



HAL
open science

Encapsulation de dispositifs symbiotiques implantables : évaluation de la biocompatibilité et des performances

Géraldine Penven

► To cite this version:

Géraldine Penven. Encapsulation de dispositifs symbiotiques implantables : évaluation de la biocompatibilité et des performances. Biotechnologie. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAS046 . tel-01692383

HAL Id: tel-01692383

<https://theses.hal.science/tel-01692383>

Submitted on 25 Jan 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Biotechnologie, Instrumentation, Signal**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Géraldine PENVEN

Thèse dirigée par **Donald Martin** et
co-dirigée par **Philippe Cinquin**

Préparée au sein du **Laboratoire TIMC-IMAG**
dans **l'École Doctorale EDISCE**

Encapsulation de dispositifs symbiotiques implantables : Evaluation de la biocompatibilité et des performances

Thèse soutenue publiquement le **11/07/2016**,
devant le jury composé de :

Pr. François BOUCHER

TIMC-IMAG, Grenoble, Président

Pr. Laurence BORDENAVE

CHU de Bordeaux, Rapporteur

Pr. Loïc J. BLUM

ICBMS, Lyon, Rapporteur

Dr. Sophie Tingry

CR1, IEM, Montpellier, Membre





Thèse

Encapsulation de dispositifs symbiotiques implantables : Evaluation de la biocompatibilité et des performances

Géraldine Penven

Thèse soutenue le : 11/07/16

Laboratoire TIMC-IMAG

Directeur de Thèse : Donald Martin
Co-directeur de Thèse : Philippe Cinquin

Université Grenoble Alpes

Ecole Doctorale de l'Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement
Biotechnologie, Instrumentation, Signal et Imagerie pour la biologie, la médecine et
l'environnement

Remerciements

À l'issue de la rédaction de ce manuscrit, je peux affirmer avec certitude et conviction qu'une thèse est loin d'être un travail solitaire. S'inscrivant dans la durée, elle constitue le fil conducteur d'une tranche de vie. Pour ma part, ce travail doctoral n'aurait jamais pu voir le jour sans le soutien d'un grand nombre de personnes, dont la générosité, le soutien et l'intérêt m'ont permis d'avancer et de progresser chaque jour. Ce sont certaines de ces personnes que j'aimerais mettre en avant dans ces remerciements.

Je souhaiterais tout d'abord remercier le laboratoire TIMC-IMAG, et Philippe Cinquin en particulier, pour m'avoir permis de participer à ce projet de recherche passionnant qu'est « la biopile à glucose ». Philippe, merci de m'avoir fait confiance en me permettant de réaliser cette thèse en parallèle de la reprise de mes études de médecine. Le chemin a été long, et laborieux parfois, mais ton enthousiasme, tes encouragements, ton soutien et tes conseils précieux m'ont permis de gravir des montagnes.

Merci également à mon équipe, SyNaBi, qui m'a permis d'avancer lorsque j'en avais le plus besoin : Abdel, Don, Jacques, Jean-Pierre, Lavinia, Sarra. Un grand merci à l'équipe BioMMat, qui m'a conseillée, aidée et guidée, mais qui m'a aussi adoptée pour le déjeuner et les pauses café.

Un immense merci à l'IEM (Montpellier), en particulier à Mihail Barboiu, Yves-Marie Legrand et Alina Cristian, pour leur aide précieuse, leur gentillesse et leur accueil chaleureux. Grâce à eux mon travail de recherche s'est étoffé et construit sur des bases solides, indispensables pour la suite.

Merci à toutes les personnes qui m'ont aidée, de près ou de loin, à faire avancer mon travail de recherche : Jean Boutonnat (IBP, Grenoble), Naceur Belgacem et toute son équipe (LGP2, Grenoble), Aziz Bakri et Nawel Khalef (UFR de Pharmacie, Grenoble).

Bien évidemment, je n'aurais pas pu parvenir au bout de ce projet sans le soutien infaillible de mon entourage.

Merci à vous, chers parents, pour vos encouragements, votre écoute patiente et bienveillante. Merci également de m'avoir soutenu dans ma reconversion, et de me permettre de m'épanouir chaque jour dans ce que je fais. Clémence, merci pour ton regard compréhensif et ta présence à mes côtés quand il m'était si difficile de travailler. Je souhaiterais également remercier mes grands-parents bretons d'être venus de loin pour me soutenir et m'encourager.

Merci à tous mes amis, d'enfance, d'école d'ingénieur ou de médecine : Amélie, Anne, Camille, Caroline, Cécile, Clémence, Gérald, Jean-Jacques, Laurent, Louise A, Louise B, Louise D, Marion, Méline, Pauline, Rémi, Romain S, Simon, Sophie, Stéphane, Valence. Une « casse-dédi » spéciale à Gabriel et Chris : merci les gars, je ne sais pas comment j'aurais fait sans vous !

Il me reste à remercier la personne qui a été présente tous les jours à mes côtés, sans jamais faillir, et sans qui je n'aurais pas tenu bon, sans qui tout ça n'aurait jamais été possible. Romain, merci pour ta patience, tes nombreux conseils, ton aide inestimable sur la fin de ce travail, tes bons petits plats et tout ce que tu fais pour que je puisse réaliser mon nouveau grand projet.

J'oublie probablement des personnes et je m'en excuse d'avance... En tous les cas merci à tous d'avoir cru en moi et de m'avoir accompagné jusqu'à ce jour important et unique, je suis émue et fière d'être si bien entourée.

« En persévérant, on arrive à tout. »

(Théocrite)

Afin de répondre à une demande de soins et traitements toujours mieux adaptés et plus performants, des dispositifs médicaux implantables (DMI) ont vu le jour. Il s'agit actuellement de dispositifs isolés et autonomes à l'intérieur de l'organisme hôte, dont la fonction ne nécessite pas d'interaction avec celui-ci, ou uniquement dans un sens (par la libération de molécules par exemple). Une nouvelle génération de DMI dont le fonctionnement s'appuie sur des échanges continus avec l'organisme vivant est toutefois en cours de développement, et un des points clés de leur élaboration est l'enrobage. En effet, l'interface entre le DMI et le corps joue un rôle primordial puisqu'elle doit assurer une symbiose parfaite entre ces derniers. Les mécanismes inflammatoires et immunitaires étant si complexes et puissants, il est nécessaire de protéger ces dispositifs tout en leur permettant de communiquer avec l'organisme hôte. En outre, cette barrière protège aussi le corps d'éventuels éléments agressifs libérés par l'implant. Ainsi, le travail de recherche décrit dans ce manuscrit concerne la fabrication et la caractérisation d'un matériau qui peut être utilisé pour enrober des dispositifs symbiotiques implantables.

Dans ce contexte, les hydrogels d'alcool polyvinylique (Poly(vinyl alcohol) : PVA) polymérisés physiquement par un procédé de congélation/décongélation se sont révélés particulièrement intéressants. En effet, leur structure semi-cristalline permet de modifier leur porosité et leurs propriétés mécaniques en faisant varier les paramètres de fabrication. Nous avons donc caractérisé physico-chimiquement les hydrogels de PVA (propriétés mécaniques, porosité, diffusivité), avant d'étudier leur biocompatibilité *in vitro* et *in vivo*. Pour finir, nous nous sommes concentrés sur un DMI particulier qu'est la biopile à glucose implantable, en analysant les performances du PVA en tant qu'enrobage d'électrodes.

Ainsi, nous avons déterminé un procédé de fabrication permettant d'obtenir une membrane enrobante solide et facile à manipuler, poreuse afin de laisser diffuser le glucose et l'oxygène de manière optimale jusqu'à l'électrode, et protectrice vis-à-vis des protéines de l'organisme de plus grandes tailles.

Abstract

The development of implantable medical devices (IMD) provides for more efficient treatment in specific healthcare applications. Such devices are isolated and autonomous within the host organism. Their function does not usually require any input from the host, with the main function of the IMD being typically to stimulate tissues (e.g. muscles, nerves) or to release molecules (e.g. osmotic pump). New generations of IMD that rely on the on continuous duplex interactions with the living organism are being developed. The key aspect of such IMD is the interface with the internal environment of the body. This interface plays a crucial role because it must ensure a perfect symbiosis between the IMD and the host. For example, the interface must both protect the IMD from the complex and powerful inflammatory and immune mechanisms in addition to providing an efficient communication pathway with the host organism. Furthermore, this interface also protects the body from the potentially aggressive elements that can be released by the IMD. The research described in this manuscript is focused to the manufacture and characterisation of a material that can be used to coat IMD so as to optimise both the biocompatibility and efficient functions of the IMD.

In this context, the research described here has focused on hydrogels of polyvinyl alcohol (PVA) physically polymerized by a freeze/thaw method. Indeed, the semi-crystalline structure of PVA allows modification of the porosity and mechanical properties by varying the parameters of the production process. We therefore performed physico-chemical characterisations of PVA hydrogels (mechanical properties, porosity and diffusivity) before studying in vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility. We tuned the PVA membranes to a specific IMD that relied upon duplex communication for its function (i.e. the implantable glucose biofuel cell) and analyzed the performance of PVA to provide an optimised coating. The results report an optimised manufacturing process for PVA that provides for the IMD (i) a solid and easily handled membrane, (ii) a porous membrane optimised for the diffusion of glucose and oxygen to the IMD bioelectrodes, and (iii) a protective membrane against proteins of larger dimension.

Table des matières

Remerciements	3
Résumé.....	5
Abstract	7
Abréviations	11
Table des illustrations.....	13
Introduction.....	17
Chapitre I. La biopile à glucose.....	21
A. Contexte	21
B. Principe de fonctionnement.....	22
C. Fabrication.....	25
D. Enjeux	26
Chapitre II. Choix du matériau d'enrobage.....	29
A. Biomatériaux et DMI	29
1. Définitions	29
2. Prothèse tissulaire.....	31
3. DMI isolés	32
4. DMI non isolés.....	33
B. Les hydrogels.....	34
1. Généralités	34
2. Mécanismes de gélification.....	35
C. Le PVA.....	36
1. Structure et Propriétés.....	36
2. Cristallisation du PVA	37
3. Hydrogels fabriqués par congélation/décongélation de solutions aqueuses de PVA	39
4. Atouts et défauts du PVA polymérisé physiquement	45
5. Utilisation du PVA dans le domaine médical.....	45
Chapitre III. Caractérisation physico-chimique du PVA	47
A. Méthode de fabrication des gels de PVA	47
B. Analyse de la structure interne	49

1.	Composition chimique par spectroscopie FTIR	49
2.	Cristallinité par diffraction de rayons X.....	55
3.	Porosité par porosimétrie au Mercure.....	59
C.	Propriétés mécaniques.....	65
1.	Gonflement	65
2.	Elasticité et robustesse.....	69
D.	Semi-perméabilité	74
1.	Diffusion du glucose	74
2.	Seuil de coupure par FRAP	80
E.	Conclusion	86
Chapitre IV.	Biocompatibilité du PVA.....	89
A.	Études <i>in vitro</i>	89
1.	Élimination du DMSO	89
2.	Culture cellulaire	92
B.	Étude <i>in vivo</i> : implantation du matériau.....	102
1.	Protocole	102
2.	Intégration des membranes dans l'organisme.....	103
3.	Diffusion après implantation.....	110
C.	Conclusion	111
Chapitre V.	Enrobage des électrodes	113
A.	Méthode d'encapsulation	113
1.	Modifications apportées aux électrodes.....	113
2.	Avantage lié à l'élasticité de l'hydrogel de PVA	114
3.	Capacité d'auto-cicatrisation d'un hydrogel de PVA.....	115
4.	Protocole d'encapsulation.....	116
B.	Fonctionnement des électrodes enrobées.....	118
1.	Influence de l'enrobage en PVA sur la réponse électrochimique	118
2.	Diffusion de l'oxygène jusqu'à la cathode.....	123
3.	Diffusion du glucose jusqu'à l'anode.....	124
C.	Conclusion	126
Conclusion générale		127
Perspectives.....		131
Bibliographie.....		133

Abréviations

CS	Chitosan
DMI	Dispositif Médical Implantable
DMSO	Dimethyl Sulfoxyde, diméthylsulfoxyde
DRX	Diffraction de rayons X
e-PTFE	Polytétrafluoroéthylène
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide (centre redox)
FITC	Fluorescein isothiocyanate, fluorescéine isothiocyanate
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching, redistribution de fluorescence après photoblanchiment
FTIR	Fourier Transform InfraRed spectroscopy, spectroscopie infra-rouge à Transformée de Fourier
GOx	Glucose oxydase
PBS	Phosphate Buffered Saline, tampon de phosphate salin
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEG	Polyéthylène glycol
PET	Polytéréphtalate d'éthylène
pHEMA	Polyhydroxyethylmetacrylate
PLA	Poly(lactic acid), acide polylactique
PLG	Poly(glycolic acid), acide polyglycolique
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid), copolymère d'acides polylactique et polyglycolique
PU	Polyuréthane
PVA	Poly(vinyl alcohol), alcool polyvinylique
PVAc	Poly(vinyl acetate), acétate polyvinylique

Table des illustrations

Figure 1: Schéma du fonctionnement de la biopile à glucose	23
Figure 2: Procédé de fabrication de la biopile.....	25
Figure 3: Enrobage d'une biopile (constituée de 2 électrodes disposées côte à côte) avec du Dacron .	26
Figure 4: Schéma montrant (en pointillés verts) la position de la membrane supplémentaire d'encapsulation. Les motifs en « Y » symbolisent les anticorps, les cercles orange symbolisent les molécules de glucose et d'oxygène, les cercles bleu turquoise symbolisent les enzymes fixées sur les électrodes. On notera que la position en vis-à-vis des électrodes constitue un exemple de disposition.	27
Figure 5 : Tableau récapitulatif de différents matériaux enrobant les DMI et de leurs propriétés	34
Figure 6: Classification des différents mécanismes de gélification. Pour l'encapsulation de la biopile nous avons retenu la méthode physique créant des liens forts par cristallisation (colonne centrale). Voir les explications dans le texte.	36
Figure 7: Formule chimique de l'alcool polyvinylique ou en anglais « poly(vinyl alcohol) » (PVA)...	37
Figure 8: Formule chimique du PVA partiellement hydrolysé (a) versus celle du PVA totalement hydrolysé (b).....	37
Figure 9: Représentation schématique de la structure du PVA, un polymère semi-cristallin.....	38
Figure 10: Modèle de la structure de l'hydrogel de PVA selon Yokoyama et al. [73]	40
Figure 11 (de gauche à droite et de haut en bas): Gonflement, Résistance à l'étirement et Pourcentage d'élongation en fonction des concentrations en PVA et en DMSO à $T_{\text{congélation}} = -20^{\circ}\text{C}$ [76]	41
Figure 12 (de gauche à droite et de haut en bas): Résistance à l'étirement, Gonflement et Transparence en fonction de la concentration en DMSO et de la température de congélation pour 8 %wt de PVA [76]	42
Figure 13: Contenu en eau des gels de PVA en fonction du temps de congélation et du nombre de cycles [77]	43
Figure 14: Déformation élastique en fonction de la contrainte compressive (kPa) et du nombre de cycles [77]	44
Figure 15: Moule de fabrication des membranes en PVA	47
Figure 16: Membrane en PVA (épaisseur = 1 mm ; diamètre = 3.5 mm).....	48
Figure 17: Principe de la Réflexion Totale Atténuée.....	50
Figure 18: Spectromètre IEM (Nicolet-710 FT IR Spectrometer)	51
Figure 19: Spectres Infra-Rouge témoins : PVA pur sous forme de poudre (noir), DMSO pur liquide (violet), eau distillée (vert)	52

