approximately  $75^\circ$ ), suggesting an enhanced hydrophilicity. Higher PPy content (10%) in the membranes had no effect on the contact angles.

### 3. Surface chemistry measured with XPS

Table 2 presents the surface elemental composition of the different PPy particles as determined by XPS. The presence of both FN and BSA was confirmed by the increased nitrogen levels in all of the bioactivated PPy particles originating from protein amino acids. The chlorine levels decreased in each protein-rich PPy specimen, suggesting that some proteins had replaced chlorine anions as counterions. Figure 3 presents the high resolution spectra of  $C_{1s}$ ,  $N_{1s}$ , and  $O_{1s}$  of the pure and bioactivated PPy particles. Figure 4 shows the quantitative data based on the curve fitting. The  $C_{1s}$  core-level spectra present three main peaks with binding energies at 284.0, 286.0, and 288.0 eV, corresponding to saturated hydrocarbons, carbon atoms with a single bond connected to either oxygen ( $C-O-C$  and  $C-OH$ ) or nitrogen ( $C-N$ ), and carbon atoms in carbonyl groups ( $N-C=O$ ,  $O-C=O$ , and  $COOR$ ), respectively. The bioactivated PPy showed an increase in the amount of carbonyl component, particularly for the BSA-rich PPy, which is consistent with abundant peptidic bonds ( $NH-C=O$ ) in the chemical structure of proteins. High resolution  $N_{1s}$  spectra confirmed the analyses of the  $C_{1s}$  peaks and the elemental results presented in Table 2. The two main peaks at 399.0 and 401.0 eV come from neutral and positively charged nitrogen, respectively. The high amount of neutral nitrogen in all of the bioactivated PPy specimens reflects the presence of proteins. The  $O_{1s}$  spectra of the bio-activated PPy particles were decomposed into three components centered around 531.0, 533.0, and 534.0 eV, showing an increase of the two peaks on the high binding energy side assigned to  $-C=O$  and  $-COOH$ , respectively. This also confirms the presence of FN and BSA in the PPy particles.

#### 4. Fourier transform infrared spectroscopy

Pure PPy and protein-bioactivated PPy were analyzed by FTIR, as shown in Figure 4. In the spectrum of pure PPy particles, two broad bands were observed: the C-C stretching vibration of the pyrrole ring at  $1540\text{ cm}^{-1}$  and the C-N stretching vibration in the ring at  $1450\text{ cm}^{-1}$ . While the IR spectra of the FN- and BSA-activated PPy particles showed the same characteristic peaks as those of the pure PPy, additional peaks appeared in the region between  $1600$  and  $1800\text{ cm}^{-1}$ , corresponding to the C=O stretching at  $1653\text{ cm}^{-1}$  (amide I) and the C-N stretch coupled with N-H bending at  $1540\text{ cm}^{-1}$  (amide II), which is characteristic of polypeptides in FN and BSA. These regions are very sensitive to the secondary structures of proteins (22). This therefore proves that FN and BSA were successfully incorporated into the PPy particles with their second structures intact, which is of the utmost importance.

#### 5. Conductivity of the PPy particles

The conductivity of all of the PPy particles measured in the order of  $10^{-1}\text{ S.cm}^{-1}$  (Figure 5). The incorporation of proteins slightly decreased conductivity, which was more evident in the FN than in the BSA samples. In addition, this decreased conductivity was apparently dose-dependent for FN but not for BSA, for which only a high concentration (0.50 g) induced a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in conductivity.

#### 6. Cell adhesion and proliferation on bioactivated PPy/PLLA membranes

Figure 6 shows that in the presence of serum, fibroblasts adhered and proliferated well on the pure PPy/PLLA membranes, while the addition of proteins to the PPy particles

significantly ( $p < 0.05$ ) modulated fibroblast behaviour. In particular, our findings indicate that the FN-bioactivated PPy membranes upregulated the adhesion and proliferation of fibroblasts compared to the control group. In contrast, fibroblasts cultured on the BSA-rich PPy membranes resulted in a negative impact on cell culture by inhibiting both cell attachment and growth. These effects were not time-dependent, as they were maintained throughout the entire culture period. In addition, the different amounts of PPy particles in the membrane (5% or 10%), had no significant effect on cell behaviour. In the absence of serum, all of membranes displayed less adhesive cells and slow growth (data not shown), although the effect of FN and BSA on modulating fibroblast behaviour remained. The fibroblasts on the membranes of FN-activated PPy recorded a greater number of adhesive cells and better growth than did the pure PPy/PLLA membranes. On the other hand, the BSA-activated PPy membranes induced less cell adhesion and slower growth.

The MTT results were supported by the Hoechst staining tests, as shown in Figure 7 (only the results at 24 h are presented). All of the data indicate that incorporating FN in the PPy particles promoted cell attachment and proliferation, whereas incorporating BSA reduced cell adhesion and proliferation.

### **7. Cell morphology on the PPy/PLLA membranes**

Figure 8 shows the SEM photomicrographs of fibroblasts grown on the PPy/PLLA membranes for 72 h. It was noted that on the membranes containing FN-activated PPy particles, the fibroblasts adhered well and exhibited a normal elongated and spread-out morphology. It was also apparent that membranes containing FN displayed greater cell

density. In contrast, on the membranes made of BSA-activated PPy particles, the fibroblasts exhibited a sparse and more contained morphology.

## Discussion

PPy is a biocompatible conductive polymer that can be relatively easily modified in chemistry by using various pyrrole derivatives (23). However, these modifications often compromise the conjugational structure of PPy, resulting in inferior conductivity. Incorporating biomolecules into PPy through emulsion polymerization is an effective approach to render PPy bioactive and largely maintain its conductivity. Following our previous work on heparin-doped PPy (21), this study shows for the first time that important cell-adhesive molecules, such as FN, can be incorporated into PPy nanoparticles and still retain their biological activities. Fibronectin is known to promote cell adhesion, migration (24), and proliferation (25). This large adhesive glycoprotein is also crucial to interact with membrane proteins, such as integrins, and with extracellular matrix molecules, such as collagen. Besides acting as a substrate, fibronectin possesses certain proteolytic fragments that can promote chemotactic migration (26). Both fibronectin and its fragments are also capable of activating integrin signaling (27, 28). Bioactivation of PPy nanoparticles with FN therefore renders these conductive particles active to cell membrane proteins and extracellular matrix, thereby enhancing the potential of the conductive PPy to specifically interact with cells. On the other hand, non-adhesive proteins could be used to block or diminish unwanted biological processes, such as platelet adhesion on vascular grafts (29). Conventional thought in this field has focused on the use of bovine serum albumin (30).

Albumin is the most abundant soluble protein in plasma and is known to reduce cell attachment and block non-specific binding (31, 32). Due to its thromboresistant property, the covalent attachment of albumin on implantable devices was thought to influence subsequent events in the blood coagulation cascade, such as the reduction of platelet adhesion and aggregation, thereby avoiding subsequent thrombus formation. Albumin also reduces fibrinogen adsorption on the surface and lowers plasma protein adsorption. In our study, a high ratio of albumin to fibrinogen adsorption on the coated surface resulted in an almost complete inhibition of platelet adhesion (30). The successful incorporation of BSA into PPy nanoparticles may therefore reduce their “visibility” in biological processes, lowering their probability of being attacked by cells. This property may be useful in medical implants where interface interactions must be reduced. In the present study, FN and BSA were likely incorporated into PPy particles both as dopants and physically trapped in micelles. It is well known that emulsion polymerization is very effective in producing polymer particles in the size range of 5-100 nm (33). An emulsion system usually contains water, oil, and surfactant, and often with co-surfactant to stabilize the system. Water droplets stabilized by surfactant molecules form micelles in organic solvents. Hence, water soluble reactants can be introduced into the nano-sized aqueous domains confined within the micelles, which act as ‘nano-reactors’ (34, 35). We believe that the proteins were trapped in these micelles together with the oxidant prior to the addition of pyrrole monomers. With the addition of pyrrole monomers to the emulsion, the polymerization resulted in the proteins becoming entangled with the PPy macromolecules. In addition, FN and BSA are two negatively charged proteins. Thus, it is very likely that electrostatic interactions between the negatively charged proteins and positively charged PPy occurred

simultaneously during polymerization, leading to the *in situ* doping of PPy by the proteins. This would explain the lower Cl<sup>-</sup> content in the protein-activated PPy. Anionic polymers have been reported to be codopant in PPy because of their high negative charge density and physical entanglement within a PPy matrix (36, 21). In our study, SEM analysis revealed that incorporating proteins did not change the morphology of the PPy particles. All of the PPy samples presented a microporous morphology resulting from the assembly of the PPy nanoparticles. This porous structure may actually be beneficial to cell adhesion. The incorporation of proteins decreased the conductivity of the PPy particles only slightly, in contrast to that of other research in which the conductivity reportedly dropped significantly (36). We have previously reported on heparin-doped PPy (21). In this study, we demonstrated that other biomolecules, such as FN and albumin, may also be incorporated into PPy nanoparticles. Furthermore, we believe that this relatively simple emulsion polymerization approach shows promise in engaging other types of biomolecules into PPy nanoparticles. The presence of diverse biomolecules on the surface of PPy/PLLA membranes may have a profound effect on cell anchorage and spreading as well as on cell membrane-mediated signalling processes (37). The conjunction of specific bioactive proteins on PPy surfaces with electrical stimulation may lead to a new approach to electrically target specific cell responses.

## Conclusion

Fibronectin and bovine serum albumin were effectively incorporated into PPy to create bioactivated conductive PPy nanoparticles. The biodegradable polylactide membranes

containing these bioactivated PPy nanoparticles showed the capacity to modulate cell adhesion and proliferation because of the presence of the bioactive proteins on the PPy surface. It is suggested that specifically bioactivated PPy/PLLA conductive membranes show potential in the introduction of targeted electrical stimulation.

### **Acknowledgements**

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and the Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ).



## References

1. Mikos, A.G.; Lyman, M.D.; Freed, L.E.; Langer, R.L. *Biomaterials*. **1994**, 15, 55–58.
2. Zhang, S.; Altman, M. *React. Funct. Polym.* **1999**, 41, 91–102.
3. Valuev, I. L.; Chupov, V. V. *Biomaterials*. **1998**, 19, 41–43.
4. Tong, Y. W.; Shoichet, M. S. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, 42, 85–95.
5. Finne, A.; Albertsson, A. C. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2004**, 42, 444.
6. Hrkach, J.; Ou, J.; Lotan, N.; Langer, R. *J. Mater. Sci. Res.* **1999**, 78, 92–102.
7. Richard, H. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **1985**, 1, 67-90.
8. Alitalo, K.; Vaheri, A. *Adv. Cancer Res.* **1982**, 37, 111-158.
9. Hormann, H. *Klin Wochenschr.* **1982**, 60, 1265-1277.
10. Yamada, K.M. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, 52, 761-799.
11. McClellan, S.J.; Franses, E.I. *Colloid. Surf. A* **2005**, 260, 265–275.
12. Boyle, A.; Genies, E.; Fouletier, M. *J. Electroanal. Chem.* **1990**, 279, 179–86.
13. Street, G. B.; Clarke, T. C.; Krounbi, M.; Kanazawa, K.; Lee, V.; Pfluger, P.; Scott, J. C.; Weiser, G.; *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1981**, 83, 253.
14. Usmani, A. M. *Diagn. Biosens. Polym.* **1994**, 2, 556.
15. Ashwell, G. J.; *Molecular Electronics*; Research Studies Press: New York, **1992**, 65.
16. Hailin, G.; Wallace, G. G. *Anal. Chem.* **1989**, 61, 198-201.
17. Wong, J. Y.; Langer, R.; Ingber, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, 91, 3201-3204.

18. Garner, B.; Georgevich, A.; Hodgson, A. J.; Liu, L.; Wallace, G. G. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *44*, 121-129.
19. Kotwal, A.; Schmidt, C.E. *Biomaterials.* **2001**, *22*, 1055-64.
20. Shi, G.; Rouabhia, M.; Wang, Z.; Dao, L. H.; Zhang, Z. *Biomaterials.* **2004**, *25*, 2477-88.
21. Meng, S.; Rouabhia, M.; Shi, G.; Zhang, Z. *J. Biomed. Mater. Res.* **2008** (In press).
22. Pauthe, E.; Pelta, J.; Patel, S.; Lairez, D.; Goubard, F. *Biochimica et Biophysica Acta.* **2002**, *1597*, 12-21.
23. Khan, W.; Marew, T.; Kumar, N. *Biomed. Mater.* **2006**, 235–241.
24. Clark, R.A.F. The molecular and cellular biology of wound repair. *Plenum Press.* New York, New York, USA. **1996**, 611 pp.
25. Han, S. W.; Roman, J. *Oncogene.* **2006**, *25*, 4341–4349.
26. Clark, R.A.; Wikner, N.E.; Doherty, D.E.; Norris, D.A. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 12115–12123.
27. Schwartz, M.A.; Schaller, M.D.; Ginsberg, M.H. *Ann Rev Cell Dev Biol.* **1995**, *11*, 549–599.
28. Giancotti, F.G.; Ruoslahti, E. *Science.* **1999**, *285*, 1028–1032.
29. Pankaj Vadgama. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C: Phys. Chem.* **2005**, *101*, 38.
30. Li, Y.; Neoh, K.G.; Kang, E.T. *J. Colloid Interf. Sci.* **2004**, *275*, 488–495.
31. McClary, K.; Ugarova, T.P.; Grainger, D. W. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *50*, 428.
32. Sun, F.; Castner, D. G.; Mao, G.; Wang, W.; McKeown, P.; Grainger, D.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1856.
33. Feng, Y.; Gi, X.; Mingshi, Z. *J. Appl. Polym. Sci.* **1999**, *77*, 135-140.

34. Pileni, M. P. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 6961.
35. Lopez-Quintanella, M. A.; Rivas, J. J. *Colloid Interface Sci.*, **1993**, 158, 446.
36. Collier, J. H.; Camp, J. P.; Hudson, T. W.; Schmidt, C. E. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, 50, 574 – 584.
37. Sastry, S. K.; Burrige, K. *Exp. Cell Res.*, **2000**, 261, 25.

## Figure Legends

**Figure 1.** SEM observation of pure PPy (A), FN<sub>2</sub>-rich PPy (B), BSA(0.05g)-rich PPy (C) and (D). Note the changes at the nanoscale, and the microporous assembly of the protein-rich PPy as compared to that of the pure PPy.

**Figure 2.** Contact angle measurement on protein-rich PPy/PLLA materials. (A) PPy/PLLA membranes at 10% wt/wt and (B) PPy/PLLA membranes at 5% wt/wt. All of the samples display similar roughness. A significant difference between the pure PPy/PLLA (Ctrl) and the protein-rich PPy/PLLA was considered significant at  $p < 0.05$  or less.

**Figure 3.** XPS spectra of protein-rich PPy. Materials containing fibronectin (FN<sub>2</sub>) and bovine serum albumin (0.50 g BSA) Spectra presented in this figure show the chemical composition of the protein-rich PPy compared to pure PPy.

**Figure 4.** FTIR analysis of the protein-rich PPy. Spectra were obtained and plotted. Note the presence of fibronectin and BSA in the material as amide regions (Arrows). These refer to the different peaks in the spectra.

**Figure 5.** Conductivity of protein-rich PPy. The conductivity was obtained by the reversal of the electrical resistivity. *P*-values were obtained by comparing the pure PPy to the protein-rich PPy. (Ctrl) refers to pure PPy.

**Figure 6.** Effect of protein-rich PPy/PLLA material on fibroblast adhesion and proliferation. Cell attachment and growth were assessed by MTT assay. Results are presented as mean  $\pm$  SD of five different experiments. (\*) refers to  $p < 0.05$  and (\*\*) refers to  $p < 0.01$  following comparison of absorbance values obtained with the PPy/PLLA and protein-rich PPy/PLLA materials. (A) FN-rich PPy/PLLA with 10% PPy, (B) FN-rich PPy/PLLA with 5% PPy, (C) BSA-rich PPy/PLLA with 10% PPy, and (D) BSA-rich PPy/PLLA with 5% PPy.

**Figure 7.** Fibroblast adhesion onto protein-rich PPy/PLLA materials. The photographs (200X magnification) are representative of six separate experiments.

**Figure 8.** SEM analyses of protein-rich PPy/PLLA materials containing human fibroblasts. Note the abundant elongated and well-distributed cells on the FN<sub>3</sub>-activated membranes (B) as compared to the control (A) and the BSA (0.25 g)-activated material (C).