Figure 20: Comparaison des spectres IR d'une membrane humide (bleu) ou sèche (rouge) de PVA, fabriquée par un même procédé de fabrication, à ceux du PVA pur sous forme de poudre (noir) et de l'eau distillée (vert)	53
Figure 21: Comparaison des spectres IR de différentes membranes en fonction du nombre de cycles de congélation/décongélation : PVA à 10 % dans une solution aqueuse à 80 % de DMSO, 3 (jaune) / 5 (orange) / 10 (rouge) / 15 (marron) cycles	54
Figure 22 : Comparaison des spectres IR de différentes membranes en fonction de la présence (jaune) ou non (bleu) de DMSO dans le procédé de fabrication (pour un nombre de cycles fixé à 3).....	54
Figure 23: Spectres DRX de membranes de PVA à l'état humide	56
Figure 24: Spectres DRX de membranes de PVA sèches	57
Figure 25: Pénétrromètre	60
Figure 26: Caractéristiques d'injection et d'extraction brutes.....	61
Figure 27: Caractéristique d'intrusion après traitement	62
Figure 28: Porosimètre au Mercure IEM.....	63
Figure 29: Evolution de la masse des hydrogels de PVA en fonction du temps de rinçage et du nombre de cycles de congélation/décongélation, pour des hydrogels coulés dans le fond de boîtes de Pétri	66
Figure 30: Evolution de la masse des hydrogels de PVA en fonction du temps de rinçage et du nombre de cycles de congélation/décongélation, pour des hydrogels coulés entre deux lames de verre et un moule en silicone.....	68
Figure 31: Rhéomètre utilisé, Positionnement de la membrane dans les mors (Anton Paar Physica MCR301 - Géométrie UXF12, Four CTD180)	70
Figure 32: Contrainte en fonction de la déformation d'un hydrogel de PVA.....	71
Figure 33: Pourcentage de déformation à la rupture	71
Figure 34: 1 ^{er} Module d'élasticité (Pa)	72
Figure 35: 2 ^{ème} Module d'élasticité (Pa)	73
Figure 36: Cellule de diffusion <i>PermeGear</i>	75
Figure 37: Cellule de diffusion horizontale à deux chambres [98]	75
Figure 38: Concentration du glucose dans le compartiment récepteur en fonction du temps	76
Figure 39: Régression linéaire des courbes de diffusion à l'état stationnaire	77
Figure 40: Calcul du coefficient de diffusion effectif du glucose	78
Figure 41: Schéma explicatif du FRAP.....	82
Figure 42: Recouvrement de fluorescence de la fluorescéine après photoblanchiment (1 cycle).....	83
Figure 43: Recouvrement de fluorescence du FITC-10S après photoblanchiment (1 cycle).....	83
Figure 44: Recouvrement de fluorescence du FITC-70S après photoblanchiment (1 cycle).....	84
Figure 45: Fluorescence à l'intérieur de la membrane de PVA pour les différentes molécules testées .	85
Figure 46: Courbe d'étalonnage en fonction de la concentration en DMSO	90
Figure 47: Zone d'intérêt de la courbe d'étalonnage.....	91

Figure 48: Détermination de la concentration en DMSO des eaux de rinçage à J1 et J2.....	92
Figure 49: Photo de cellules à la surface d'une membrane de PVA.....	94
Figure 50: Conversion de l'image précédente en 8 bits.....	94
Figure 51: Repérage et contourage des cellules.....	95
Figure 52: Cellules à la surface du PVA (gauche) vs au fond du puits (droite) après 17 jours de culture, pour une stérilisation aux rayons γ (haut) versus une stérilisation à l'éthanol (bas). Il s'agit de membranes de PVA ayant subi 1 cycle de congélation/décongélation.....	96
Figure 53: Tableau récapitulatif des coefficients de circularité et de rondeur calculés pour des membranes de 1, 2 ou 3 cycles, selon qu'elles aient été stérilisées à l'éthanol ou aux rayons γ , à différentes durées de culture.....	97
Figure 54: Répartition des cellules selon leur coefficient de circularité pour une membrane de PVA ayant subi 1 cycle de congélation/décongélation.....	99
Figure 55: Répartition des cellules selon leur coefficient de circularité pour une membrane de PVA ayant subi 3 cycles de congélation/décongélation.....	99
Figure 56: Cellules à la surface des membranes de PVA après 10 jours de culture.....	100
Figure 57: Cellules à la surface des membranes de chitosan/parylène/acétate de cellulose après 10 jours de culture.....	102
Figure 58: Membranes après 24 jours d'implantation.....	104
Figure 59: Membranes après 49 jours d'implantation.....	104
Figure 60 : Membranes après 99 jours d'implantation.....	104
Figure 61 : Membranes après 171 jours d'implantation.....	104
Figure 62: Membranes après 232 jours d'implantation.....	105
Figure 63 : Membranes après 275 jours d'implantation.....	105
Figure 64: Liseré de polynucléaires neutrophiles (PNN) et globules rouges (GR) bordant la membrane de PVA après 24 jours d'implantation (coloration HES).....	107
Figure 65: Tissu enrobant la membrane de PVA après 24 jours d'implantation. Il est composé d'une bordure de cellules inflammatoires et d'un tissu conjonctif avec des fibroblastes (coloration HES) .	107
Figure 66 : Tissu enrobant la membrane de PVA après 49 jours d'implantation. Bordure de cellules inflammatoires et tissu conjonctif avec des fibroblastes (coloration HES).....	107
Figure 67: Tissu enrobant la membrane de PVA après 99 jours d'implantation. La bordure de cellules inflammatoires est moins importante qu'auparavant, et le tissu conjonctif est toujours présent (coloration HES).....	108
Figure 68: Nodule de tissu conjonctif très dense formant des cavités dont les centres sont parfois nécrotiques avec quelques dépôts de minéralisation. Gangue enrobante très fibreuse (coloration HES).....	108
Figure 69: Tissu enrobant la membrane de PVA après 171 jours d'implantation, essentiellement composé de tissu conjonctif très fibreux (coloration HES).....	108

Figure 70: Nodule de tissu conjonctif très dense formant des cavités dont les centres sont nécrotiques avec quelques dépôts de minéralisation (coloration HES)	108
Figure 71: Tissu enrobant la membrane de PVA après 232 jours d'implantation. Fine lame de tissu conjonctif enrobée de tissu adipeux vascularisé (coloration HES)	109
Figure 72: Enroulement constitué d'un nodule de tissu conjonctif très dense et de tissu adipeux fortement vascularisé (coloration HES)	109
Figure 73: Tissu enrobant la membrane de PVA après 275 jours d'implantation. Léger tissu cicatriciel inflammatoire et fine lame de tissu conjonctif très fibreux (coloration HES).....	109
Figure 74: Enroulement constitué de tissu adipeux fortement vascularisé et de quelques zones de tissu conjonctif très dense (coloration HES).....	109
Figure 75: Nouveau design d'électrode utilisant un liant (polyacrylate de sodium) pour le renforcement mécanique de la pastille, avec une connexion électrique au cœur de celle-ci.....	114
Figure 76: Électrode réalisée avec la méthode de fabrication initiale, recouverte d'une membrane de chitosan scellée grâce à un bourrelet de silicone biocompatible enrobant la totalité de la pastille.	115
Figure 77: Electrode enrobée d'une capsule de PVA scellée autour du fil électrique	116
Figure 78: Procédure d'encapsulation d'une électrode : 1-Cristallisation d'une membrane de PVA ; 2-Mise en forme de la membrane autour d'un fantôme grâce à un lien de latex ; 3-Rinçage du DMSO contenu dans la membrane de PVA ; 4-Lien de latex retiré ; 5-Fantôme retiré grâce à une pince sur mesure ; 6-Électrode sèche ; 7-Enrobage de la pastille avec la membrane de PVA préformée ; 8-Mise en place du lien de latex autour du fil électrique et de la membrane ; 9-Scellement de l'enrobage de PVA; 10-Découpage aux ciseaux du surplus de membrane ; 11-Renforcement du scellement grâce à une gaine de polymère thermo rétractable ; 12-Déshydratation pendant 48h à température ambiante avant stérilisation.....	117
Figure 79: Montage à 3 électrodes	119
Figure 80: Schéma de l'électrode de carbone vitreux	119
Figure 81: Tracés de l'impédance de l'électrode avec (rouge) et sans (bleu) membrane de PVA sur un diagramme de Nyquist ($f = 0,1-10$ kHz, $V = 200$ mV)	120
Figure 82: Diagramme voltampérométrie cyclique pour un système redox idéal.....	121
Figure 83: Tracés de voltamétrie cyclique avec (rouge) et sans (bleu) membrane de PVA sur l'électrode (vitesse de balayage du potentiel = 50 mV/s).....	122
Figure 84: Schéma d'une électrode enrobée d'une membrane de PVA	123
Figure 85: Tracés de chronoampérométrie avec (rouge) et sans (bleu) membrane de PVA sur la cathode ($V = 300$ mV).....	124
Figure 86: Tracés de chronoampérométrie avec (rouge) et sans (bleu) membrane de PVA sur l'anode ($V = 0$ mV)	125
Figure 87: Electrode sans enrobage effritée après hydratation.....	126
Figure 88: Electrode enrobée d'une membrane de PVA après hydratation	126

Introduction

Au cours du XX^{ème} siècle, les progrès simultanés de la médecine et des domaines scientifiques tels que la micro-électronique, la robotique, la chimie et la biologie, ont inspiré les chercheurs en quête de traitements et de soins toujours mieux adaptés et plus performants. Ainsi, des dispositifs médicaux ont vu le jour et les dispositifs médicaux implantables (DMI) en particulier.

Leur objectif est d'améliorer la prise en charge et/ou le traitement de maladies chroniques comme les troubles du rythme cardiaque, l'incontinence urinaire ou le diabète par exemple. Ainsi, des électrodes envoyant des impulsions électriques au muscle cardiaque peuvent être implantées afin de contrôler son rythme, ce dispositif bien connu est le pacemaker. Un autre DMI innovant est le sphincter urinaire artificiel « robotisé » [1, 2, 3] : il consiste à remplacer le mécanisme de pompe manuelle par un système implantable comprenant des mini-capteurs et une mini-pompe intelligente. Grâce à une télécommande, le patient peut manier ce dispositif avec facilité et le médecin peut personnaliser l'implant après la pose. La pompe à insuline [4, 5] est un autre système automatisé visant à faciliter la vie des patients atteints de diabète insulino-requérant en délivrant de petites doses d'insuline tout au long de la journée, et en permettant également au patient de délivrer quelques doses supplémentaires au moment des repas.

De tels dispositifs peuvent améliorer considérablement la qualité de vie des malades, c'est pourquoi de gros efforts sont aujourd'hui déployés afin de créer des systèmes innovants dans différents domaines médicaux. Des études récentes montrent que 5 à 6 % de la population des pays industrialisés ont déjà utilisé un DMI pour remplacer une fonction du corps, améliorer leur qualité de vie ou en augmenter sa durée [6].

Les DMI actuellement commercialisés fonctionnent de manière parfaitement autonome à l'intérieur de l'organisme, sans aucune communication avec ce dernier, ou uniquement dans un sens (en délivrant une molécule, comme l'insuline par exemple). Ils sont enrobés d'un matériau isolant (comme le silicone ou le téflon) leur permettant d'être protégés contre les attaques du système immunitaire et également de ne pas déclencher de réactions inflammatoires ou toxiques néfastes pour l'hôte. Dans le cas particulier du pacemaker, un boîtier imperméable contenant la source d'énergie est relié au cœur via des sondes. Celles-ci sont constituées d'une âme conductrice et d'une gaine isolante, et positionnées dans différentes cavités cardiaques selon les modèles. L'ensemble de ce dispositif est isolé de l'organisme hôte grâce à un enrobage particulier jouant un rôle protecteur pour lui-même et pour le corps.

D'autres dispositifs implantables en cours de développement fonctionneraient, au contraire, grâce à des échanges continus avec l'organisme hôte. Par exemple, de nombreuses études sont actuellement menées sur le microbiote intestinal et ses liens avec certaines maladies. En effet, nous savons aujourd'hui que le microbiote intestinal est un régulateur majeur de l'immunité et qu'il participe intensément à la régulation de l'expression génique de l'hôte. Ainsi, de nombreux chercheurs développent des dispositifs interagissant avec le microbiote intestinal, ou le simulant, afin d'utiliser son fonctionnement intrinsèque à des fins médicales.

Sur le même modèle, des dispositifs symbiotiques sont en cours de développement et un des points clefs de leur élaboration est leur enrobage. En effet, l'interface entre le DMI et le corps joue un rôle primordial puisqu'elle doit assurer une compatibilité parfaite entre l'implant et son hôte. Les mécanismes inflammatoires et immunitaires sont si complexes et puissants qu'il est nécessaire de protéger ces dispositifs tout en leur permettant de communiquer avec l'organisme hôte. En outre, cette barrière protège aussi le corps d'éventuels éléments agressifs libérés par l'implant. Ainsi, le travail de recherche décrit dans ce manuscrit concerne la fabrication et la caractérisation d'un matériau qui peut être utilisé pour enrober des dispositifs symbiotiques implantables.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée plus particulièrement à l'enrobage d'une biopile enzymatique développée au sein du laboratoire TIMC-IMAG (équipe SyNaBi) : la biopile à glucose [7, 8, 9]. Celle-ci permet de produire un courant électrique à partir des ressources du corps humain que sont le glucose et l'oxygène, l'objectif étant d'alimenter d'autres DMI tels que le pacemaker, la pompe à insuline ou le sphincter urinaire artificiel par exemple. Le glucose et l'oxygène étant constamment présents dans l'organisme, ils constituent une ressource inépuisable et directement accessible pour un dispositif implanté. La biopile est composée de deux électrodes où ont lieu des réactions enzymatiques : réactions d'oxydo-réduction qui produisent des électrons captés par un élément conducteur. De manière résumée, les électrodes décrites dans ce manuscrit sont constituées d'enzymes préalablement liées à des nanotubes de carbone, grâce à un polymère permettant la cohésion entre ces deux éléments. Un contact électrique sur chaque électrode et une isolation par du silicone biocompatible sont ensuite réalisés.

Les caractéristiques requises pour le matériau enrobant sont (i) la perméabilité au glucose et à l'oxygène afin que ces éléments venant des fluides corporels arrivent jusqu'aux enzymes des électrodes, et (ii) la biocompatibilité de la biopile. Mon travail a donc consisté à concevoir une membrane enrobante et protectrice, qui confère à la biopile une interface biocompatible et semi-perméable. Pour cela, le matériau utilisé doit être souple mais robuste, avec une porosité contrôlable, biocompatible mais non biodégradable. Dans ce contexte, les hydrogels d'alcool polyvinylique (Poly(vinyl alcohol) : PVA) polymérisés physiquement par un procédé de congélation/décongélation ont été sélectionnés aux vues de leurs propriétés rapportées dans la littérature scientifique.

Dans un premier temps, mon travail a porté sur l'optimisation des paramètres de fabrication des hydrogels de PVA et sur leur caractérisation physico-chimique. Pour cela j'ai étudié leurs propriétés mécaniques, leur porosité et leur diffusivité en fonction des paramètres de fabrication. Ensuite, je me suis concentrée sur la biocompatibilité du PVA *in vitro* et *in vivo* en étudiant sa toxicité, son influence sur des cellules en culture, et son incorporation par un organisme vivant. Pour finir, j'ai analysé les performances du PVA en tant qu'enrobage des électrodes de la biopile à glucose.

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre du projet ANR-Investissement d'Avenir IBFC (Implantable BioFuel Cells), piloté par l'équipe SyNaBi et en collaboration avec plusieurs laboratoires de la région grenobloise (DCM, LGP2, DTBS (CEA-Leti)). L'objectif d'IBFC est d'optimiser les performances de biopiles implantables par plusieurs pistes de recherche en nanobiotechnologies, dont l'intégration dans ces dispositifs de composés sélectionnés et optimisés spécifiquement, tels qu'enzymes, médiateurs redox, membranes bicouches lipidiques incorporant des protéines de transport.

Chapitre I. La biopile à glucose

A. Contexte

Depuis la première implantation chirurgicale d'un pacemaker cardiaque en 1960 [10, 11], de nombreux DMI à piles ont été développés. Actuellement les pacemakers consomment 10 à 40 μW continuellement, ce qui est largement à la portée des batteries au lithium étanches qui constituent une source d'énergie fiable, avec une durée de vie de 8 ans environ dans le corps humain. Cependant, d'autres dispositifs électroniques implantés ont besoin de davantage d'énergie ($> 100 \mu\text{W}$), ce qui représente un obstacle à leur développement. Les organes artificiels, comme le sphincter urinaire « robotisé » par exemple [1], auraient besoin de quelques milliwatts à quelques watts pour fonctionner. Le cœur artificiel de CARMAT récemment implanté consomme entre 15 et 20 W.