**Table 1.** Nomenclature of the PPy particles

	Pure PPy	PPy with BSA			PPy with FN		
Identification	Control (Ctrl)	0.05BSA	0.25BSA	0.50BSA	FN <sub>1</sub>	FN <sub>2</sub>	FN <sub>3</sub>
Weight ratio	-	1: 0.05	1: 0.25	1: 0.50	1: 4.84x10 <sup>-4</sup>	1: 2.43x10 <sup>-3</sup>	1: 4.84x10 <sup>-3</sup>

**Table 2.** XPS results of the chemical elements detected on PPy particles surface.

PPy particles	Surface concentrations (%) of				
	C	N	O	Cl	S
Pure PPy	74.0±0.51	13.8±0.94	7.1±0.70	4.7±0.42	0.4±0.07
FN1	75±0.70	15.4±0.20	6.0±0.40	3.3±0.25	0.4±0.14
FN2	75.4±0.30	14.7±1.27	6.5±1.15	3.1±0.26	0.3±0.00
FN3	75.3±0.30	14.8±0.60	6.1±0.61	3.4±0.00	0.3±0.05
0.05 BSA	74.4±0.00	15.9±0.49	6.7±0.35	2.9±0.00	traces
0.25 BSA	75±0.14	15.1±0.00	6.6±0.49	2.8±0.14	0.5±0.00
0.50 BSA	75.0±3.46	15.3±0.07	7.0±0.70	2.1±0.10	0.5±0.70

C: Carbon, N: Nitrogen, O: Oxygen, Cl: Chlorine, S: Sulfur.

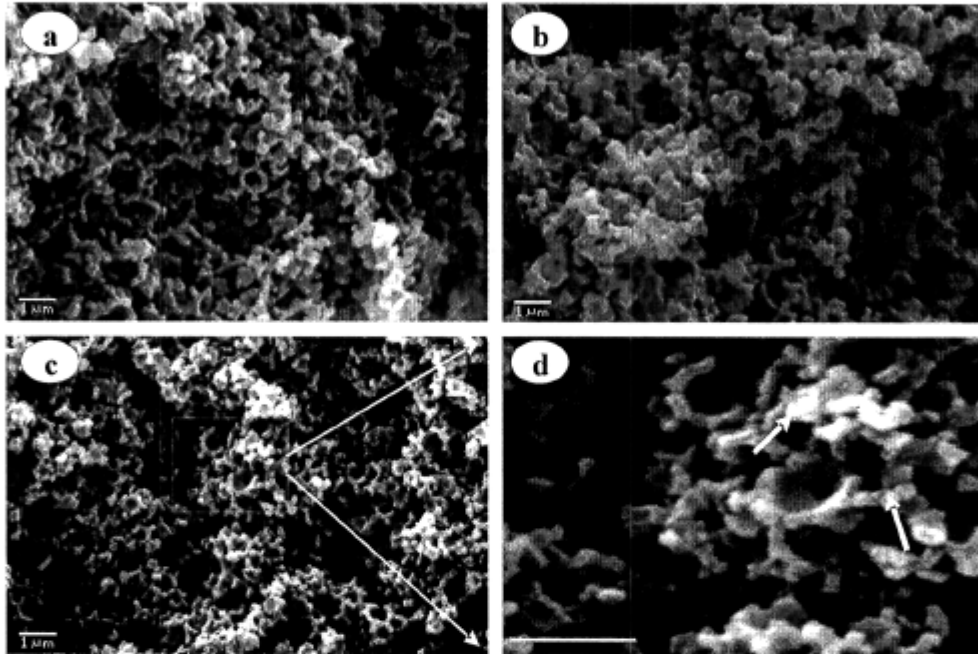


Figure : 1



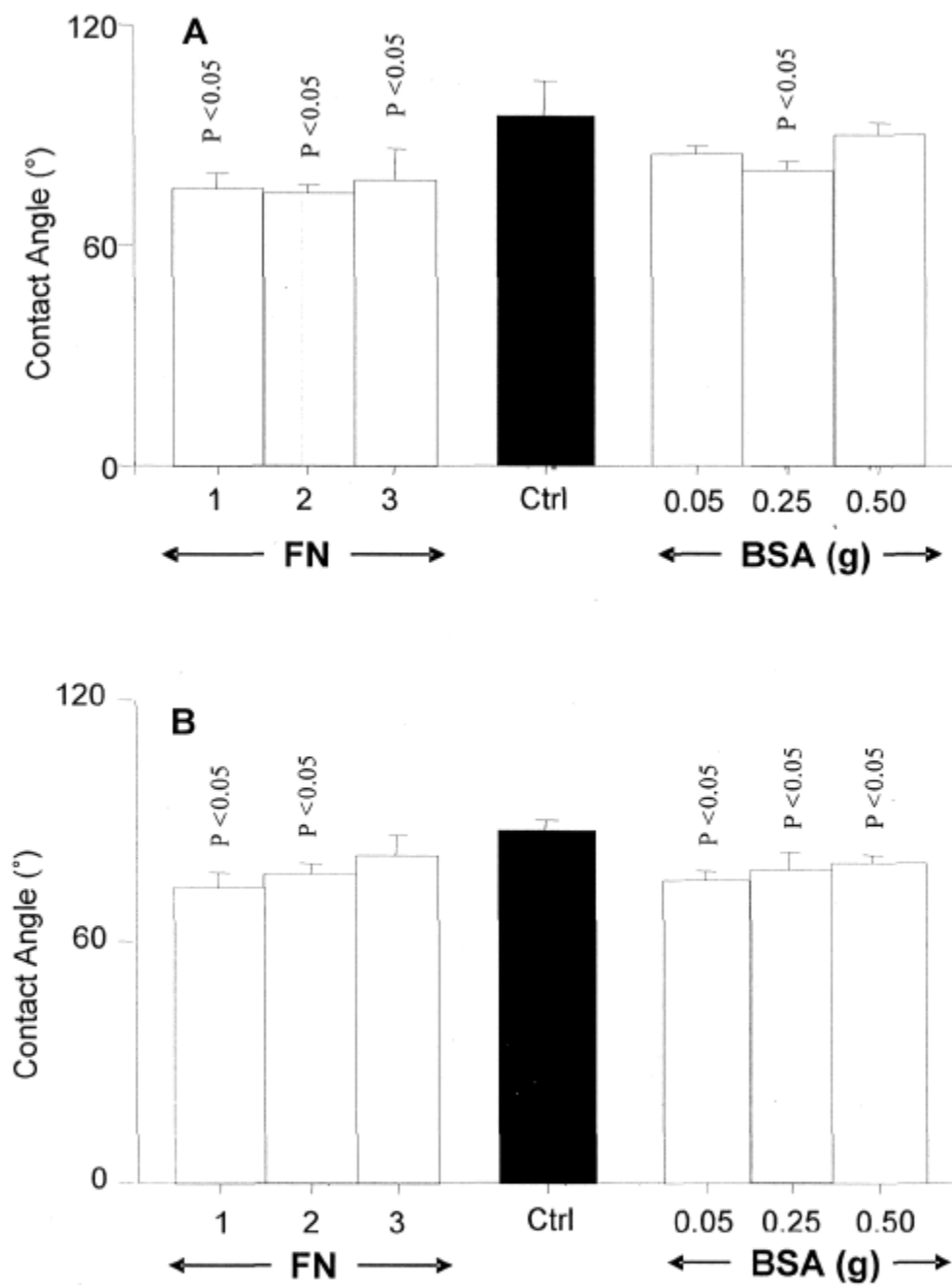


Figure : 2

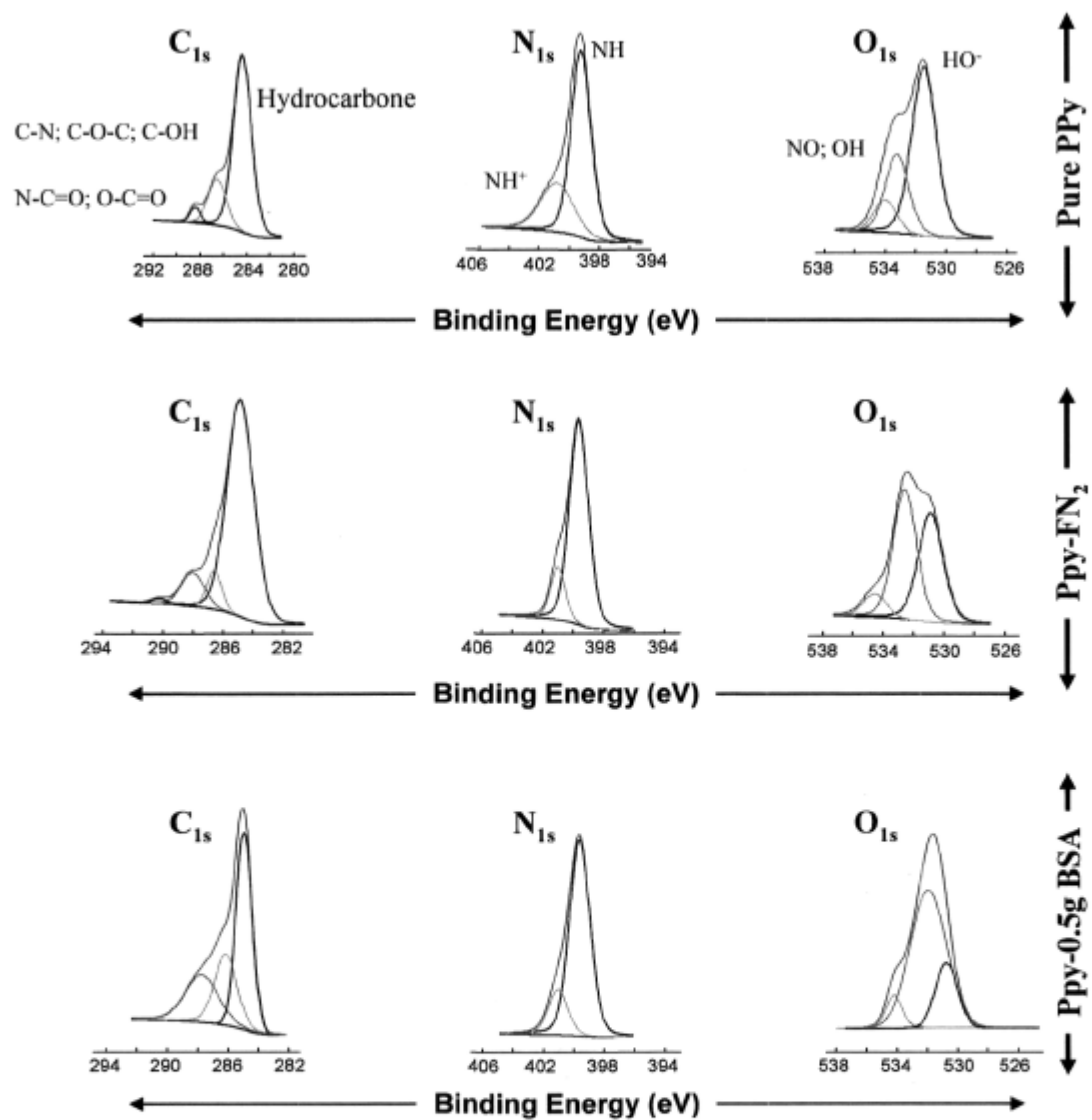


Figure : 3

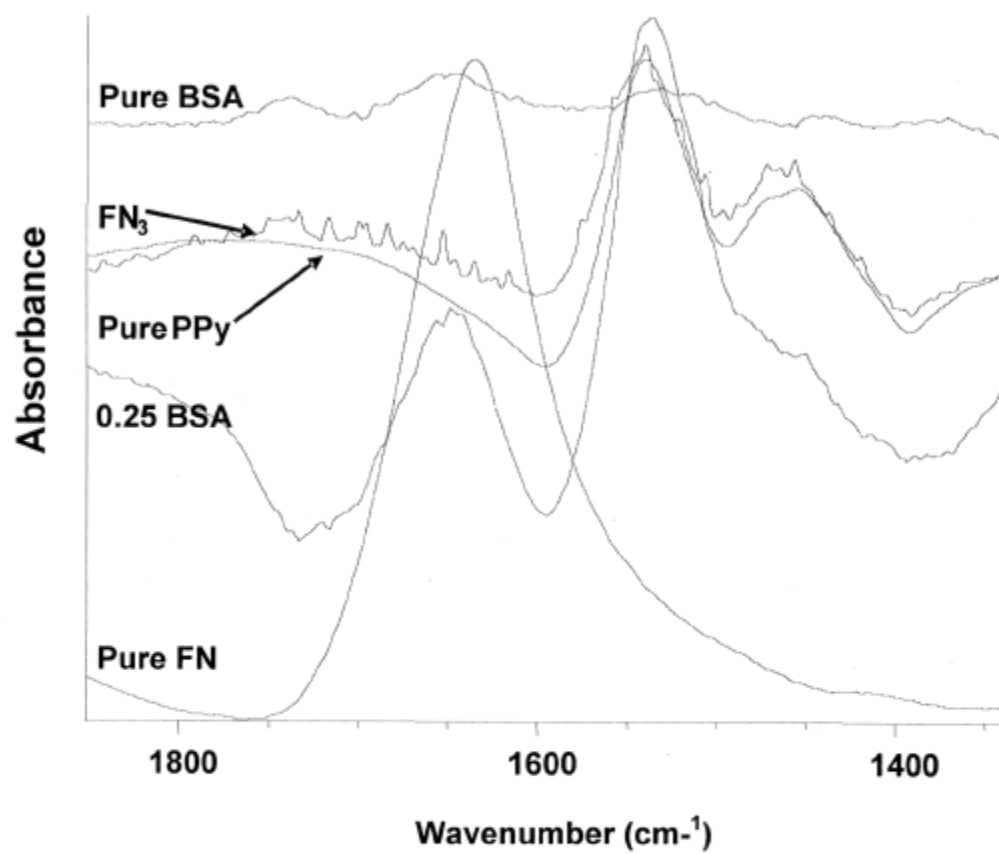


Figure : 4

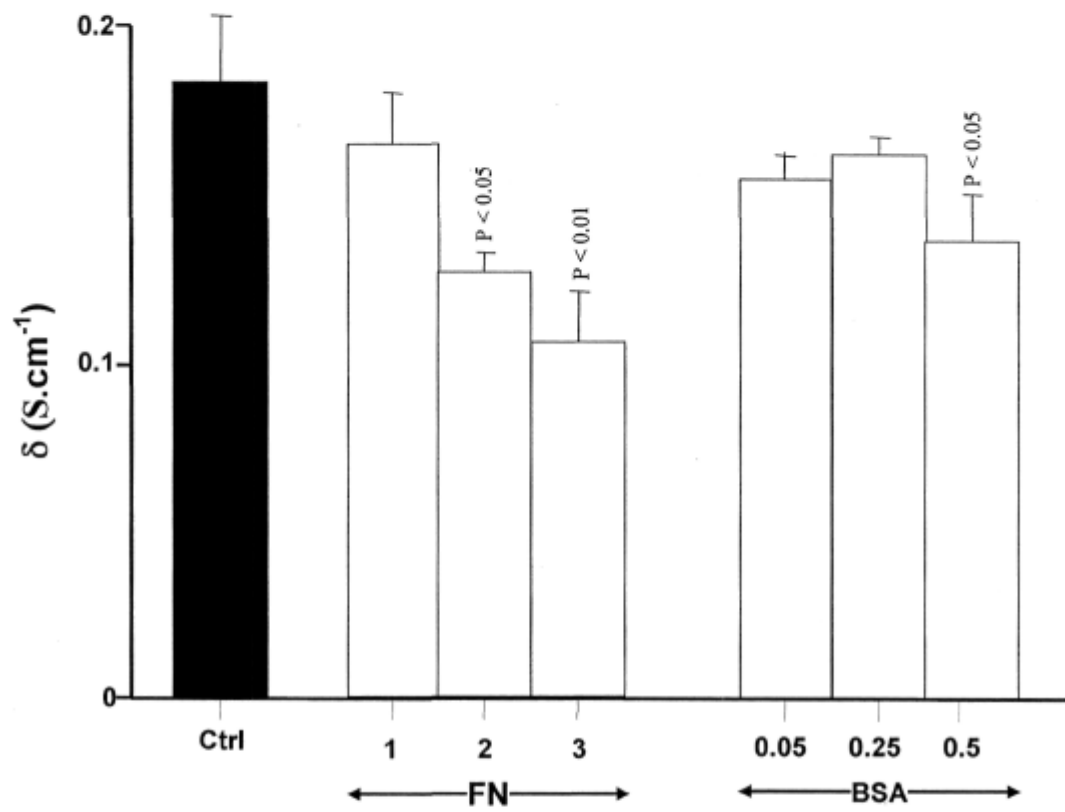


Figure : 5

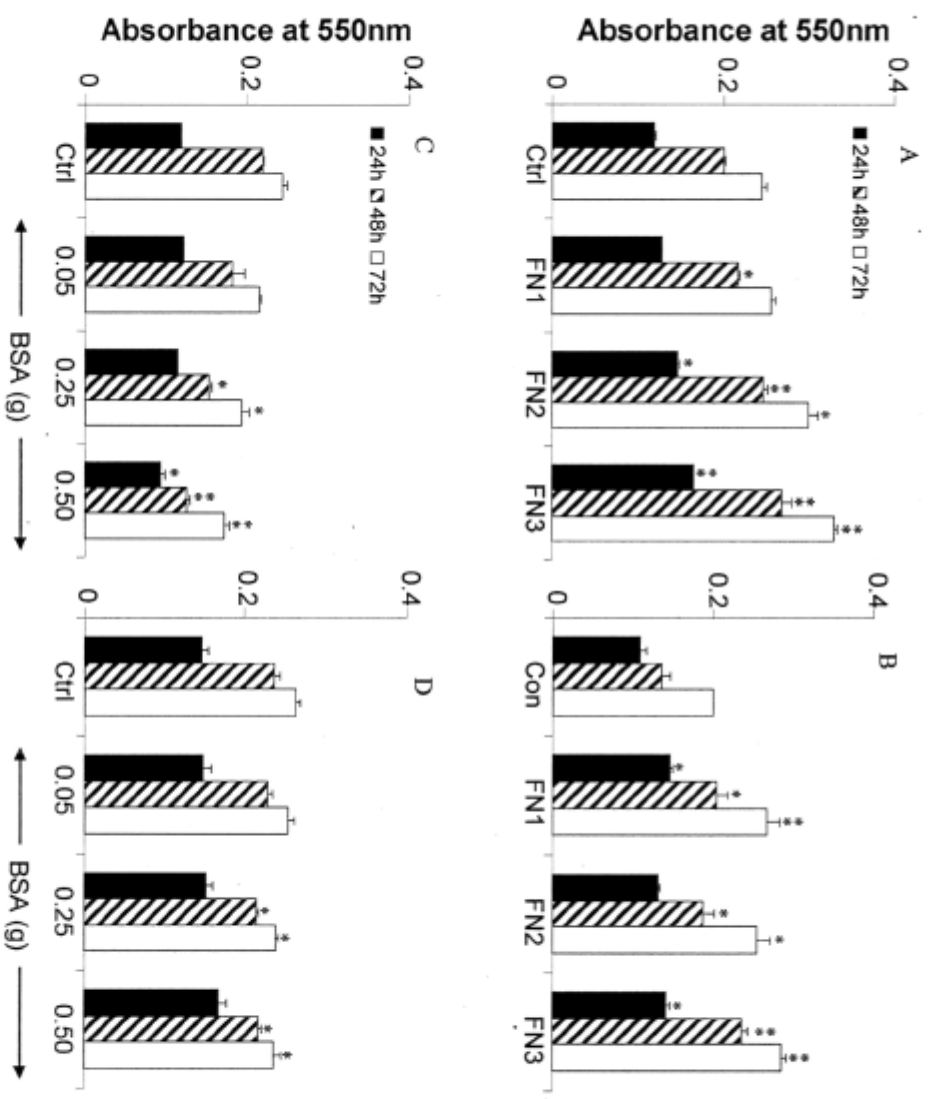


Figure : 6

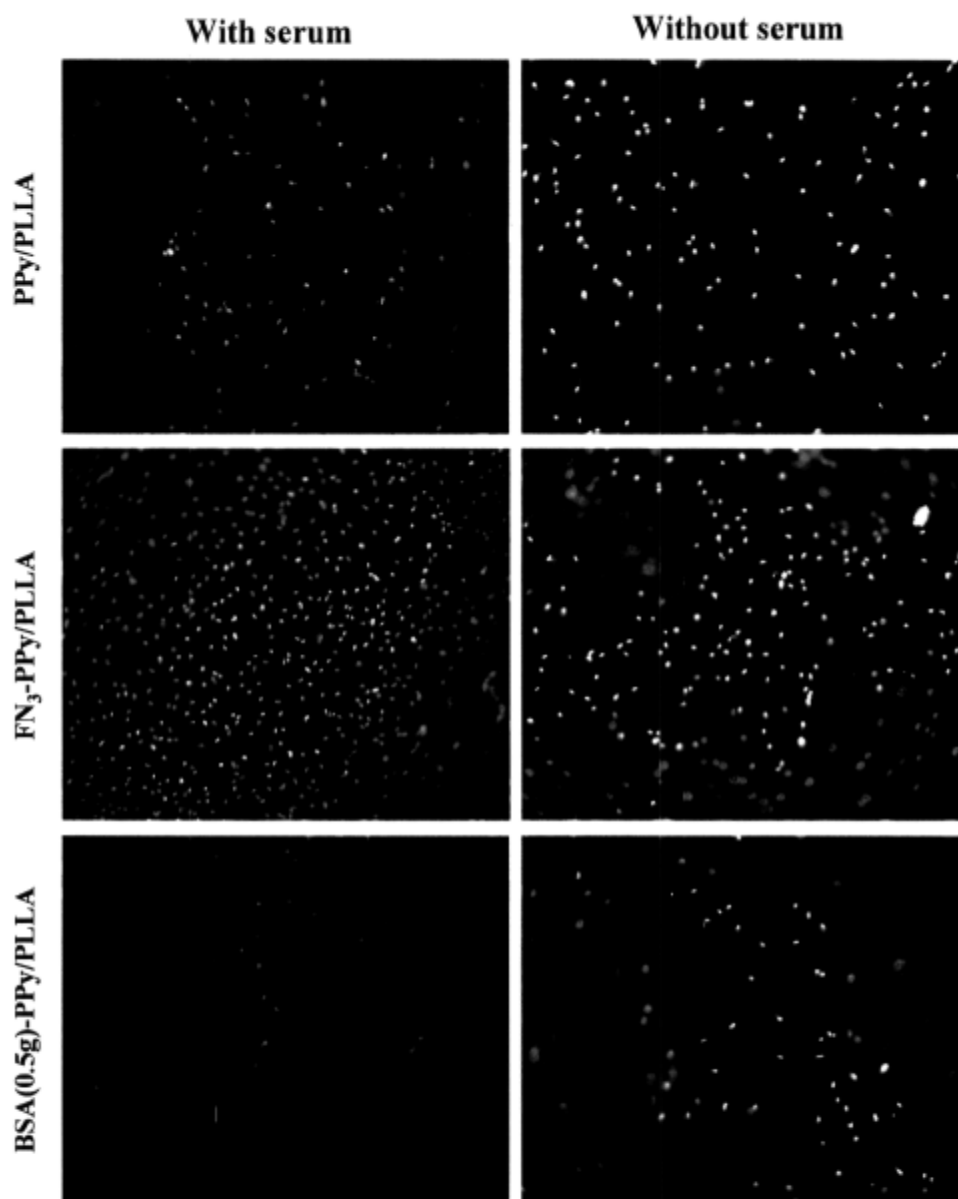


Figure : 7

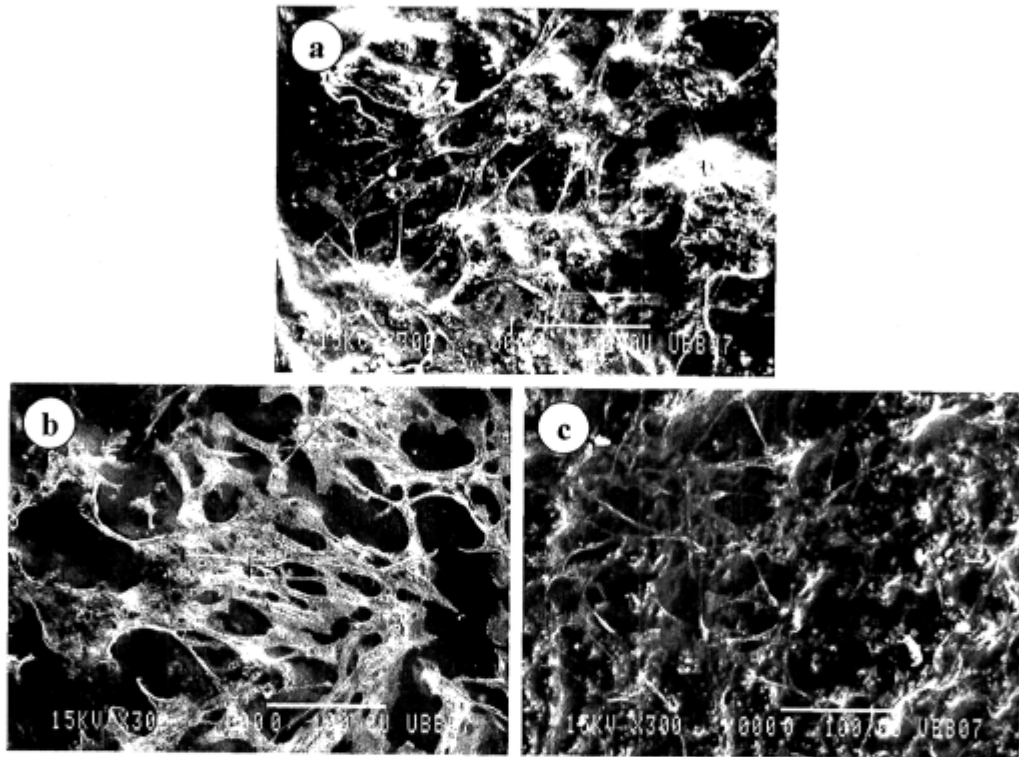


Figure : 8

## CHAPITRE III

### DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION, PERSPECTIVES

La médecine régénératrice représente un moyen de remplacement de tissus ou d'organes suite à des traumatismes imprévus ou causés par des maladies dégénératives. Le développement de cette discipline trouve un essentiel besoin dans la fabrication de nouveaux matériaux étroitement liés aux différentes applications couvertes par la médecine régénératrice.