D'autre part, certains dispositifs ont des localisations particulières, ce qui rend impossible l'alimentation par une pile classique de relativement gros calibre. Le « leadless pacemaker » par exemple [12] est un stimulateur électrique dans lequel l'électrode est directement implantée dans le ventricule, avec son alimentation, sans chambre implantable ni sondes la reliant au cœur.

Pour ces raisons, de nombreux travaux de recherche sont focalisés sur le développement de sources d'énergies alternatives, de petite taille, et qui soient capables de fonctionner indépendamment, sans besoin de recharge externe en combustible ou de remplacement chirurgical. Aujourd'hui il existe des générateurs mécaniques [13] et thermoélectriques [14, 15] qui fonctionnent grâce aux mouvements du corps ou aux différences de température. Le transfert de puissance inductive par les radiofréquences est également étudié, notamment pour recharger les implants cochléaires [16, 17].

Le développement important de piles à combustible capables de générer de l'électricité à partir de l'oxydation de combustible (hydrogène, méthanol, etc...) et de la réduction d'un comburant (l'oxygène) démontre les potentialités des techniques électrochimiques pour la génération d'énergie. Il est toutefois nécessaire d'utiliser des catalyseurs aux électrodes afin d'augmenter la vitesse des réactions électrochimiques, les métaux nobles comme le platine ou le palladium étant de très bons candidats. Néanmoins, les applications médicales obligent à reconsidérer la question des catalyseurs minéraux. Dans ce contexte, l'utilisation de catalyseurs bioinspirés ou biologiques, comme les enzymes, devient incontournable. Ces piles à combustible sont alors nommées « piles abiotiques » pour les premières, et « biopiles » pour les secondes, en raison de la nature biologique de leurs catalyseurs. Il en existe deux grandes catégories : les biopiles microbiennes, qui mettent en jeu des

micro-organismes connectés à des électrodes, et les biopiles enzymatiques, dans lesquelles la catalyse est assurée par des enzymes. À la différence des catalyseurs métalliques, les catalyseurs enzymatiques sont spécifiques, ce qui présente un avantage pour les applications *in vivo* puisque le sérum physiologique contient différentes espèces pouvant s'oxyder ou se réduire sur un catalyseur métallique. En outre, les enzymes possèdent une activité catalytique élevée et ont la capacité de fonctionner à température ambiante et à pH neutre, soit en milieu physiologique.

Ainsi, les biopiles enzymatiques, évoquées dans ce travail, constituent une alternative prometteuse pour l'alimentation de DMI [18, 19, 20].

B. Principe de fonctionnement

À l'image des mécanismes énergétiques cellulaires, l'idée à l'origine de la biopile est d'utiliser des ressources renouvelables et directement accessibles du corps humain comme combustible et comburant : le glucose et l'oxygène du sang.

D'autre part, les propriétés des enzymes les rendent attractives pour être utilisées comme des catalyseurs efficaces. En effet, les enzymes sont des protéines constituées d'un enchaînement d'acides aminés programmé par un gène pour accélérer une réaction déterminée. Leur spécificité et leur efficacité viennent de leur structure particulière. Dans le cas de la biopile qui nous concerne, l'objectif est d'optimiser la catalyse des réactions d'oxydo-réduction du glucose et de l'oxygène dans des conditions de fonctionnement correspondant à celles de l'organisme (température, pH) [21].

La Figure 1 présente le principe de fonctionnement d'une biopile à glucose. Celle-ci est composée de deux électrodes : anode et cathode, baignant dans un électrolyte. A l'anode, le glucose est oxydé en gluconolactone et à la cathode, l'oxygène est réduit en eau. Ces deux réactions d'oxydation et de réduction sont catalysées par des enzymes.

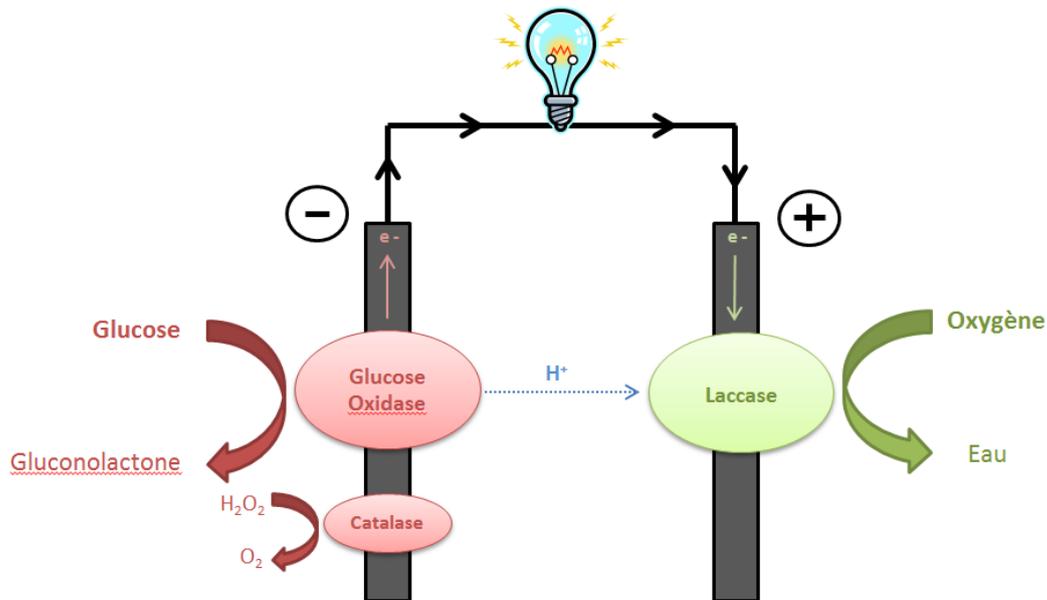
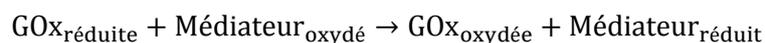
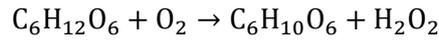


Figure 1: Schéma du fonctionnement de la biopile à glucose

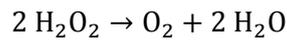
Plus précisément, à l'anode, la glucose oxydase (GOx), ou la glucose déshydrogénase, catalyse l'oxydation du glucose en gluconolactone en présence d'une molécule redox qui permet d'assurer la connexion électrique entre l'enzyme et l'électrode. En effet, la GOx est une grosse molécule possédant des sites catalytiques (centres redox : FAD, flavine adénine dinucléotide) qui sont cachés à l'intérieur de l'enzyme, ce qui rend leur connexion électrique directe avec l'électrode difficilement réalisable. Pour cette raison, une petite molécule redox est souvent utilisée pour jouer le rôle d'un médiateur de transfert d'électrons entre l'enzyme et l'électrode. Le mécanisme de l'oxydation du glucose sur l'anode en présence de la GOx et du médiateur se fait selon les réactions suivantes :



Cependant, en présence d'oxygène, la GOx catalyse aussi l'oxydation du glucose en solution selon la réaction qui suit :



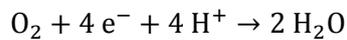
Cette réaction ne produit pas d'électrons à l'anode mais elle produit de l'eau oxygénée dont la présence dans le corps n'est pas souhaitable. En outre, l'accumulation d'eau oxygénée peut affecter le fonctionnement de la GOx et de l'anode. Pour cette raison, l'enzyme catalase est utilisée pour catalyser la dismutation de l'eau oxygénée en eau et oxygène :



En résumé, la réaction d'oxydation du glucose à l'anode est la suivante :



A la cathode, la réaction de réduction du dioxygène en eau (consommation d'électrons) est catalysée par une enzyme de la famille des « blue multicopper oxydases », c'est-à-dire avec un centre actif de cuivre (par exemple la laccase, la bilirubine oxydase ou la polyphenol oxydase) [22]. Contrairement à la GOx, la connexion électrique de telles enzymes se fait aisément sur la surface des électrodes à base de nanoparticules carbonées (nanotubes de carbone) utilisées dans cette étude. La réaction de réduction de l'oxygène à la cathode est la suivante :



Grâce à ces réactions d'oxydo-réduction en parallèle, il y a circulation d'électrons dans le circuit extérieur.

Les travaux de l'équipe sur les biopiles à glucose ont montré pour la première fois qu'une biopile enzymatique implantable produisait dans un mammifère une puissance compatible avec l'alimentation d'un pacemaker [7]. Plus récemment, une nouvelle famille de biopiles enzymatiques implantables a été développée en utilisant des nanotubes de carbone, ces dernières sont capables de délivrer jusqu'à $1,3 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ à partir de glucose et d'oxygène. En outre, ces biopiles restent stables pendant un mois dans des conditions physiologiques ($\text{pH} = 7$; $[\text{glucose}] = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) et délivrent une densité de puissance de $1 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ [8].

C. Fabrication

Les électrodes sont fabriquées par un procédé original de compression mécanique d'un mélange de nanotubes de carbone, d'enzymes et de polymère jouant le rôle de liant. L'ajout d'un polymère a été nécessaire afin d'améliorer la tenue mécanique des électrodes, très friables au départ, mais également afin d'augmenter la stabilité de l'enzyme et d'éviter son relargage par un procédé d'encapsulation. Un des polymères utilisés au sein de notre équipe pour la fabrication de la cathode est le chitosan (CS) [23, 24], néanmoins le problème de sa dégradabilité *in vivo* n'est pas encore résolu. Le nafion est une alternative intéressante puisque c'est un meilleur conducteur protonique et que sa perméabilité à l'oxygène est plus importante. En ce qui concerne l'anode, un autre polymère est utilisé, mais nous n'en dirons pas davantage ici car une publication est en cours d'établissement.

Les électrodes obtenues après séchage sont poreuses, ce qui permet d'augmenter leur surface spécifique, les réactions électrochimiques s'effectuant dans tout le volume de l'électrode. Ce procédé permet une bonne cohésion entre les enzymes et les nanotubes pour un transfert direct des électrons, et donc un courant plus important.

Il faut également réaliser un contact électrique à l'aide d'un fil et de pâte de carbone à l'arrière de la pastille, puis ce contact est isolé avec du silicone biocompatible (Figure 2).

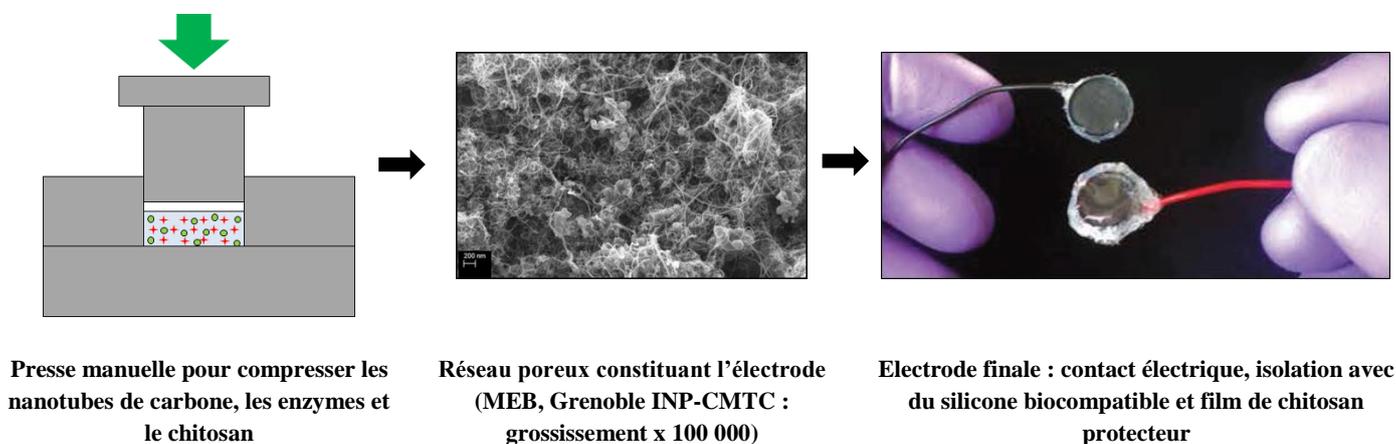


Figure 2: Procédé de fabrication de la biopile

Lorsque la biopile doit être implantée, nous cherchons à optimiser son intégration par l'organisme. Pour cela, jusqu'à ce jour nous l'enrobions d'un tissu favorisant la vascularisation (le Dacron®) avant de stériliser l'ensemble aux rayons gamma à une puissance de 12 kGy (Figure 3). Le Dacron est un matériau à large maille (2 mm) constitué de fibres de polytéréphtalate d'éthylène (PET),

il est commercialisé sous forme de tubes ($D = 20$ mm dans notre cas) et est utilisé en chirurgie cardiaque notamment comme prothèse vasculaire.



Figure 3: Enrobage d'une biopile (constituée de 2 électrodes disposées côte à côte) avec du Dacron

D. Enjeux

L'utilisation combinée du silicone biocompatible, d'un enrobage en Dacron et d'une stérilisation aux rayons gammas ne donne pas entière satisfaction puisqu'une réaction inflammatoire trop importante se met en place après l'implantation: il manque donc un élément assurant une meilleure biocompatibilité de la biopile.

Cette dernière devant être alimentée en glucose et en oxygène pour fonctionner, une barrière supplémentaire biocompatible et semi-perméable est nécessaire pour enrober les électrodes de la biopile (Figure 4). Cette membrane constituera alors un barrage contre les anticorps et les enzymes de l'organisme, tout en étant poreuse au glucose et à l'oxygène. De plus, elle renforcera sa tenue mécanique et simplifiera sa manipulation. Enfin, elle facilitera l'intégration de la biopile dans le corps et le protégera en cas de détérioration des électrodes. Dans ce contexte, nous évaluerons si l'enrobage en Dacron est toujours nécessaire.

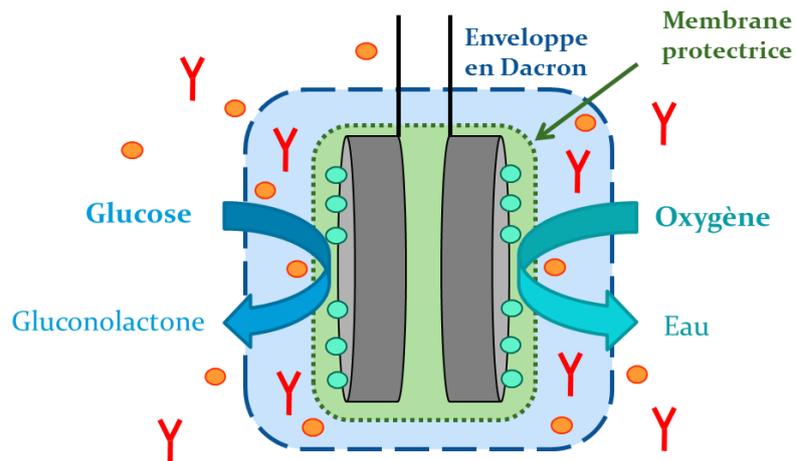


Figure 4: Schéma montrant (en pointillés verts) la position de la membrane supplémentaire d'encapsulation. Les motifs en « Y » symbolisent les anticorps, les cercles orange symbolisent les molécules de glucose et d'oxygène, les cercles bleu turquoise symbolisent les enzymes fixées sur les électrodes. On notera que la position en vis-à-vis des électrodes constitue un exemple de disposition.

Les propriétés recherchées pour cette membrane sont la souplesse et la robustesse, le contrôle de la porosité, la biocompatibilité et la non-biodégradabilité. La difficulté de mon travail de recherche a résidé dans ces derniers points, puisqu'il est relativement difficile de contrôler la porosité d'un matériau biocompatible et non-biodégradable.

Chapitre II. Choix du matériau d'enrobage

A. Biomatériaux et DMI

En parallèle des développements technologiques, une attention particulière doit être portée sur les matériaux enrobant les dispositifs implantés. En effet ceux-ci devant fonctionner *in vivo*, ils doivent être biocompatibles afin de ne pas agresser l'organisme hôte. De plus, les performances des DMI sont souvent limitées par les réactions inflammatoires de l'organisme et les mécanismes de dégradation engendrés par l'hôte, en particulier à long terme. Dans cette partie, nous nous intéresserons donc aux biomatériaux et à leurs différentes applications.

1. Définitions

Les biomatériaux sont des matériaux non vivants conçus pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'ils participent à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique, à celle d'un substitut de tissu ou d'organe, ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle (définition élaborée à Chester en 1986 par la conférence de Consensus organisée sous l'égide de la Société Européenne des Biomatériaux) [25].

Un biomatériau est donc un matériau appelé à travailler sous contrainte biologique, mais aussi sous contrainte mécanique, chimique et biochimique. Il soutient ou remplace les fonctions de cellules ou de tissus humains. Pour cela, il doit avoir différentes propriétés indispensables.

Tout d'abord, le biomatériau ne doit pas être toxique : il utilise des produits inertes qui n'entraînent pas de risques toxiques et qui sont bien acceptés par le receveur [26]. Actuellement, en médecine, la biocompatibilité des implants est une condition indispensable à leur usage. La biocompatibilité peut être définie par « la capacité d'un biomatériau à induire une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique » (ESB-Chester, 1986 et 1991). Elle est caractéristique de l'endommagement que pourrait provoquer l'implant sur les tissus l'avoisinant. Si les cellules ne sont pas endommagées par le biomatériau ou par des produits libérés par la corrosion ou le frottement, le matériau est considéré comme compatible avec l'organisme. L'implant, qui est un « corps étranger »,

ne doit pas non plus être endommagé par les fluides corporels ou par les mécanismes de défense de l'organisme.

D'autres exigences qui dépendent de la fonction et de l'endroit d'implantation du biomatériau sont aussi recherchées : il faut être en mesure de connaître les contraintes et les déformations mécaniques du biomatériau, qui sont liées à sa structure et à sa composition. Les contraintes qui s'exercent sur les biomatériaux sont statiques mais aussi dynamiques. Les propriétés chimiques comme l'oxydation, la corrosion ou la résistance à l'usure, doivent aussi être prises en compte.

A l'interface du biomatériau et des tissus environnants, des réactions se déroulent [27, 28, 29]. Elles ont des répercussions sur les cellules des tissus hôtes et peuvent être à l'origine de nombreuses irritations (inflammations, allergies) ou au contraire, avoir un effet stimulant pour la régénération des tissus environnants. Elles permettent de distinguer trois types de biomatériaux :

- les matériaux bio-inertes qui s'intègrent dans l'organisme sans interposition de couche fibreuse ;
- les matériaux bio-tolérés qui s'intègrent dans l'organisme avec interposition d'une couche tissulaire fibreuse ;
- les matériaux bio-actifs qui réagissent « positivement » à leur environnement biologique en permettant des réactions spécifiques à l'interface implant-tissu receveur.

Ces matériaux sont tous biocompatibles ; ils ne libèrent pas de substances toxiques et n'endommagent pas non plus les tissus environnants.

Les réactions qui se produisent à l'interface entre le biomatériau et les tissus environnant l'implant se déroulent durant les premières secondes ou minutes de contact. Elles peuvent durer aussi sur plusieurs mois ou même sur plusieurs années et engendrer des dommages cellulaires de grande étendue comme la lyse de tissu par des contraintes mécaniques à l'interface, ou l'endommagement de cellules par des ions toxiques libérés par bio-corrosion. Le matériau peut ainsi être modifié au cours du temps pendant toute la durée de l'implantation.

Enfin, il est à noter que des effets à distance peuvent être provoqués par des particules détachées par des mécanismes chimiques ou de frottement. Ces particules sont réparties dans tout l'organisme par les fluides corporels.

Vaisseaux artificiels, valves cardiaques, stents, implants dentaires, lentilles de contact, remplacements de cristallin, prothèses de la hanche, du genou ou autre, cœur, pancréas, sphincter, ligament ou tendon artificiel, vis, plaques, broches, colles, drains, matériaux de suture, pompes portables et implantables, dialyseurs, implants dentaires, matériaux de chirurgie esthétique, etc... : les stratégies thérapeutiques ayant recours à des biomatériaux sont devenues très courantes en l'espace de quelques décennies. On estime ainsi que 3 à 4 millions de patients sont concernés en France.

2. Prothèse tissulaire

Dans le cas particulier des prothèses tissulaires, le biomatériau en lui-même constitue le dispositif médical. Il vise alors à mimer et/ou remplacer un tissu préexistant dont la fonction n'est plus assurée, et selon son rôle, les propriétés requises pour le matériau peuvent être très différentes.

Par exemple, la transplantation d'îlots de Langerhans encapsulés dans une membrane semi-perméable (soit un pancréas artificiel) a été proposée comme une méthode efficace et sûre pour traiter les patients diabétiques insulino-dépendants de type 1, sans la nécessité de suivre un traitement immunosuppresseur. Les îlots sont isolés du système immunitaire de l'organisme hôte grâce à une membrane semi-perméable, et peuvent ainsi survivre longtemps et réguler le métabolisme du glucose pendant plusieurs mois.

Différents types de pancréas artificiels ont été développés : avec une encapsulation en alginate/poly(L-lysine), par un hydrogel d'agarose, ou encore par une membrane poreuse en PVA et PEG [30]. Afin d'assurer une réponse rapide des îlots de Langerhans, l'objectif est d'obtenir un enrobage qui a une perméabilité au glucose et à l'insuline la plus élevée possible [31]. Pour cela, des membranes de PVA multi-couches et ultra-fines se sont avérées particulièrement performantes [32].

Un autre domaine médical intéressant pour nous est celui de l'ophtalmologie. En effet, une alternative potentielle pour les patients atteints de cécité, due à certaines pathologies de la cornée, est l'implantation d'une cornée artificielle qui consiste en un système optique central fixé sur une bordure poreuse biocompatible. L'adhésion des cellules sur cette bordure de cornée artificielle est extrêmement importante puisqu'elle déterminera le succès de l'implantation ou non.

Dans ce contexte, les hydrogels de PVA sont prometteurs pour leurs qualités mécaniques : grande solidité, élasticité, souplesse, transparence et structure aquifère [33, 34]. Cependant le PVA est un matériau bio-inerte, ce qui rend son adhésion difficile sur les tissus cornéens périphériques. C'est pourquoi l'hydroxyapatite est utilisé pour former des hydrogels composites avec le PVA. Ceux-ci présentent des pores interconnectés, une haute teneur en eau et de bonnes propriétés mécaniques [35, 36].

Pour conclure, les polymères et en particulier les hydrogels (alginate/poly(L-lysine), agarose, PVA), se sont imposés dans le domaine des prothèses tissulaires grâce à leurs propriétés mécaniques intéressantes et à leur grande biocompatibilité. De plus, les matériaux composites de polymères synthétiques et biodégradables naturels répondent au besoin de contrôler la dégradabilité *in vivo*.

3. DMI isolés

À ce jour l'implantation de dispositifs médicaux totalement autonomes à l'intérieur du corps est maîtrisée, et ce malgré leur activité mécanique ou électrique : ce sont donc des dispositifs isolés. En neurologie (maladie de Parkinson, surdité, etc...), il s'agit souvent d'électrodes implantées afin de restaurer la fonction neurologique perdue.

Dans ce contexte, le polydiméthylsiloxane (PDMS) est l'un des matériaux les plus utilisés pour l'isolation des électrodes [37, 38, 39, 40]. Cependant, l'adsorption de protéines à sa surface est très importante à cause de son hydrophobicité [41]. De plus, sa texture collante et rigide a tendance à traumatiser le tissu environnant, ce qui augmente la réaction inflammatoire. Afin de remédier à ces problèmes, des efforts considérables ont été fournis pour modifier la surface des matériaux implantables.

Les enrobages à base d'hydrogel semblent particulièrement intéressants puisqu'ils ont une très bonne biocompatibilité, une hydrophilie importante et de faibles propriétés d'adsorption de protéines [42, 43].

Le polyuréthane (PU) ayant été largement utilisé dans les applications médicales, que ce soit pour enrober des électrodes ou pour créer des prothèses vasculaires [44, 45, 46], et pouvant être fabriqué comme un hydrogel, il a été utilisé avec du polyéthylène glycol (PEG) pour augmenter la biocompatibilité d'électrodes neurales [47, 48, 49]. Le PEG, lui, est fréquemment utilisé dans les polymères pour les rendre hydrophiles [50, 51], mais c'est un matériau biodégradable.

D'autre part, un réseau d'alcool polyvinylique (PVA) et d'acide polyacrylique (PAA) interpénétrés a été utilisé pour améliorer l'interface tissulaire de l'électrode neurale [52]. En effet, le PVA est un polymère qui n'est pas dégradé dans la plupart des situations physiologiques [53]. Les hydrogels à base de PVA sont largement utilisés en tant que prothèses tissulaires grâce à leurs propriétés mécaniques (souplesse, robustesse, élasticité) et à leur facilité de fabrication sous forme de films [32, 54, 55, 56]. Le PAA, lui, est un hydrogel fréquemment utilisé dans le domaine médical puisqu'il a des capacités d'absorption d'eau très élevée et d'adsorption des protéines faible [57, 58, 59].

En résumé, le matériau de référence pour l'isolation des DMI qui n'ont pas besoin d'échanger de matière avec l'organisme hôte était le PDMS. Mais son hydrophobicité entraîne une adsorption de protéines trop importante sur sa surface. En outre, sa rigidité mécanique ainsi que sa texture entraînent une réaction inflammatoire non négligeable. En réponse à ces difficultés, les hydrogels semblent être de bons candidats (que ce soit le PU, le PVA ou le PAA) grâce à leur propriétés mécaniques et à leur biocompatibilité.

4. DMI non isolés

Plus récemment, des dispositifs médicaux dont le principe de fonctionnement repose sur une interaction avec l'organisme hôte ont vu le jour. Nous nous intéresserons tout particulièrement aux biocapteurs.

Cela fait environ cinquante ans que le principe des biocapteurs a été démontré par Clark et Lyons (1962). Depuis, de nombreux concepts aussi élégants qu'originaux ont vu le jour : aussi bien des transducteurs électrochimiques, optiques, piézoélectriques ou calorimétriques. Cependant, relativement peu de capteurs sont capables de fonctionner de manière fiable à long terme dans des milieux biologiques complexes. Cela reflète souvent un défaut d'encapsulation conduisant à une altération de la surface du capteur par différents composants organiques et cellulaires présents dans les fluides biologiques. Quel que soit le type de transducteur, des modulations du signal par un agent extérieur peuvent avoir lieu.

Pour résoudre les deux problèmes d'encrassement et d'interférences du dispositif, une approche stratégique a été de développer des membranes spécifiques pour enrober les capteurs. Ainsi, il est possible d'utiliser des membranes qui vont empêcher les composants biologiques d'interférer avec le dispositif grâce à une géométrie particulière. Ces membranes assurent également une fonction de barrière protectrice en encapsulant le capteur de manière biocompatible mais sans l'isoler totalement du corps pour qu'il puisse capter les éléments qu'il doit détecter. Pour les électrodes enzymatiques par exemple, un grand progrès a été réalisé avec les membranes multicouches qui permettent de contrôler le flux de liquide biologique en le filtrant grâce à une porosité contrôlée [60, 61, 62]. Dans ce contexte, les polymères ont une place primordiale et c'est ainsi que des membranes électropolymérisées ont vu le jour. Ces enrobages sont protecteurs de l'organisme puisqu'ils agissent comme une barrière limitant la diffusion du substrat. En outre, ils immobilisent les enzymes sur l'électrode [63] et empêchent la prolifération, dans l'organisme, des éléments la constituant.

Dans le cas particulier des capteurs à glucose implantables, le dépôt de protéines et la formation d'une capsule fibreuse réduisent significativement ses performances [64, 65]. Une des approches pour résoudre ce problème a donc été de travailler sur un matériau enrobant qui mimait les conditions de l'organisme, évitant ainsi tout dépôt défavorable au fonctionnement du capteur. Les membranes les plus courantes dans ce domaine sont en acétate de cellulose, en polycarbonate, en alcool polyvinylique, en polyuréthane ou en nafion [66]. Néanmoins, à ce jour aucun de ces DMI n'a une durée de fonctionnement qui dépasse 30 jours.

Ainsi, l'enrobage des dispositifs dont le fonctionnement s'appuie sur un échange de matières avec l'organisme hôte est un vrai challenge. En effet, la membrane enrobante doit assurer la symbiose entre ces deux éléments : ils doivent pouvoir communiquer mais l'un et l'autre doivent être protégés.

Les polymères (acétate de cellulose, polycarbonate, PVA, PU, nafion, etc...), dont la porosité est contrôlable, semble être les meilleurs candidats pour jouer ce rôle. De plus, ils ont la propriété d'avoir peu d'effets adverses sur l'environnement biologique dans lequel ils sont appelés à fonctionner.

Le tableau suivant (Figure 5) répertorie de manière non exhaustive différents matériaux utilisés pour l'enrobage de DMI et correspondant plus ou moins bien à notre demande.

	Souple	Robuste	Hydrophylie	Biocompatibilité	Perméable aux gaz (O ₂)	Perméable aux molécules	Non biodégradable (dans les conditions physiologiques)
PDMS		×		Inflammation			×
Acétate de cellulose	×	×	×	Inflammation	×	×	×
CS	×		×	×	×	×	
Nafion	< hydrogels	< hydrogels	×	×	×	×	×
PU	< PVA	< PVA	×	×	×	×	×
PVA	×	×	×	×	×	×	×

Figure 5 : Tableau récapitulatif de différents matériaux enrobant les DMI et de leurs propriétés

Ainsi, après avoir étudié la littérature concernant les enrobages des DMI, les hydrogels m'ont semblé être une piste intéressante autant pour leurs propriétés mécaniques que pour leur biocompatibilité et leur porosité. Ensuite, je me suis rapidement orientée vers les hydrogels de PVA en particulier, car leur mise en forme est relativement simple et leurs caractéristiques répondent aux besoins de la biopile à glucose.

B. Les hydrogels

1. Généralités

Un hydrogel peut être défini comme un réseau polymérique réticulé en 3 dimensions, qui a la capacité d'absorber et de retenir de grandes quantités d'eau grâce à sa structure poreuse. Cette capacité à se gorger d'eau vient principalement de la présence de groupes hydrophiles (amine, carboxyle et

hydroxyle) dans les chaînes de polymères. Plus le nombre de groupes hydrophiles est élevé, plus la capacité de contenance en eau est importante. Et au contraire plus l'hydrogel est réticulé, moins il y a de groupes hydrophiles et moins la capacité de contenance en eau est élevée. Ainsi, en augmentant la réticulation on augmente l'hydrophobicité et l'élasticité diminue simultanément [67].

La première utilisation d'hydrogels pour des applications biomédicales remonte à 1960, quand Wichterle et Lim ont développé le polymère synthétique polyhydroxyethylmetacrylate (pHEMA). Depuis, des polymères naturels sont utilisés sous le nom de biopolymères : l'alginate et le chitosan étant les plus utilisés.

2. Mécanismes de gélification

La préparation des hydrogels s'effectue dans des conditions très douces : généralement, la gélification s'effectue à température ambiante et pression atmosphérique et le recours aux solvants organiques est rarement requis. La gélification fait référence au processus de liaison des chaînes macromoléculaires, et plus elle est importante, moins le polymère est soluble.

La connexion entre les chaînes de polymères peut être de deux sortes : permanente (liaisons covalentes) ou réversible (liaisons hydrogène, interactions de Van der Waals, enchevêtrements...). Cela permet de différencier deux grands types de gels : les gels chimiques et les gels physiques. La réticulation chimique peut être réalisée par irradiation de haute énergie ou par réactions chimiques avec les groupes complémentaires, mais elle peut aussi être radicalaire.

Les gels physiques, eux, peuvent être sous-divisés en 2 catégories : forts ou faibles. La cristallisation ou la formation d'hélices dans le polymère donnent des gels forts, tandis que les liaisons hydrogènes, les interactions ioniques ou hydrophobes, et les agglomérations donnent des gels faibles. Les premiers ont des liaisons physiques fortes entre les chaînes de polymère, ils peuvent donc être permanents dans certaines conditions expérimentales et sont alors comparables aux gels chimiques [68]. Les différents types de gélification sont représentés ci-dessous (Figure 6). Les hydrogels de PVA, de gélatine et d'agar-agar sont des exemples de gels formés par voie physique.

Les scientifiques montrent un intérêt croissant pour les gels physiques car leur production est très simple et le fait de ne pas utiliser d'agent de réticulation est un réel avantage. En effet ceux-ci peuvent être toxiques et affecter les molécules à enrober, comme les enzymes dans le cas de la biopile. C'est pourquoi je me suis concentrée sur ce type de procédé de fabrication.