Les biomatériaux doivent être biocompatibles et s'adapter aux multiples conditions retrouvées *in vivo*. En effet, certaines conditions exigent un biomatériau biodégradable, d'autres exigent un biomatériau non biodégradable. *In vitro*, le biomatériau doit répondre à certaines exigences et posséder une résistance mécanique suffisante. Il doit également respecter les besoins biologiques spécifiques des cellules et des milieux environnants.

Nous nous sommes intéressés à travailler avec du polypyrrole (PPy) qui fait partie de la famille des polymères électro-conducteurs. Ce biomatériau est doté de plusieurs propriétés physiques, chimiques et électriques que nous cherchons pour développer une matrice biodégradable et électriquement conductrice. En combinant le PPy avec le poly(L-lactique acide) (PLLA), nous avons fabriqué des matrices à taux variable en PPy de 5 et 10%. Étant



considéré comme matériau inerte, la bioactivation du PPy est obtenue par l'ajout de protéines (fibronectine et albumine de sérum bovin).

Nous avons réussi à incorporer chimiquement des biomolécules dans le polypyrrole afin de le rendre bioactif tout en conservant ses propriétés physiques, structurales et surtout électriques. Dans cette étude, nous avons choisi deux protéines modèles avec des fonctions d'adhésion opposées, soit la fibronectine (FN) et l'albumine de sérum bovin (BSA). La FN est connue pour promouvoir l'adhésion, la migration (Clark, 1996) et la prolifération cellulaire (Han *et coll.*, 2006). Par contre la BSA diminue l'adhésion cellulaire et l'adsorption de fibrinogène et des protéines plasmatiques (McClary *et coll.*, 2000).

La synthèse du polypyrrole a été réalisée chimiquement en émulsion d'eau dans l'huile, d'où la formation de micelles jouant le rôle de réservoir (Lopez-Quintanella *et coll.*, 1993). En ajoutant nos protéines dans le milieu réactionnel, avant l'addition des monomères pyrrole (Py), on favorise leur piégeage dans ces micelles avec les oxydants. Avec l'ajout de monomères Py dans le système réactionnel, la polymérisation a eu lieu et les protéines sont piégées dans le PPy formé. En outre, la FN et la BSA sont deux protéines négativement chargées, il est très probable que des interactions électrostatiques entre les protéines chargées négativement et le PPy chargé positivement auraient eu lieu au cours de la polymérisation, conduisant au "dopage" *in situ* du PPy par la FN et la BSA. Cela expliquerait la baisse de la teneur en Cl<sup>-</sup> dans les PPy enrichis. Collier *et coll.*, (1999) ont démontré que des polymères anioniques peuvent être incorporés électrochimiquement au PPy en jouant le rôle de codopant en raison de leur forte densité de charge négative.

L'incorporation de la FN et de la BSA n'a provoqué qu'une légère diminution de la conductivité des PPy particules, contrairement à la littérature dont la conductivité a été nettement diminuée (Collier *et coll.*, 1999). Ceci est soutenu par le maintien d'une morphologie microporeuse réalisée par l'assemblage régulier de particules PPy.

Les études du comportement des cellules en contact avec les membranes de PPy/PLLA démontrent que les fibroblastes ont bien adhéré et ont proliféré sur les membranes PPy/PLLA, l'ajout de protéines (FN et BSA) aux PPy particules module de manière significative le comportement des fibroblastes. En effet, les résultats ont démontré que les membranes PPy/PLLA fabriquées avec des particules de PPy enrichies de FN favorisent l'adhérence et la prolifération des fibroblastes. En revanche, les fibroblastes cultivés sur des membranes à base de PPy enrichis de la BSA ont démontré une inhibition à la fois de l'adhésion et de la croissance cellulaire. Ceci démontre l'incorporation efficace de la FN et de la BSA dans le PPy tout en gardant leurs propriétés biologiques et fonctionnelles.

En conclusion, nous avons pu introduire deux molécules dans le PPy tout en gardant les propriétés électriques et structurales du PPy et en ajouter les propriétés biologiques de la FN ou la BSA.

La présence de diverses molécules à la surface des membranes PPy/PLLA peut avoir un impact profond sur l'ancrage et la croissance cellulaire ainsi que sur les phénomènes d'adhésion de différentes molécules plasmatiques et de la matrice extracellulaire. De plus, l'application d'un courant électrique modulerait la croissance et les réponses cellulaires en régulant la synthèse et la production de différents facteurs de croissance, de protéines de la matrice extracellulaire et de protéines inflammatoires jouant un rôle très important dans la régénération tissulaire et le maintien de l'homéostasie. D'où la nécessité de démontrer le "double" effet de la présence des biomolécules à la surface de notre matrice PPy/PLLA en présence de la stimulation électrique et son impact sur l'activité cellulaire. Il faut par conséquent étudier l'effet de cette combinaison sur la production de médiateurs de la matrice extracellulaire tels que les métalloprotéinases (MMP-2 et MMP-13) et leurs inhibiteurs, les cytokines (IL-1, IL-6, IL-13 et IL-22) ainsi que les récepteurs cellulaires impliqués et les protéines associées (Focal Adhesion Kinase).

## RÉFÉRENCES

- Ajioka, M., Enomoto, K., Suzuki, K., Yamaguchi, A.** 1995. *J. Environ. Polym. Degrad.* 3: 225-234.
- Aldissi, M.** 1989. *Makomol. Chem. Makromol. Symp.* 24: 1-20.
- Ali, S.A.M., Zhong, S.P., Doherty, P.J., Williams, D.F.** 1993. *Biomaterials* 14: 648-656.
- Ali, S.A.M., Doherty, P.J., Williams, D.F.** 1993a. *J. Biomed. Mater. Res.* 27: 1409-1418.
- Altman, R., Li, ST.** 1990. *Int. J. Oral. Implantol.* 7: 75.
- Amadori, L., Rajan, N., Vesentini, S., Mantovani, D.** 2007. *Adv. Mater. Res.* 15-17: 83-88.
- Anderson, J.M., Shive, M.S.** 1997. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 28: 5-24.
- Angeli, A.** 1916. *Gazz. Chim. Ital.* 46: 279.
- Angeli, A., Alessandri, L.** 1916. *Gazz. Chim. Ital.* 46: 283.
- Aplin, J.D., Hughes, R.C.** 1982. *Biochim. Biophys. Acta.* 694: 375-418.
- Armes, S. P.** 1987. *Synth. Met.* 20: 365-371.

- Audebert, P., Bidan, G., Lapkowski, M.** 1986. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 887-889.
- Averous, L., Fringant, C.** 2001. *Polym. Eng. Sci.* 41: 727-734.
- Balanda, P.B., Ramey, M. B., Reynolds, J.R.** 1999. *Macromolecules.* 32: 3970-3978.
- Beator, K., Bressel, B., Grapentin, H.-J.** 1992. *Metallobenflache*, 46: 384-389.
- Beauvais-Jouneau, A., Delouee, A., Craig, S. E., Humphries, M. J., Thiery, J. P., Dufour, S.** 1997. *Exp. Cell. Res.* 233: 1-10.
- Behrens, P. Q., Spiekerman, A. M., Brown, J. R.** 1975. *Fed. Proceed.* 34: 591.
- Bhat, N. V., Shaikh, V. B.** 1994. *J. Appl. Pol. Sci.* 53: 187-191.
- Bidan, O., Deronzier, A., Moutet, J.C.** 1984. *Nouv. J. Chim.* 8: 501-503.
- Bittihn, R., Ely, G., Woefltler, F., Munstedt, H., Naarmann, Naegele, H.** 1987. *Makromol. Chem. Makromol. Symp.* 8: 51-59.
- Brown J.R.** 1975. *Fed. Proc.* 34: 591-591.
- Brown, J. R.** 1976. *Fed. Proceed.* 35: 2141-2144.
- Bruck, S.D.** 1990. *Int. J. Artifi. Org.* 13: 469-471.
- Buehler, M. J.** 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 12285-12290.