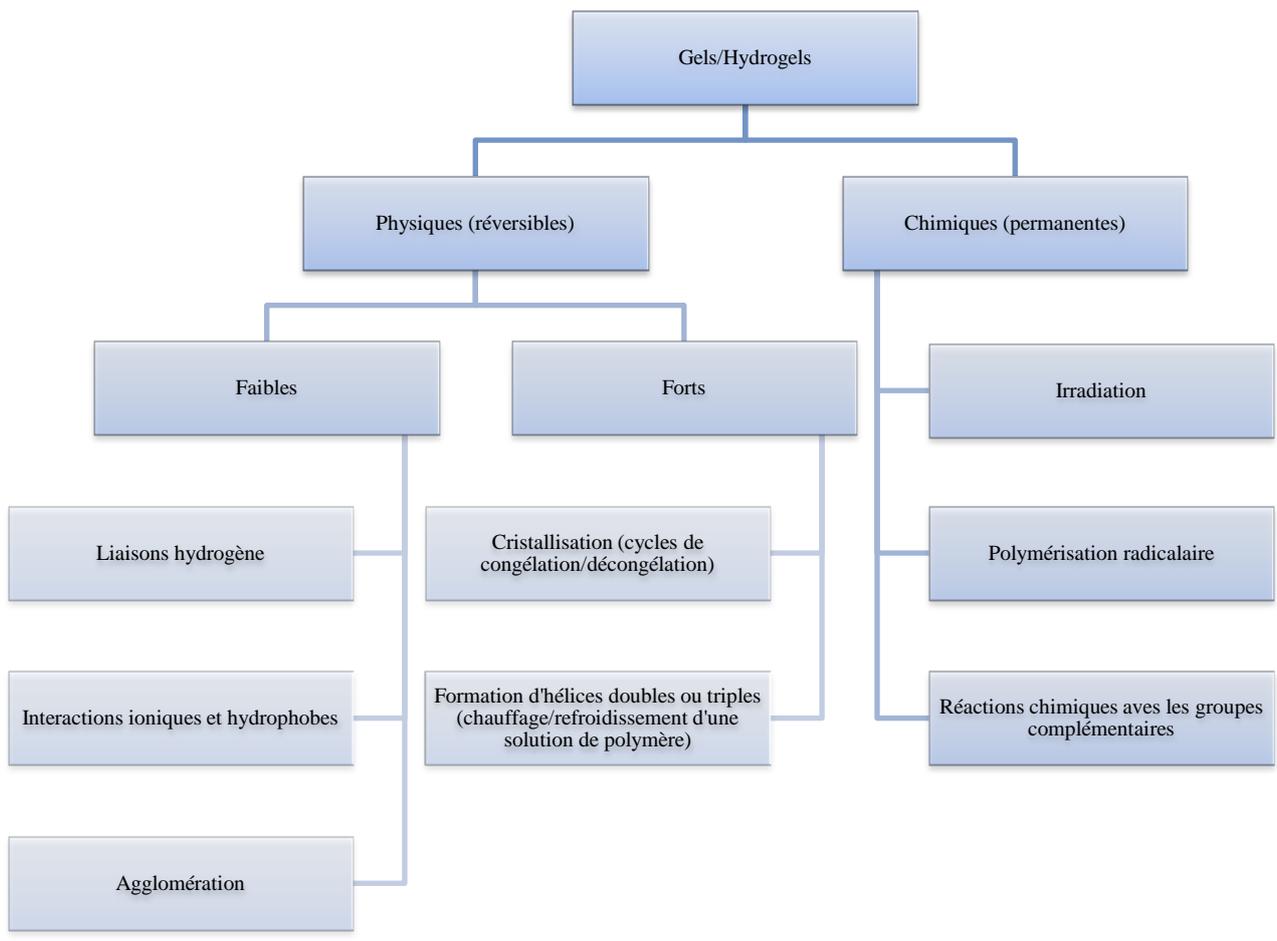


Figure 6: Classification des différents mécanismes de gélification. Pour l'encapsulation de la biopile nous avons retenu la méthode physique créant des liens forts par cristallisation (colonne centrale). Voir les explications dans le texte.

C. Le PVA

1. Structure et Propriétés

L'alcool polyvinylique $-(CH_2CHOH)_n-$ a une structure chimique simple avec un groupe hydroxyle libre (Figure 7). Le monomère « alcool vinylique » n'existe pas sous une forme stable, c'est pourquoi le PVA est produit par polymérisation de l'acétate vinylique $CH_3COO-CH=CH_2$ en acétate polyvinylique $-(CH_3COO-CH=CH_2)_n-$ (PVAc), lui-même hydrolysé en PVA. L'hydrolyse n'est jamais totale, les polymères obtenus ont donc un certain degré d'hydrolyse qui dépend de l'étendue de la réaction (Figure 8).

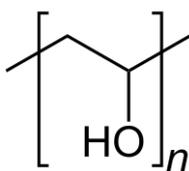


Figure 7: Formule chimique de l'alcool polyvinylique ou en anglais « poly(vinyl alcohol) » (PVA)

Par essence, le PVA est toujours un copolymère de PVA et de PVAc mais le PVA commercial est disponible avec des très hauts degrés d'hydrolyse (aux alentours de 98,5 %). Le degré d'hydrolyse, ou le contenu en groupes acétate dans le polymère, impacte les propriétés chimiques, la solubilité et la capacité à cristalliser du PVA. Il a été démontré que plus le degré d'hydrolyse est élevé, moins le PVA obtenu est soluble dans l'eau et plus il est difficile à cristalliser.

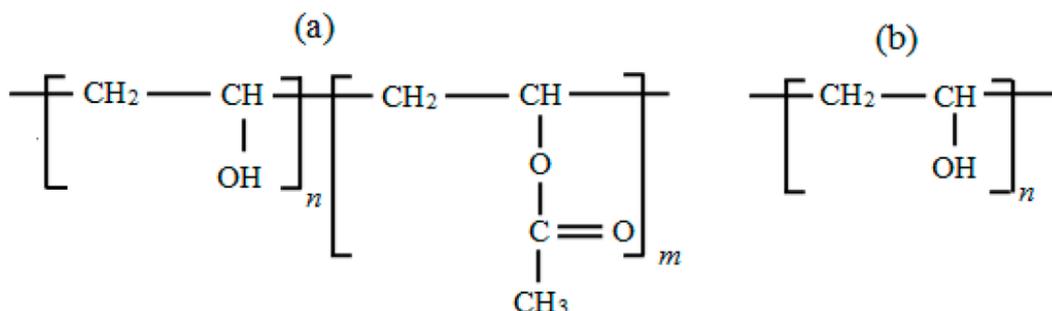


Figure 8: Formule chimique du PVA partiellement hydrolysé (a) versus celle du PVA totalement hydrolysé (b)

Le PVA est produit par polymérisation radicalaire puis hydrolyse, résultant en une distribution équitable du poids moléculaire. Cette distribution est une caractéristique importante puisqu'elle affecte les propriétés du PVA comme sa capacité à cristalliser, l'adhésion, la résistance mécanique et la diffusivité [69].

2. Cristallisation du PVA

Les solutions aqueuses de PVA ont la caractéristique inhabituelle de former des cristaux lorsqu'elles subissent des cycles répétés de congélation/décongélation. Le nombre et la stabilité de ces cristaux augmentent avec le nombre de cycles, et les propriétés des hydrogels obtenus en dépendent.

En outre, cette réticulation physique donne des gels particulièrement résistants et élastiques, avec de très bonnes propriétés mécaniques et une forte capacité d'absorption en eau.

À l'échelle moléculaire, les cristaux de PVA peuvent être décrits comme une structure « en couches » [70]. Deux couches de molécules sont accrochées fermement l'une à l'autre par des liaisons hydroxyles, formant ainsi une bi-couche ; tandis que des forces de Van der Waals, plus faibles, rapprochent les bicouches les unes des autres. Les cristaux sont formés d'un ensemble de chaînes de PVA repliées sur elles-mêmes, constituant ainsi des petites régions ordonnées, réparties de manière diffuse dans une matrice désordonnée de polymère amorphe (Figure 9). En général, les chaînes de PVA doivent avoir une longueur minimale pour pouvoir former des cristaux.

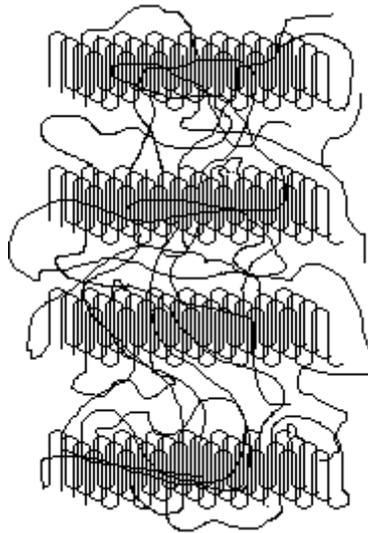


Figure 9: Représentation schématique de la structure du PVA, un polymère semi-cristallin.

Mandelke [71] rapporta qu'en augmentant le poids moléculaire du polymère utilisé, la taille des cristaux augmente à son tour. Cependant, la nature et la forme des cristaux obtenus ne varient pas en fonction du poids moléculaire. Le PVA semi-cristallin peut être caractérisé par son degré de cristallinité qui est défini par le rapport du volume des cristaux de PVA sur le volume total du PVA.

3. Hydrogels fabriqués par congélation/décongélation de solutions aqueuses de PVA

Afin d'éviter les procédés de réticulation chimique qui peuvent conduire plus tard au relargage d'agents toxiques dans l'organisme, la méthode physique de gélification et de solidification par congélation/décongélation de solutions aqueuses de PVA a été retenue. Elle a été rapportée pour la première fois par Peppas en 1975 [72], puis de nombreux travaux ont été effectués sur ce sujet en étudiant l'impact des différentes conditions de préparation sur les propriétés des matériaux obtenus.

En 1975 Peppas a montré que la cristallinité augmente avec le temps de congélation et avec la concentration initiale de PVA en solution. De plus, durant le procédé de décongélation, la taille des cristaux augmente initialement puis diminue.

En 1986, Yokoyama et al. [73] ont décrit les propriétés d'un hydrogel de PVA préparé par congélation/décongélation, et les expliquent par le modèle suivant (Figure 10). Les chaînes de polymère sont dans deux états différents, amorphe et cristallin ; l'hydrogel obtenu est composé de trois types de zones distinctes et associées :

1. Les zones où le polymère de PVA est sous forme cristalline, c'est-à-dire que les chaînes sont fortement liées entre elles. Ces zones ont pour effet de restreindre, voire de bloquer la mobilité des chaînes de polymères. Elles agissent comme des points de liaison rigides responsables de la réticulation des chaînes amorphes. Ces points sont variables en dimension et en nombre, ceci détermine le degré de réticulation de l'hydrogel. Ces points d'ancrage résistants sont responsables de la résilience et de la résistance au déchirement tout à fait exceptionnelles du gel de PVA.
2. Les zones reliant les cristaux, constituées de chaînes de polymère amorphes, chacune étant associée à l'eau par des ponts hydrogènes. Cette attraction avec l'eau maintient une fraction du PVA sous forme amorphe, évitant ainsi que le polymère ne soit entièrement cristallin. On note que la longueur de ces zones amorphes conditionne le niveau d'hydratation du gel et également sa porosité. La mobilité de ces zones est responsable du caractère gommeux de l'hydrogel.
3. Les zones composées principalement d'eau et contenant très peu de polymère. Lors de la congélation, ces zones correspondent au cristal de glace. Après décongélation, les dimensions de ces zones déterminent la porosité de l'hydrogel. Ainsi, de larges lacunes d'eau permettront

au gel d'être traversé par de grosses molécules tandis que des petites lacunes bloqueront leur diffusion. De ce fait, l'hydrogel agit comme un tamis sélectif qu'il est possible de calibrer, ce qui est justement recherché pour notre application.

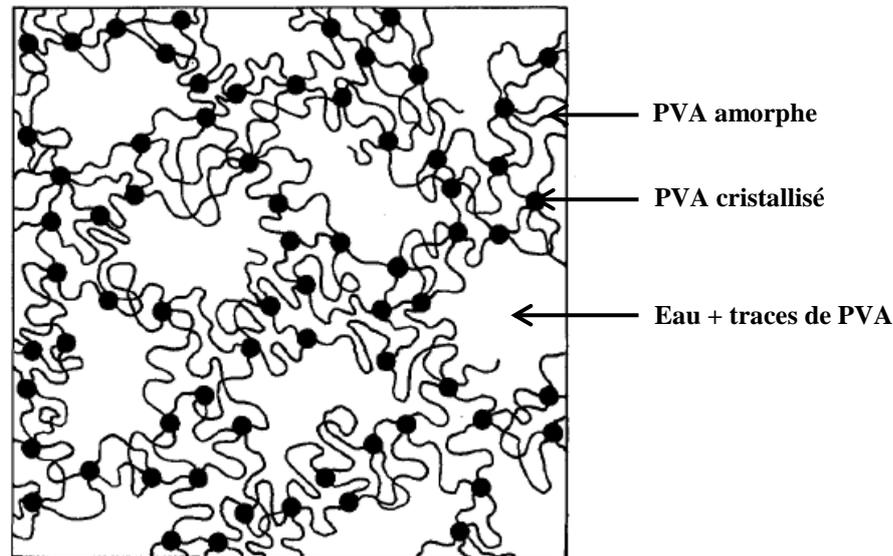


Figure 10: Modèle de la structure de l'hydrogel de PVA selon Yokoyama et al. [73]

En résumé, la structure de l'hydrogel se met en place au cours des cycles de congélation/décongélation. Lors du 1^{er} cycle, le PVA s'organise selon le modèle décrit précédemment. Durant les cycles suivants, les zones de PVA amorphes s'enrichissent en PVA aux dépens des lacunes d'eau qui s'appauvrissent en polymère. Autrement dit, le PVA qui au départ était libre dans l'eau, rejoint progressivement à chaque cycle de congélation le PVA amorphe en périphérie de la lacune. Cette ségrégation augmente donc progressivement la concentration en molécules dans le « squelette amorphe » et diminue la taille des lacunes, donc la porosité. Ce phénomène permet aussi la croissance des cristaux de PVA au niveau des nœuds.

L'influence de l'addition de solvants a également été étudiée. Hyon et Ikada [74, 75] ont préparé des gels hydratés, transparents et poreux, à partir d'une solution de PVA, eau et solvant organique miscible à l'eau. Ils ont notamment étudié l'effet du diméthylsulfoxyde (DMSO), la glycérine, l'éthylène glycol, le propylène glycol et l'éthanol. Ils ont ainsi obtenu des gels de PVA hydratés, très résistants à l'étirement, avec une importante teneur en eau et une très bonne transmission de la lumière. L'ajout de solvant organique a pour effet d'éviter que la solution de PVA ne gèle trop vite, ce qui permet à la cristallisation de se faire sans augmentation de volume

significative. Ainsi les gels obtenus ont des pores de moins de 3 μm , ce qui donne un aspect transparent. Ce procédé a été breveté en 1987.

En 1995, Trieu et Qutubuddin [76] ont étudié plus précisément la structure des gels de PVA préparés à partir d'une solution d'eau et de DMSO, puis congelés/décongelés. Ils ont obtenu des hydrogels avec des structures et des propriétés remarquablement différentes en faisant varier la concentration de DMSO, la concentration initiale de PVA et la température de congélation.

En augmentant les concentrations de PVA et DMSO (à température de congélation fixée à -20°C), la capacité de gonflement des gels diminue et la résistance à l'étirement augmente considérablement, tout comme leur pourcentage d'élongation (Figure 11). La température de congélation a une influence relativement faible sur les propriétés mécaniques et la capacité de gonflement des gels ; par contre, elle affecte significativement la transparence des hydrogels (Figure 12).

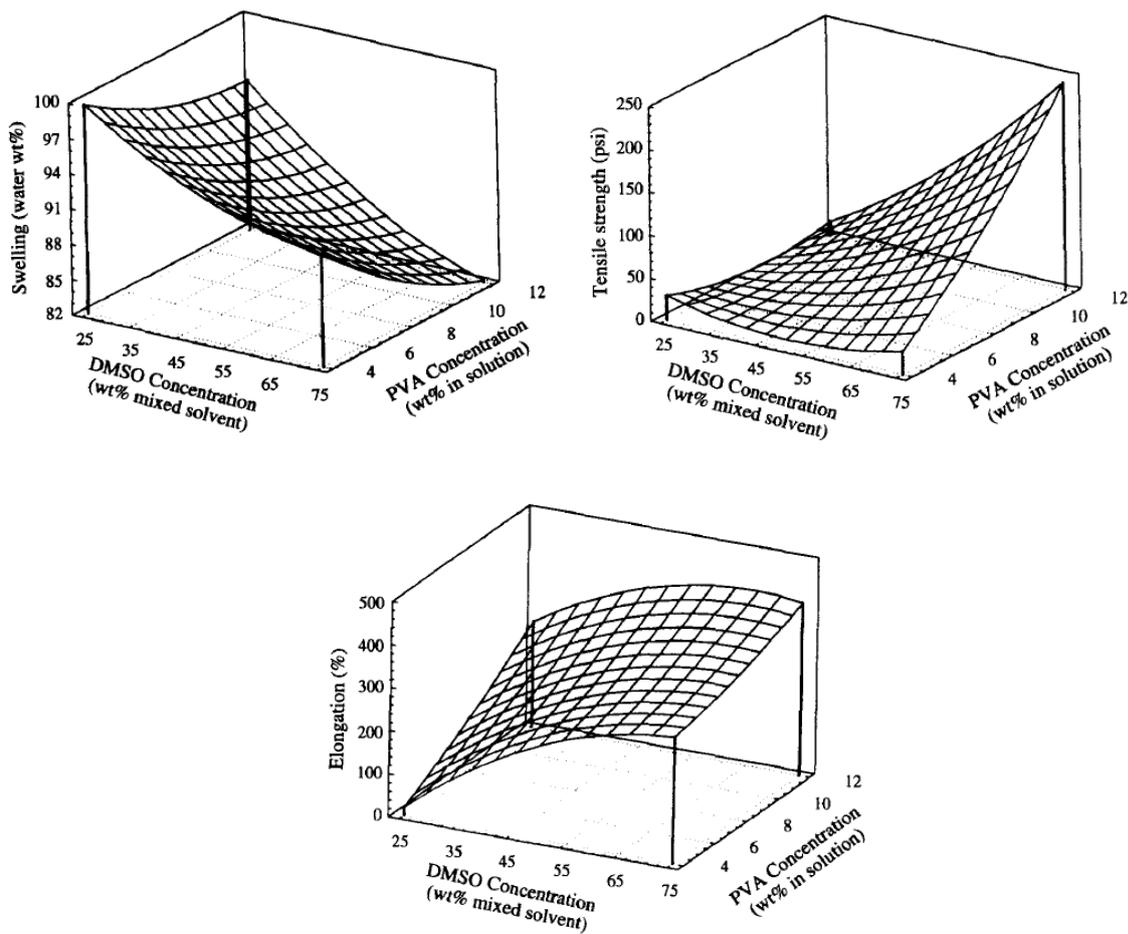


Figure 11 (de gauche à droite et de haut en bas): Gonflement, Résistance à l'étirement et Pourcentage d'élongation en fonction des concentrations en PVA et en DMSO à $T_{\text{congélation}} = -20^{\circ}\text{C}$ [76]

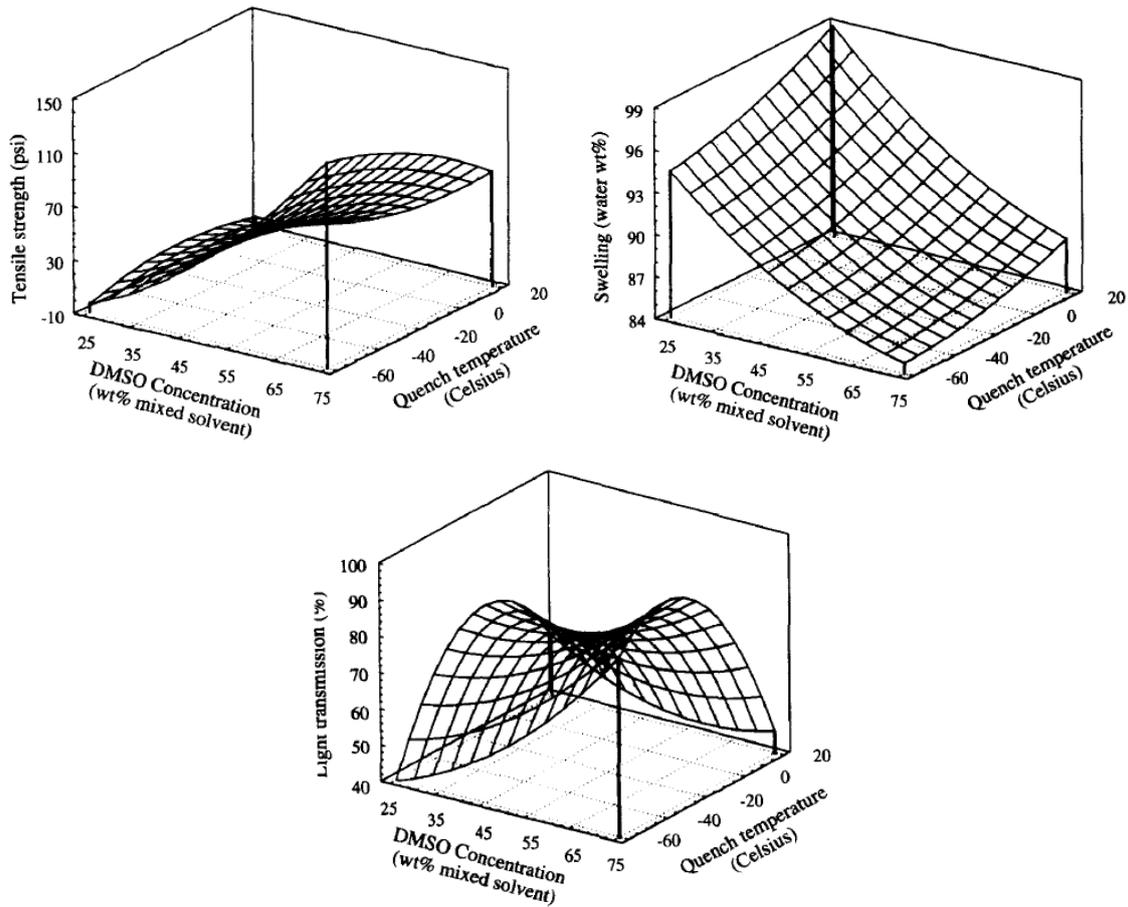


Figure 12 (de gauche à droite et de haut en bas): Résistance à l'étirement, Gonflement et Transparence en fonction de la concentration en DMSO et de la température de congélation pour 8 %wt de PVA [76]

Une microstructure dense et homogène correspond à un hydrogel solide et caoutchouteux, avec une faible contenance en eau et une bonne transparence optique. A contrario, un hydrogel fragile et mou, avec une très importante contenance en eau et relativement opaque a une surface hétérogène et poreuse. La formation de complexes DMSO-eau dans le milieu affecte le taux et le mécanisme de gélification du PVA, conduisant ainsi à des hydrogels différents en termes de structure et de propriétés.

La relation entre la porosité et les propriétés mécaniques a également été étudiée plus précisément. Stauffer et Peppas [77] ont montré que l'augmentation du temps de congélation et/ou du nombre de cycles de congélation/décongélation s'accompagne d'une augmentation significative de la cristallinité dans les gels de PVA. La réticulation physique est donc de plus en plus importante. En effet, des expériences de gonflement ont montré qu'à partir d'un certain nombre de cycles, les gels avaient une structure plus dense (les autres paramètres du procédé de fabrication étant fixés) (

Figure 13). Dans cette même étude, des expériences de compression mécanique ont montré que la solidité des hydrogels de PVA augmente avec le nombre de cycles et donc avec la densification (Figure 14).

D'autre part, il a été montré par plusieurs équipes que l'augmentation du nombre de cycles entraîne une augmentation significative du module de Young jusqu'à atteindre un plateau. Ensuite, les cycles supplémentaires n'ont plus beaucoup d'influence sur l'élasticité [69].

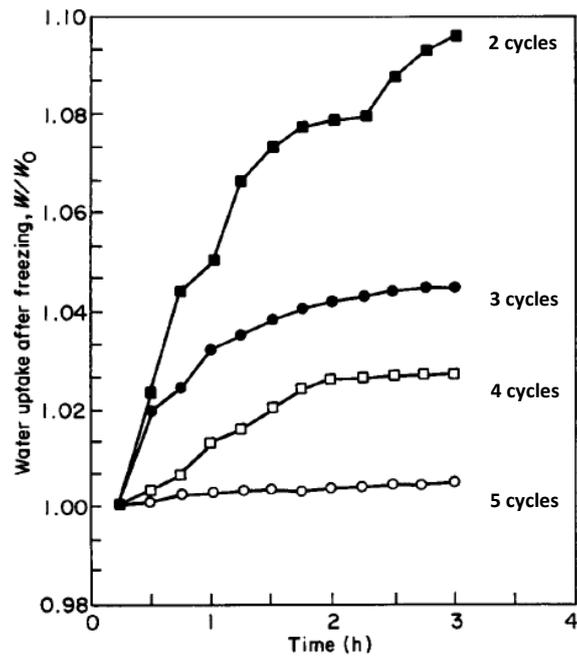


Figure 13: Contenu en eau des gels de PVA en fonction du temps de congélation et du nombre de cycles [77]

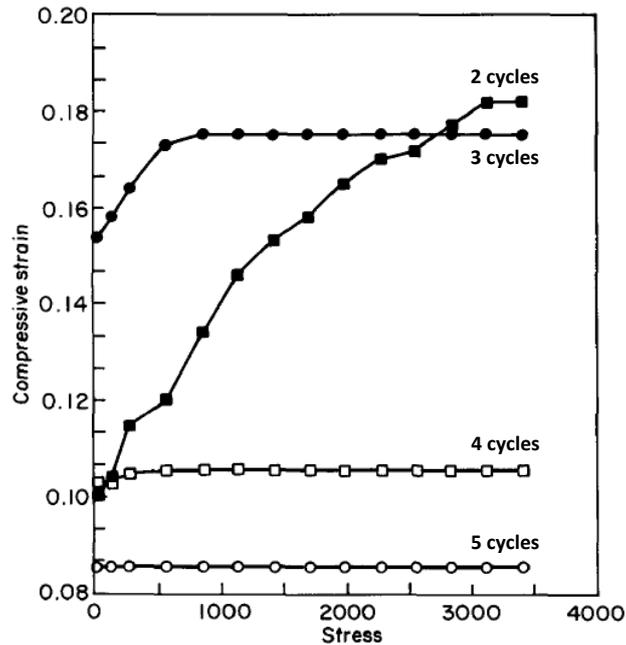


Figure 14: Déformation élastique en fonction de la contrainte compressive (kPa) et du nombre de cycles [77]

Le poids moléculaire du PVA utilisé a aussi son importance puisque plus il est élevé, plus la structure des gels obtenus est dense. Ceux-ci sont alors plus solides et plus rigides [78, 79].

Il a été démontré que la fraction cristalline des hydrogels de PVA est fonction du nombre de cycles et de la durée de chaque cycle, ce qui a une influence sur la taille des pores et donc aussi sur la diffusivité des membranes en PVA [80].

En ce qui concerne la biocompatibilité, bien que l'augmentation du nombre de cycles contribue à augmenter la stabilité du réseau cristallin, elle diminue les propriétés adhésives du PVA [81]. Ceci peut être un avantage pour enrober des dispositifs symbiotiques implantables, car cela pourrait éviter leur recouvrement par un tissu isolant qui pourrait réduire les échanges de matière avec ces derniers.

Au sujet de la stabilité du PVA dans le temps, plusieurs problèmes ont été soulevés dont la possible dissolution du PVA, la fonte de régions cristallines et la cristallisation additionnelle pendant des périodes de gonflement importantes. L'augmentation du poids moléculaire du PVA utilisé résulte en un plus petit nombre de cristaux, mais avec une stabilité plus importante [69].

4. Atouts et défauts du PVA polymérisé physiquement

Pour conclure cette étude bibliographique, il faut noter que le PVA polymérisé physiquement a fait l'objet de nombreuses études pour des applications très diverses. L'intérêt de ce polymère réside dans sa structure chimique et son procédé de fabrication, qui sont relativement simples. D'autre part, il peut être utilisé en implantation dans diverses applications médicales grâce à sa biocompatibilité. La nature cristalline du PVA est particulièrement intéressante puisqu'elle lui confère une porosité contrôlable et des propriétés mécaniques avantageuses selon les paramètres du procédé de fabrication choisis. L'utilisation de solvants organiques semble notamment être tout à fait pertinente pour améliorer certaines de ses caractéristiques, et en particulier la robustesse mécanique.

La difficulté de ce procédé de polymérisation réside dans le grand nombre de paramètres qui peuvent impacter la structure finale et les propriétés des gels obtenus. De plus, la stabilité à long terme n'est pas complètement maîtrisée et doit encore être étudiée.

5. Utilisation du PVA dans le domaine médical

Le PVA est largement utilisé dans de nombreux domaines biomédicaux, sous forme d'hydrogels en particulier [82].

En effet, ceux-ci ont des caractéristiques proches des tissus vivants, que ce soit en termes d'élasticité, de robustesse et de texture. Ils sont donc particulièrement attractifs pour mimer et/ou remplacer un tissu ou organe préexistant dont la fonction n'est plus assurée [83]. Les hydrogels de PVA sont notamment utilisés dans les domaines des prothèses artérielles [84, 85], des valves cardiaques [86], des pancréas artificiels [30, 31, 32], des implants de cornée [87, 34, 35], et des substituts cartilagineux [88]. Dans cette dernière application, les hydrogels de PVA agissent comme des membranes d'ultra-filtration qui excluent l'acide hyaluronique et concentrent le liquide synovial sur la surface cartilagineuse [89]. Ainsi, des prothèses à base de PVA sont étudiées afin de remplacer les greffes artificielles actuellement disponibles.

Dans le domaine des DMI, les hydrogels de PVA sont intéressants pour l'enrobage de ces implants. En effet, leur biocompatibilité permet une bonne intégration dans l'organisme hôte en évitant des réactions inflammatoires trop importantes [52, 53, 54, 55, 56]. De plus, leur porosité contrôlable est un atout considérable pour les DMI non-isolés, dont le fonctionnement s'appuie sur des échanges de matière avec leur hôte [60, 61, 90].

Le PVA n'est pas uniquement utilisé en tant que matériau bio-artificiel implantable, il sert également fréquemment à fabriquer des fantômes pour la recherche médicale. En effet, les expériences

de simulation médicale (biopsie, procédure chirurgicale, pose de stent, etc...) nécessitent d'utiliser des matériaux dont les propriétés sont similaires à celles des tissus vivants de l'application visée. Ces matériaux fantômes doivent avoir des taux de déformation élastique similaires à ceux des tissus vivants ciblés, ainsi qu'une stabilité structurelle à long-terme, une forte teneur en eau et une transparence permettant les observations [91, 92, 93].

Les hydrogels de PVA peuvent également servir de modèle de membranes afin d'élucider des problèmes fondamentaux de transports de masse puisque le transport de macromolécules est contrôlé par la morphologie du polymère. En effet, en plus de la taille des molécules, c'est la structure même du polymère qui va influencer la diffusion de ces dernières à travers la matrice de la membrane [94].

Le PVA semble pouvoir répondre aux besoins des dispositifs symbiotiques implantables puisqu'il peut être robuste, élastique, biocompatible et poreux, tout en empêchant des molécules telles que les anticorps d'attaquer le dispositif.

En m'appuyant sur la littérature [75, 76, 79], j'ai choisi d'étudier l'influence de certains paramètres du procédé de fabrication avec comme objectif d'optimiser les propriétés des gels obtenus pour le cas particulier de l'enrobage d'une biopile à glucose.

Chapitre III. Caractérisation physico-chimique du PVA

L'ensemble des essais et analyses décrits dans ce chapitre ont été réalisés sur des membranes d'épaisseur fixe égale à 1 mm, et de forme circulaire ou rectangulaire selon la technique utilisée.