**Burroughes, J.H., Bradley, D. D. C., Brown, A.R., Marks, R.N., Mackay, K., Friend, R. H., Bum, P.L., Holmes, A. B.** 1990. *Nature*. 347: 539-541.

**Carter, D. C., He, X. M., Munson, S. H., Twigg, P. D., Gernert, K. M., Broom, M. B., Miller, T. Y.** 1989. *Science*. 244: 1195-1198.

**Carter, D. C., Ho, J. X.** 1994. *Adv. Protein Chem.* 45: 153-203.

**Chandra, R., Rustgi, R.** 1998. *Prog. Polym. Sci.* 23: 1273-1335.

**Clark, R.A.F.** 1996. *Plenum Press*. New York, New York, USA. P. 611.

**Collier, J.H., Camp, J.P., Hudson, T.W., Schmidt, C.E.** 2000. *J. Biomed. Mater. Res.* 50: 574-584.

**Cosnier, S., Innocent, C.** 1992. *J. Eletroanal. Chem.* 338: 339-345.

**Dall'Olio, A., Dascola, Y., Varacca, V., Bocchi, V.** 1968. *Acad. Sci. Ser.* 267: 433.

**Dennis, J., Haynesworth, S., Young, R. G., Caplan, A.** 1992. *Cell Transplant.* 1: 23-32.

**Diaz, A. F., Hall, B.** 1983. *IBM. J. Res. Dev.* 27: 342-349.

**Diaz, A.F., Nguyen, M. T., Leclerc, M.** 1995. *Marcel Dekker, New York*, p 555-564.

**Diaz, A.F., Kanazawa, K.K., Gardini, G.P.** 1979. *J. Chem. Soc. Commun.* 14: 635-637.

**Duck, E. A., De Paoli, M. -A., Mastragostino, M.** 1992. *Adv. Mat.* 4: 287-312.

**Fiume, M.Z.** 1998. *Int. J. Toxicol.* 17(Supplement 1): 241-245.

**Foster, J. F.** 1960. F. W. Putnam, editeur. Academic Press, New York. USA. Vol. 1, p.179-239.

**François, B.** 1993. *GFP : Groupement français des polymères.* 9: 87-135.

**Fredriksson, H., Silverio, J., Andersson, R., Eliasson, A.C., Aman, P.** 1998. *Carbohydr. Polym.* 35: 119-134.

**Gardini, G. P.** 1973. *Adv. Heterocycl. Chem.* 15: 67-98.

**Garner, B., Georgevich, A., Hodgson, Al., Liu, L., Wallace, G.G.** 1999. *J. Biomed. Mater. Res.* 44: 121-129.

**G. F. P.** 1992. Groupement français des polymères "Initiation aux propriétés électriques des polymères et applications" *G.F.P.* 9 : 261-293.

**Globus, R. K., Doty, S. B., Lull, J. C., Holmuhamedov, E., Humphries, M. J., Damsky, C. H.** 1998. *J. Cell. Sci.* 111: 1385-1393.

**Goldstein, JD., Tria, AJ., Zawadsky, JP., Kato, YP., Christiansen, D., Silver, FH.** 1989. *J. Bone. Joint. Surg.* 71: 1183-1191.

**Gombotz, W.R., Pettit, D.K.** 1995. *Bioconj. Chem.* 6: 332-351.

**Gopferich, A.** 1996. *Biomaterials* 17: 103-114.

**Gregory, R. V., Kimbrell, W. C., Kuhn, H. H.** 1989. *Synth. Met.* 28: 823-835.

**Greiling, D., Clark, R. A.** 1997. *J. Cell. Sci.* 110: 861- 870.

**Grinnell, F., Feld, M., Minter, D.** 1980. *Cell*. 19: 517-525.

**Gustafson, C.J., Kratz, G.** 2001. *Curr. Opin. Urol.* 11: 275-279.

**Guyton, A.C.** 1982. *Human Physiology and Mechanisms of Disease*. W.B. Saunders, Philadelphia. USA.

**Hahn, L. H., Yamada, K. M.** 1979. *Cell*. 18: 043-1051.

**Han, S. W., Roman, J.** 2006. *Oncogene*. 25: 4341–4349.

**Harkins, W. D.** 1947. *J. Amer. Chem. Soc.*, 69: 1428-1444.

**Hatano, M., Kambara, S., Okamoto, S.** 1961. *J. Polym. Sci.* 51: S26.

**He, X. M., Carter, D. C.** 1992. *Nature*. 358: 209-215.

**Heinze, J.** 1990. Vol. 152. Springer-Verlag. 1-47. Heidelberg. Allemagne.

**Holy, C.E., Dang, S.M., Davies, J.E., Shoichet, M.S.** 1999. *Biomaterials*. 20: 1177-1185.

**Hook, M., Rubin, K., Oldberg, A., Obrink, B., Vaheri, A.** 1997. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79: 726-733.

**Hurrell, S., Cameron, R.E.** 2001. *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 12: 811-816.

**Hurrell, S., Cameron, R.E.** 2002. *Biomaterials*. 23: 2401-2409.

- Hyodo, K., Omac, M.** 1990. *J. Electrochim. Acta.* 35: 1245-1250.
- Iuliano, D., Saavedra, S., Truskey, A.** 1993. *J. Biomed. Mater. Res.* 27: 1103-1113.
- Ivory, D. M., Miller, G. G., Sowa, J. M., Shacklette, L. W., Chance, R. R., Baughman, R. H.** 1979. *Chem. Phys.* 1506-1507.
- Kulkurani, R., Moore, E., Hegeyli, A., Leonard, F.** 1971. *J. Biomed. Mater. Res.* 5: 169-181.
- Kajiya, Y., Tsuda, R., Yoneyama, H.** 1991. *J. Electroanal. Chem.* 301: 155-164.
- Kalb, B., Pennings, A.J.** 1980. *Polymer.* 21: 607-612.
- Kaynak, A., Unsowrth, J., Clout, R., Mohan, A S., Bears, G. E.** 1994. *J. Appl. Polym. Sci.* 54: 269-278.
- Kazuyoschi, T., Tokushige, S., Michio, T.** 1989. *Synth. Met.* 30 :271-296.
- Kragh-Hansen, U.** 1981. *Pharmacol. Riv.* 33: 17-53.
- Kudoh, Y.** 1993. *Kluwer Academie, London. Grande Bretagne.* p.191.
- Langer, R.** 1990. *Science.* 249: 1527-1533.
- Langer, R., Cima, L.G., Tamada, J.A., Wintermantel, E.** 1990a. *Biomaterials.* 11: 738-745.
- Langer, R., Peppas, N.A.** 1981. *Biomaterials.* 2: 201-214.
- Leclerc, M.** 1999. *Adv. Mater.* 11: 1491-1498.



- Lévesque, I., Leclerc, M. 1996. *Chem. Mater.* 8: 2843–2849.
- Li, S.M., Garreau, H., Vert, M. 1990. *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 1: 131-139.
- Li, ST. 1990. 4: 963,146.
- Liang, W., Lei, J., Martin, C.R. 1992. *Synth. Mat.* 52: 227-230.
- Lopez- Quintela, M. A., Rivas, J. 1993. *J. Colloid. Interface Sci.* 158: 446-451.
- Ma, S., Chen, G., Reddi, AH. 1990. *Ann. NY Acad. Sci.* 580: 524–525.
- Machida, S., Miyata, S., Techagumpuch, A. 1989. *Synth. Met.* 31: 311-318.
- Mallapragada, S.K., Narasimhan, B. 1999. 2ème édition: Taylor & Francis, Philadelphia, Pennsylvania, USA. p. 425-437.
- Mandal, T., Mandal, B. 1995. *Polymer.* 36: 1911-1913.
- Mao, H., Pickup, P. 1989. *J. Electroanal. Chem.* 265: 127-142.
- Margolis, E. J., Choi, J. C. S., Shu, W. P., Liu, B. C. 1996. *Cancer Lett.* 100: 163-168.
- McFarland, C., Mayer, S., Scotchford, C., Dalton, B. A., Steele, J., Downes, S. 1999. *J. Biomed. Mater. Res.* 44: 1-11.
- McLachlan, A. D., Walker, J. E. 1977. *J. Mol. Biol.* 112: 543-558.