A. Méthode de fabrication des gels de PVA

Afin de caractériser au mieux les hydrogels de PVA réticulés physiquement par cristallisation, un protocole de fabrication fonctionnel et le plus reproductible possible a été établi.

Le PVA (Sigma-Aldrich) utilisé pour ce travail a un poids moléculaire moyen de 85.000 - 124.000 et un degré d'hydrolyse de plus de 99 %, ce qui signifie que moins de 1 % du polymère est constitué de PVAc. Le DMSO (Sigma-Aldrich) est d'une très grande pureté : $\geq 99,9$ %.

Le PVA en poudre (10 % wt/vol) est dissous dans une solution de H₂O/DMSO (20 vol % / 80 vol %) chauffée à 120°C environ sur une plaque chauffante, et agitée en permanence grâce à un barreau aimanté. Une fois les cristaux de PVA complètement dissous dans la solution, le mélange est dégazé sous une cloche à vide puis coulé dans un moule. Ce dernier est constitué de deux lames de verre séparées par un espaceur en silicone de 1 mm d'épaisseur (Figure 15). L'objectif du moule est de pouvoir contrôler parfaitement les dimensions des membranes. La lame de verre supérieure est déposée en évitant de créer des bulles d'air et après avoir laissé le mélange refroidir à température ambiante pendant quelques minutes.

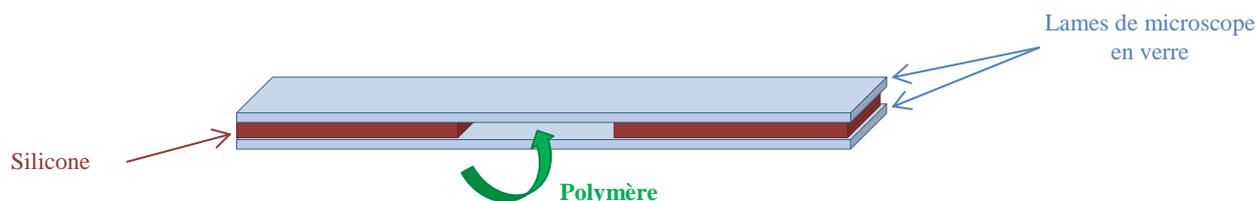


Figure 15: Moule de fabrication des membranes en PVA

Après avoir coulé le mélange dans un moule, des cycles de 12 heures ont été réalisés à l'aide d'une étuve programmable :

- 10h de congélation à -20°C
- 2h de décongélation à $+20^{\circ}\text{C}$
- passage d'une température à l'autre par un échelon.

Lorsque les cycles sont terminés, les membranes sont rincées abondamment avec de l'eau distillée, puis conservées en solution aqueuse. Cette eau de rinçage est changée tous les jours pendant 3 jours afin d'évacuer le DMSO. La quantité résiduelle de ce dernier composé a d'ailleurs fait l'objet d'analyses spécifiques décrites ultérieurement.

Les membranes obtenues sont des disques de 1 mm d'épaisseur et de 3,5 cm de diamètre, ou des rectangles de 1 cm de largeur et 5 cm de longueur pour une épaisseur de 1 mm également. Au toucher, elles sont lisses et légèrement collantes, gélatineuses et souples. Leur manipulation est aisée car elles sont élastiques et résistantes à l'étirement. Enfin, visuellement elles sont transparentes (Figure 16).



Figure 16: Membrane en PVA (épaisseur = 1 mm ; diamètre = 3.5 mm)

Plusieurs membranes ont été fabriquées en faisant varier le nombre de cycles et la concentration en DMSO de la solution aqueuse. De manière générale, il y eu de 3 à 15 cycles de congélation/décongélation ; et la concentration en DMSO était de 0 % ou 80 %.

Les deux aspects primordiaux de la caractérisation des hydrogels sont d'une part l'influence du DMSO sur la structure et les propriétés physico-chimique des membranes fabriquées, tout en étant conscient de sa toxicité ; et d'autre part l'optimisation de la porosité et de la perméabilité des

membranes. Ces dernières caractéristiques sont nécessaires au bon fonctionnement de la biopile en implantation dans un organisme vivant.

La majeure partie des expériences de caractérisations a été réalisée au sein de l'Institut Européen des Membranes (IEM) à Montpellier. Plus précisément, il s'agit de la spectroscopie FTIR, la diffraction de rayons X, la porosimétrie au mercure et les mesures d'élasticité. L'autre partie a été réalisée à Grenoble, au TIMC-IMAG. Il s'agit des mesures de gonflement, de diffusion et de FRAP.

B. Analyse de la structure interne

Dans cette première partie, nous nous concentrerons sur l'étude de la structure des hydrogels de PVA en fonction du nombre de cycles de congélation/décongélation, et en fonction de la concentration de DMSO utilisée dans le procédé de fabrication.

1. Composition chimique par spectroscopie FTIR

Afin de comparer la composition chimique de différents gels de PVA, des expériences de spectroscopie infra-rouge à Transformée de Fourier (FTIR) ont été réalisées. L'objectif était de mettre en évidence une corrélation entre la composition chimique et la structure interne des hydrogels selon le procédé de fabrication.

a) Technique

Cette technique est une classe de la spectroscopie qui traite de la région infrarouge du spectre électromagnétique. Elle recouvre une large gamme de méthodes, la plus commune étant un type de spectroscopie d'absorption. La spectroscopie FTIR exploite le fait que les liaisons des molécules possèdent des fréquences spécifiques pour lesquelles elles tournent ou vibrent en correspondance avec des niveaux d'énergie discrets (modes vibratoires). Le spectre IR d'un échantillon est établi en faisant passer un faisceau de lumière infrarouge au travers de cet échantillon. L'examen de la lumière transmise indique la quantité d'énergie absorbée à chaque longueur d'onde. L'analyse de ces caractéristiques informe des détails de la structure moléculaire de l'échantillon.

Sur les disques de PVA nous avons utilisé la méthode de « Spectroscopie par Réflexion Interne » ou « Réflexion Totale Atténuée » (ATR). Cette méthode permet d'obtenir des spectres qualitatifs de solides en s'affranchissant de l'épaisseur de l'échantillon.

Le principe est de faire subir au faisceau optique plusieurs réflexions à l'interface entre l'échantillon et un cristal transparent en infrarouge, mais d'indice de réfraction n_2 élevé (diamant) et dans la plupart des cas supérieur à celui de l'échantillon n_1 . En première approximation, d'après la loi de Descartes le faisceau infrarouge initial traverse le cristal et subit une réflexion totale à l'interface cristal-échantillon, puis est dirigé vers le détecteur. En réalité, le phénomène est perturbé par l'existence d'une onde progressive appelée évanescente (Figure 17). Celle-ci pénètre de quelques nanomètres dans l'échantillon se trouvant en contact direct avec le cristal et peut être absorbée : une partie de l'énergie est retenue et la réflexion totale est atténuée, on obtient alors un spectre d'absorption.

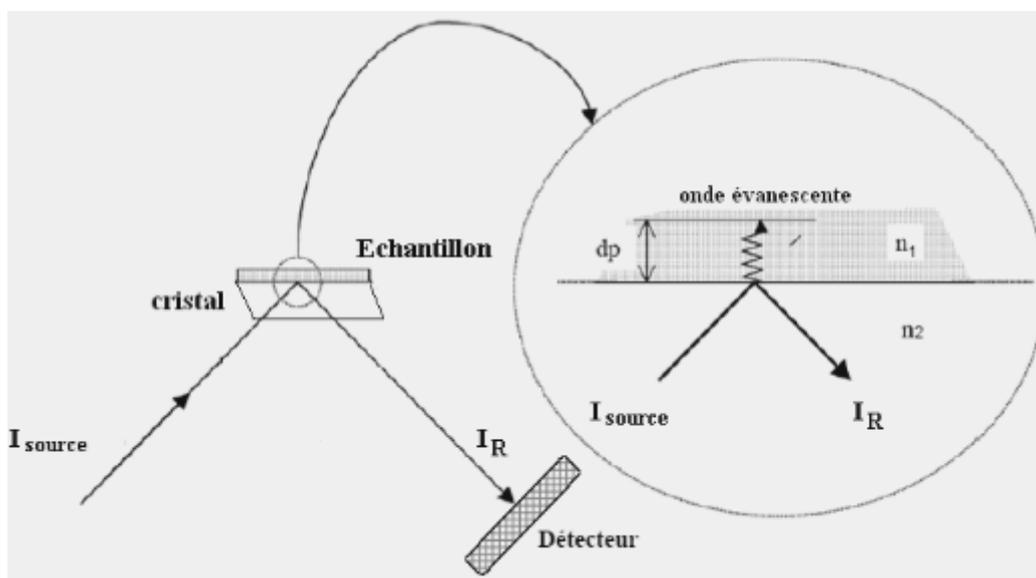


Figure 17: Principe de la Réflexion Totale Atténuée

Les avantages de cette technique sont multiples : la préparation de l'échantillon est minimale, le nettoyage de l'accessoire est simple et rapide, il est possible d'étudier les échantillons directement dans leur état naturel (sans préparation préalable), et enfin elle est très reproductible.

b) Résultats et Analyse

Les mesures ont été réalisées à l'IEM, sur un spectromètre Nicolet-710 FT IR (Figure 18).



Cône permettant
d'écraser
l'échantillon

Diamant

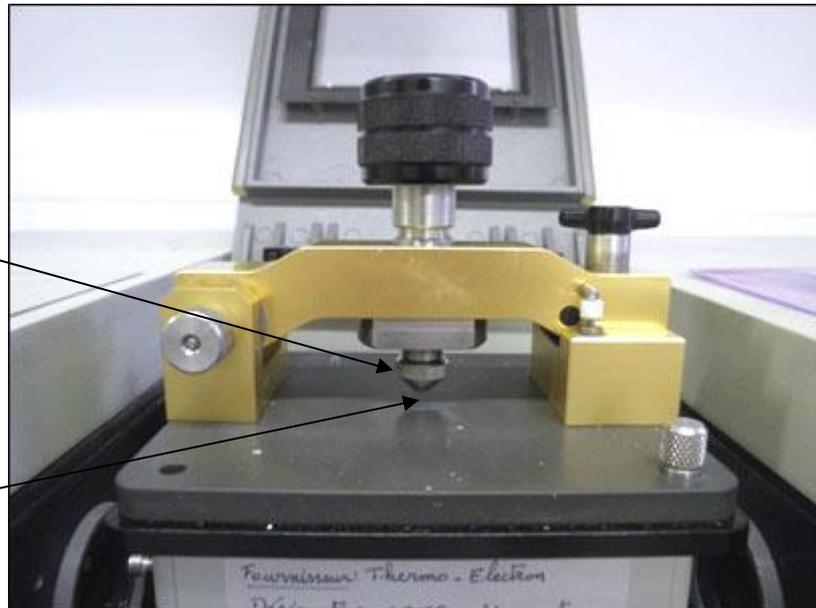


Figure 18: Spectromètre IEM (Nicolet-710 FT IR Spectrometer)

Afin de pouvoir discriminer dans les spectres des membranes les contributions du PVA, du DMSO et de l'eau, des spectres témoins ont été réalisés : PVA pur sous forme de poudre, DMSO pur liquide et eau distillée. Les résultats de ces mesures sont regroupés en Figure 19.

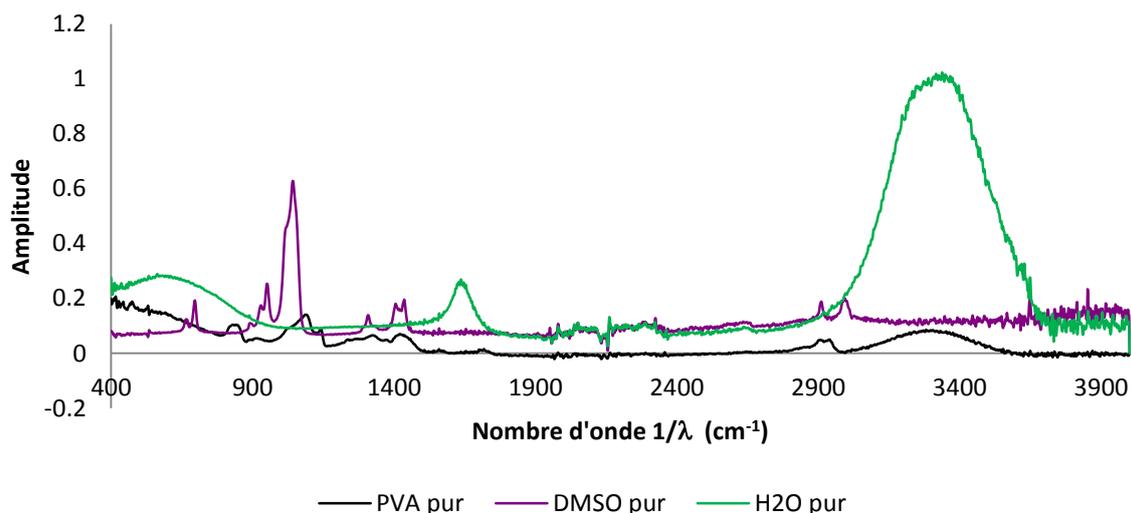


Figure 19: Spectres Infra-Rouge témoins : PVA pur sous forme de poudre (noir), DMSO pur liquide (violet), eau distillée (vert)

Pour chaque type de membrane analysée, 3 échantillons ont été mesurés. Cependant, étant donné qu'ils présentaient les mêmes bandes d'intensité, un seul spectre par type de membrane est rapporté dans les figures suivantes.

Les hydrogels à l'état humide ont été analysés et pour chacun leur spectre a été superposé à celui des témoins. Ceux-ci sont visibles en Figure 20. Nous observons que l'importante quantité d'eau contenue dans les membranes sature le spectre en mettant surtout en évidence les pics d'absorption de l'eau distillée. Nous avons donc réalisé d'autres spectres mais cette fois-ci sur des membranes séchées au préalable ; ceci nous a permis de révéler la présence du PVA. En effet, plusieurs pics caractéristiques du PVA n'apparaissent que sur les spectres des membranes sèches.

Pour la suite de l'étude, les spectres étudiés seront donc ceux des hydrogels déshydratés.

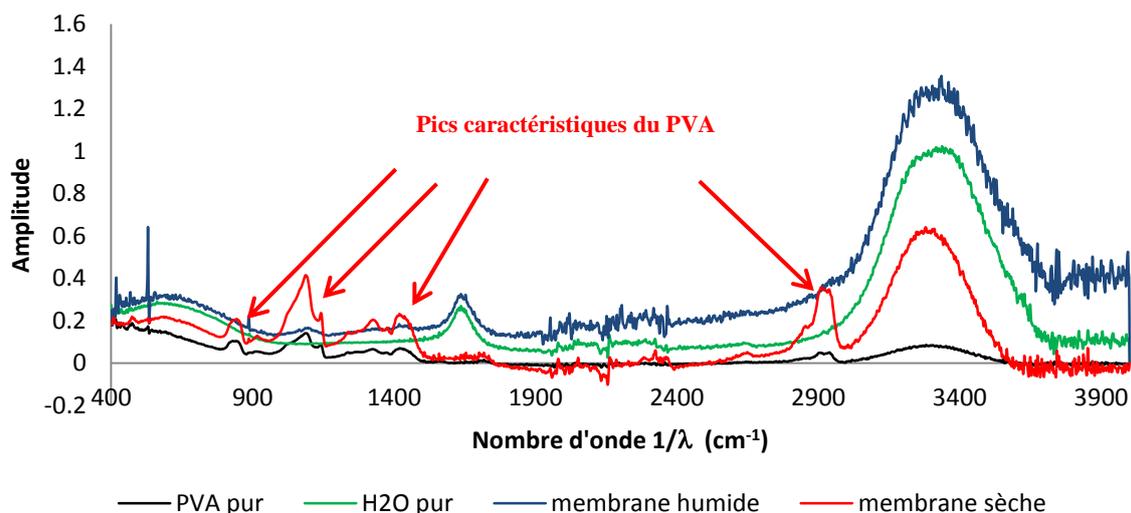


Figure 20: Comparaison des spectres IR d'une membrane humide (bleu) ou sèche (rouge) de PVA, fabriquée par un même procédé de fabrication, à ceux du PVA pur sous forme de poudre (noir) et de l'eau distillée (vert)

Des acquisitions ont été réalisées sur des membranes ayant subi 3, 5, 10 ou 15 cycles de congélation/décongélation. Le PVA était à une concentration de 10 % dans une solution aqueuse à 80 % de DMSO. Les résultats sont rapportés en Figure 21. On remarque que l'on retrouve les mêmes bandes d'intensité pour les différentes membranes, et que celles-ci se retrouvent également dans le spectre du PVA pur. Ces résultats nous permettent d'affirmer que la composition des gels de PVA ne varie pas significativement avec le nombre de cycles, et qu'elle est très proche de celle du PVA pur en poudre. Notons également que les spectres obtenus sont cohérents et similaires à ce qui peut être trouvé dans la littérature [95].