- McClary, K., Ugarova, T.P., Grainger, D. W.** 2000. *J. Biomed. Mater. Res.* 50: 428-439.
- Meng, S., Rouabhia, M., Shi, G., Zhang, Z.** 2008. *J. Biomed. Mater. Res.* Epub ahead of print.
- Mermillod, M., Tanguy, J., Petiot, F.** 1986. *J. Electrochem. Soc.* 133: 1073-1079.
- Moursi, A. M., Damsky, C. H., Globus, R. K.** 1997. *J. Cell. Sci.* 110: 2187-2196.
- Moursi, A. M., Damsky, C. H., Zimmerman, D., Lull, J., Globus, R. K., Doty, S. B., Aota, S. I.** 1996. *J. Cell. Sci.* 109: 1369-1380.
- Mrksich, M., Chen, C. S., Xia, Y., Dike, L. E., Ingber, D. E., Whitesides, G. M.** 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 10775-10778.
- Munstedt, H.** 1988. *Polymer.* 29: 296-302.
- Myers, R. E.** 1986. *J. Electron. Mater.* 15: 61-69.
- Nalwa, H. S.** 1997. Hand book of organic conductive molecules and polymers, *John Wiley and Sons Inc, New York. USA.*
- Nalwa, H. S., Dalton, L. R., Schmidt, W. F., Rabe, J. G.** 1985. *Polym. Commun.* 27: 240.
- Nimni, ME., Harkness, RD.** 1988. In *Collagen*, Vol. I, MEN imni, Ed., p. 1-78, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ohtani, A., Shimidzu, T.** 1989. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 62: 234-238.

**Orloff, L.A., Domb, A.J., Teomim, D., Fishbein, I., Golomb, G.** 1997. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 24: 3-9.

**Park, H., Park, K.** 1996. *Pharmac. Res.* 13: 1770-1776.

**Peppas, N.A., Langer, R.** 1994. *Science.* 263: 1715-1720.

**Peters, T. Jr.** 1985. *Adv. Prot. Chem.* 37: 161-245.

**Peters, D. M., Portz, L. M., Fullenwider, J., Mosher, D. F.** 1990. *J. Cell. Biol.* 111: 249-256.

**Planche, M. F., Thiéblemont, J.C., Mazars, N. Bidan. G.** 1994. *J. Appl. Polym. Sci.* 52: 1867-1877.

**Price, L. S., Leng, J., Schwartz, M. A., Bokoch, G. M.** 1998. *Mol. Biol. Cell.* 9: 1863-1871.

**Prior, S., Gander, B., Blarer, N., Merkle, H.P., Subirá, M.L.** 2002. *Eur. J. Pharmac. Sci.* 15: 197-207.

**Pulapura, S., Kohn, J.** 1992. *J. Biomat. Appl.* 6: 216-250.

**Rapi, S., Bocchi, V., Gardini, G. P.** 1988. *Synth. Met.* 24: 217-221.

**Ratnayake, W.S., Hoover, R., Shahidi, F., Perera, C., Jane, J.** 2001. *Food Chem.* 74: 189-202.

**Reed, R. G., Putnam, F. W., Peters, T. Jr.** 1980. *Biochem. J.* 191: 867-868.

**Remes, A., Williams, D.F.** 1992. *Biomaterials.* 13: 731-743.

**Reynolds, J. R., Poropatic, P. A., Toyooka, R. L.** 1987. *Synth. Met.* 18: 95-100.

**Rodriguez, J., Grande, H. -J., Otero, T.F.** 1997. Polypyrroles: from basic research to technological applications. In: Nalwa HS (ed) Handbook of organic conductive molecules and polymers, Vol. 2, Chapitre 10. John Wiley and sons, Toronto, Canada. p. 415-468.

**Roth, S., Carroll, D.** 1995. Wiley VCH. Berlin. Germany.

**Ruoslahti, E., Perschbacher, M., Engvall, E., Oldberg, A., Hayman, E. G.** 1982. *J. Invest. Dermatol.* 79 Suppl. 1: 65-68.

**Salmon, M., Kanazawa, K. K., Diaz, A. F., Krounbi, M.** 1982. *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.* 20: 187-193.

**Samuelson, L. A., Druy, M. A.** 1986. *Macromolecules.* 19: 824-828.

**Schmidt, C.E., Shastri, V.R., Vacanti, I.P., Langer R. R.** 1997. *Proe. Nad. Acad. Sci. USA*, 94: 8948-8953.

**Sechler, J. L., Schwarzbauer, J. E.** 1998. *J. Biol. Chem.* 273: 25533-25536.

**Shakesheff, K. M., Oreffo, R. O. C.** 2001. *Bone* 29: 523-531.

**Shi, G., Rouabhia, M., Wang, Z., Dao, L. H., Zhang, Z.** 2004. *Biomaterials.* 25: 2477-88.

**Shirakawa, H., Louis, E., MacDiarmid, J. A. G., Chiang' C. K., Heeger, A. J.** 1977. *Chem. Commu.* 578-580.

- Sichel, E. K.** 1982. Carbon Black-Polymer Composites, *Marcel Dekker, New York, USA.*
- Sottile, J., Hocking, D. C.** 2002. *Mol. Biol. Cell.* 13: 3546-3559.
- Sottile, J. F., Hocking, DC, F. A. U., Swiatek, P. J.** 1998. *J. Cell. Sci.* 111: 2933-2943.
- Stanke, D., Hallensleben, M. L., Toppare, L.** 1993. *Synth. Met.* 55: 1108-1113.
- Stephansson, S. N., Byers, B. A., Garcia, A. J.** 2002. *Biomaterials.* 223: 2527-2534.
- Stone, KR., Steadman, JR., Rodkey, WR., Li, ST.** 1997. *J. Bone. Joint. Surg.* 79: 1770-1777.
- Tesk, J.A.** 2001. *J.Biomed. Mater. Res.* 58: 463-466.
- Therin, M., Christel, P.** 1992. *Biomaterials.* 13: 594-600.
- Velling, T., Risteli, J., Wennerberg, K., Mosher, D. F., Johansson, S.** 2002. *J. Biol. Chem.* 277: 37377-37381.
- Vert, M., Li S., Garreau, J.** 1991. *Control. Release.* 16: 15-26.
- Vert, M., Li, S., Garreau, H., Mauduit, J., Boustta, M., Schwach, G., Engel, R., Coudane, J.** 1997. *Angew. Makromol. Chem.* 247: 239-253.
- Von Recum, A.F., Jenkins, M.E., Von Recum, H.A.** 1999. "Introduction: Biomaterials and biocompatibility," in *Handbook of Biomaterials Evaluation*, A.F.

von Recum, 2ème édition: Taylor & Francis, Philadelphia, Pennsylvania, USA. p. 1-8.

**Walker, J. A., Warren, L. F., Witucki, E. F.** 1987. *Amer. Chem. Soc. (Polymer preprints)*. 28: 256.

**Wang, Y., Rubner, M.F. Buckley, L. J.** 1991. *Synth. Met.* 41-43: 1103.

**Wang, Z., Roberge, C., Dao, L. H., Wan, Y., Shi, G., Rouabhia, M., Guidoin, R., Zhang, Z.** 2004. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 70: 28-38.

**Weiss, R. E., Reddi, A. H.** 1981. *J. Cell. Biol.* 88: 630-636.

**Winklbauer, R., Nagel, M., Selchow, A., Wacker, S.** 1996. *Int. J. Dev. Biol.* 40: 305-311.

**Woodward, S.C.** 1999. "Evaluation by light microscopy," in: in *Handbook of Biomaterials Evaluation*, A.F. von Recum, 2ème édition: Taylor & Francis, Philadelphia, Pennsylvania, USA. p. 599-612.

**Yang, X. B., Roach, H. I., Clarke, N. M. P., Howdle, S. M., Quirk, R., Wyre, R. M., Downes, S.** 2002. *Biomaterials*. 23: 357-364.

**Yang, Y., Glover, R., Ong, J. L.** 2003. *Colloid. Surf.* 30: 291-297.

**Yannas IV, Burke JF.** 1981. *J. Biomed. Mater. Res.* 14: 65-80.

**Yannas IV, Orgill DP, Silver J, Norregaad T, Ervas NN, Schoene WC.** 1985. *Poly. Mater. Sci. Eng.* 53 :216-218.

**Yin, M., Baker, G.L.** 1998. *Polym. Prep* 39: 158-159.

**Yukata, T., Akira, J., Masatoshi, K.** 1990. *Polym. Mater. Sci. Eng.* 63: 742-749.

**Zange, R., Kissel, T.** 1997. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 44: 149-157.

**Zhang, Z., Rouabhia, M., Wang, Z., Roberge, C., Shi, G., Roche, P., Li, J., Dao, L. H.** 2007. *Artif. Organs.* 31: 13-22.

**Zhang, Z., Roy, R., Dugré, F.J., Tessier, D., Dao, L.H.** 2001. *J. Biomed. Mater. Res.* 57: 63-71.