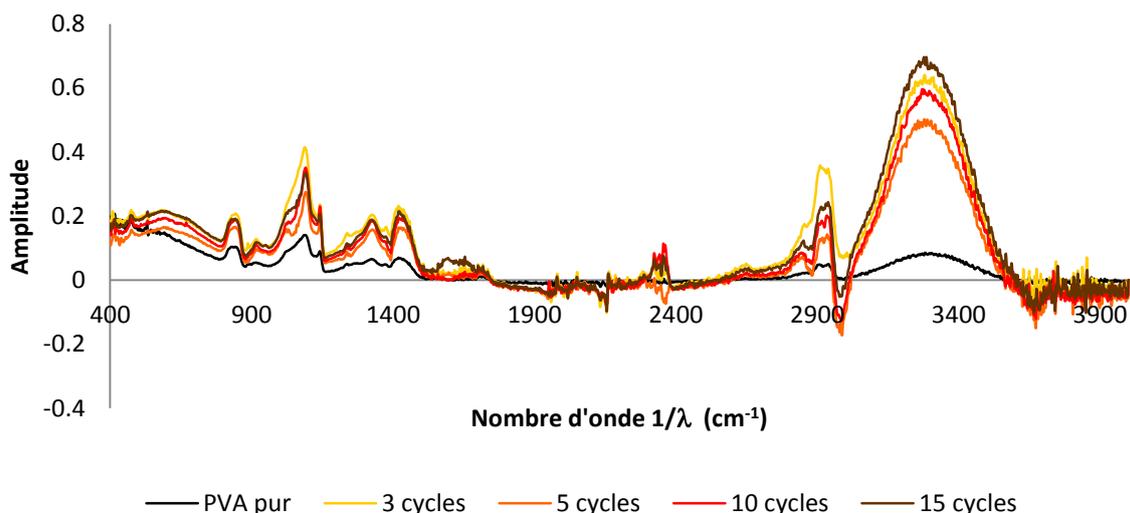


Figure 21: Comparaison des spectres IR de différentes membranes en fonction du nombre de cycles de congélation/décongélation : PVA à 10 % dans une solution aqueuse à 80 % de DMSO, 3 (jaune) / 5 (orange) / 10 (rouge) / 15 (marron) cycles

L'analyse s'est ensuite portée sur des membranes dont le nombre de cycles est fixé à 3, mais dont la quantité de DMSO dans le procédé de fabrication était de 0 % ou 80 %. Les résultats sont reportés en Figure 22. Comme on peut le remarquer, nous n'observons pas de différence majeure entre les spectres. En effet, le profil du spectre est le même quelle que soit la concentration du DMSO, et il est surtout similaire à celui du PVA pur en poudre. Nous pouvons donc en conclure que la présence de DMSO lors de la fabrication n'interviendra pas dans la composition des membranes finales.

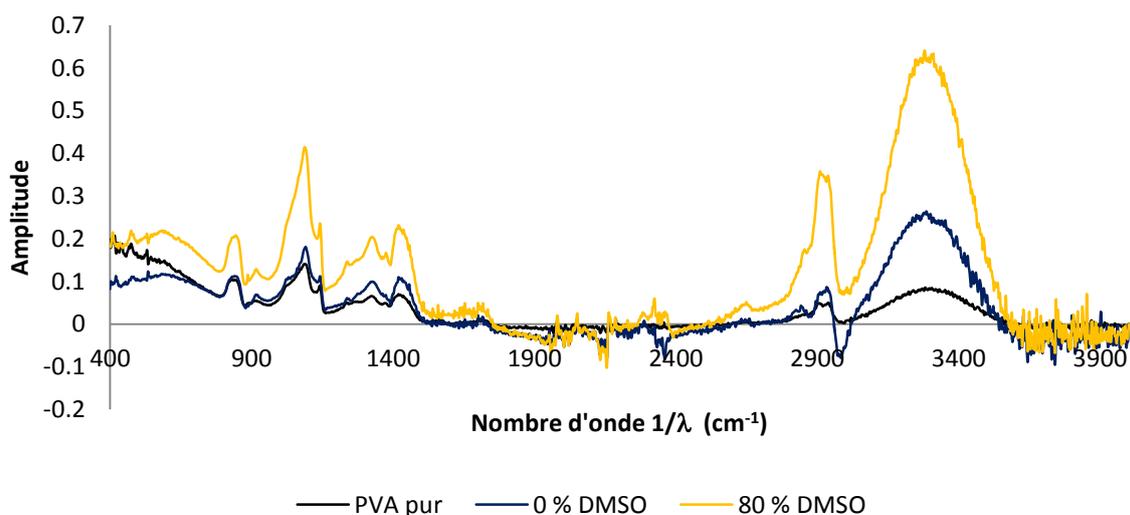


Figure 22 : Comparaison des spectres IR de différentes membranes en fonction de la présence (jaune) ou non (bleu) de DMSO dans le procédé de fabrication (pour un nombre de cycles fixé à 3)

Ainsi, les paramètres de fabrication employés (nombre de cycles et concentration de DMSO) n'influencent pas la composition chimique finale des échantillons. Ces derniers sont constitués de PVA et d'H₂O. Ceci est particulièrement intéressant étant donné la toxicité du DMSO (une étude spécifique est présentée dans le chapitre 4).

2. Cristallinité par diffraction de rayons X

Les hydrogels de PVA étant réalisés par cristallisation, l'étude de la cristallinité des gels finaux en fonction des paramètres de fabrication était primordiale. Pour cela, des expériences de diffractométrie aux rayons X ont été menées sur différents gels de PVA.

a) Technique

La cristallographie aux rayons X ou diffractométrie de rayons X (DRX) est une méthode d'analyse physico-chimique fondée sur la diffraction des rayons X sur la matière. La diffraction de Bragg n'a lieu que sur la matière cristalline, on parle alors de radiocristallographie.

Cette méthode utilise un faisceau de rayons X qui rencontre le cristal provoquant la diffusion du faisceau lumineux dans des directions spécifiques. Par la mesure des angles et de l'intensité des rayons diffractés, il est possible d'obtenir une représentation tridimensionnelle de la densité électronique dans le cristal. À partir de cette densité, la position moyenne des atomes du cristal peut être déterminée, ainsi que leurs liaisons chimiques, leur entropie et d'autres informations.

Bien que la diffraction de Bragg ne puisse avoir lieu sur un matériau amorphe (liquide, polymère amorphe, verre), les rayons X sont toutefois diffusés selon des directions préférentielles, ce qui permet d'extraire certaines informations sur la structure interne de l'échantillon.

On prépare l'échantillon sous la forme d'une poudre aplanie dans une coupelle, ou bien sous la forme d'une plaquette solide plate. On envoie des rayons X sur cet échantillon, et un détecteur fait le tour de l'échantillon pour mesurer l'intensité des rayons X selon la direction. Pour des raisons pratiques, on fait tourner l'échantillon en même temps, ou éventuellement on fait tourner le tube produisant les rayons X.

b) Résultats et Analyse

Le diffractomètre utilisé pour ces expériences est un appareil de l'IEM, un Philips Panalytical X'Pert-Pro. Notons que les membranes testées sont les mêmes que dans la partie précédente : avec 80 % de DMSO et 3/5/10/15 cycles, ou avec 0 % de DMSO et 3/5 cycles. Cette fois encore, pour

chaque type de membrane analysée, 3 échantillons ont été mesurés. Cependant, étant donné qu'ils présentaient les mêmes bandes d'intensité, un seul spectre par type de membrane est rapporté dans les figures suivantes.

Les spectres des membranes à l'état humide ont été réalisés et superposés sur la Figure 23. L'importante quantité d'eau contenue dans les gels donne un signal très bruité et peu significatif comme on peut le voir.

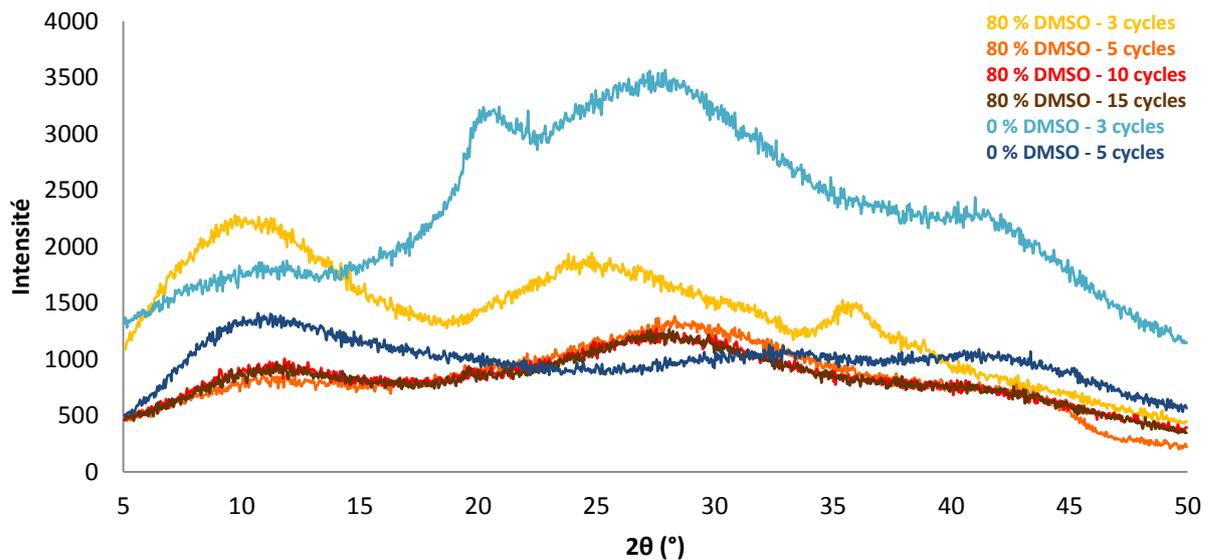


Figure 23: Spectres DRX de membranes de PVA à l'état humide

Ainsi, les membranes semblent amorphes mais on distingue tout de même de larges bandes d'intensité qui pourraient traduire un état semi-cristallin. Afin de s'affranchir des contributions provenant des molécules d'eau, des acquisitions ont été réalisées sur des membranes séchées à plat au préalable. Les spectres sont regroupés en Figure 24.

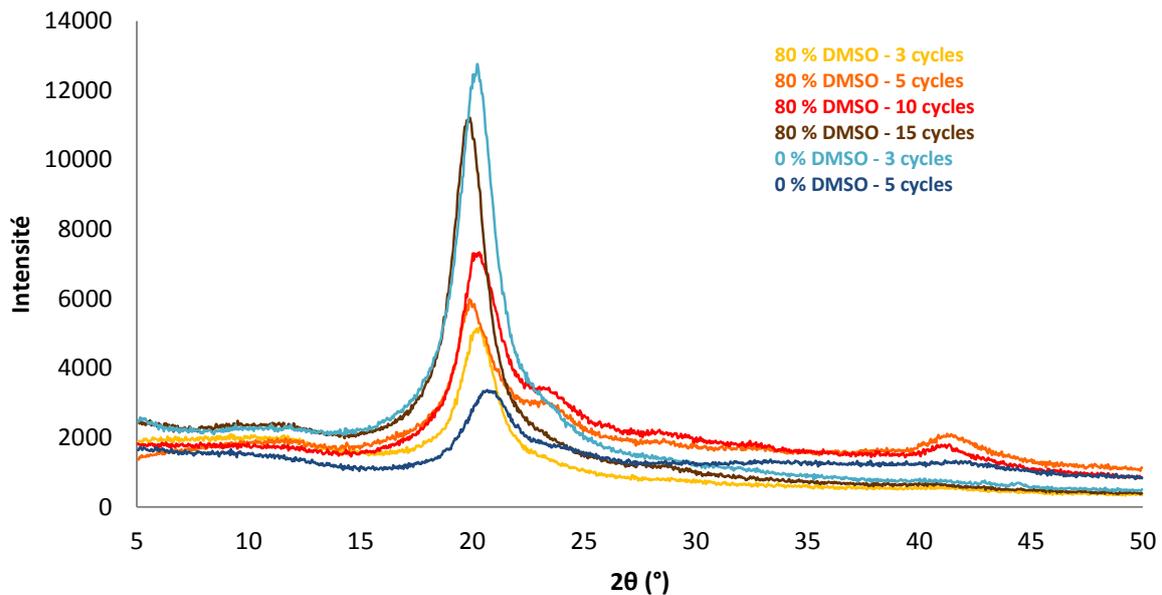


Figure 24: Spectres DRX de membranes de PVA sèches

Nous pouvons observer que toutes les membranes ont un spectre similaire, quels que soient le nombre de cycles et la concentration en DMSO. Chacune d'elle présente un fort pic de diffraction à $2\theta \approx 20^\circ$, avec une intensité plus ou moins importante. Ce pic est caractéristique du PVA [96]. Le fait qu'il soit large et qu'il n'y ait pas d'autre pic clairement défini aux angles plus élevés confirme la nature semi-cristalline du polymère.

Avec la Loi de Bragg (1), on peut calculer les distances interplanaires « d » qui correspondent à ces pics :

$$2d \sin \theta = n \cdot \lambda \quad (1)$$

où :

- d est la distance interplanaire (c'est-à-dire la distance entre deux plans cristallographiques),
- θ est l'angle de Bragg ou le demi-angle de déviation (moitié de l'angle entre le faisceau incident et la direction du détecteur)
- n est l'ordre de diffraction (ici égal à 1)
- λ est la longueur d'onde des rayons X (ici égale à 1.541 Å)

Les calculs des distances interplanaires des différentes membranes sont regroupés dans le tableau qui suit :

Paramètres de fabrication		Angle de Bragg " θ " ($^{\circ}$)	Distance interplanaire " d " (\AA)
80 % DMSO	3 cycles	10,1	4,39
	5 cycles	9,98	4,45
	10 cycles	10,0	4,44
	15 cycles	9,98	4,45
0 % DMSO	3 cycles	10,1	4,39
	5 cycles	10,3	4,31

Notons que les distances interplanaires retrouvées sont de l'ordre de 4,31 à 4,45 \AA , et sont cohérentes avec la littérature [70].

On peut remarquer que, quelle que soit la concentration de DMSO, le nombre de cycles ne semble pas avoir une influence significative sur la distance interplanaire. La présence de DMSO semble augmenter cette distance mais, étant donnée la largeur de certains pics de diffraction, une analyse plus poussée de la structure semi-cristalline serait hasardeuse. De plus, d'après les travaux de Hyon et Ikada [74, 75], le DMSO a un effet sur la dimension des pores et sur la proportion de cristaux dans les hydrogels de PVA. Aucun effet sur la distance interplanaire en elle-même n'est rapporté.

Ces mesures ont permis de démontrer que les hydrogels de PVA fabriqués via un procédé de congélation/décongélation ont une organisation semi-cristalline. Néanmoins, il existe des différences significatives d'intensité du pic qui correspondent au degré de cristallinité [96]. Cette grandeur permet de quantifier la proportion de cristaux dans la membrane, et elle peut être calculée à partir de l'aire sous la courbe du pic en question. Ainsi, plus le pic est intense et large, plus les cristaux sont présents en grande quantité.

D'après les résultats obtenus ci-dessus, pour des membranes dont la concentration en DMSO est identique (fixée à 80 %), le degré de cristallinité augmente avec le nombre de cycles. Ainsi plus le nombre de cycles de congélation/décongélation est élevé, plus la proportion de cristaux à l'intérieur des hydrogels de PVA est élevée, ce qui est en accord avec les travaux de Hickey et Peppas [80].

On notera qu'en ce qui concerne les membranes fabriquées sans DMSO, le degré de cristallinité diminue en passant de 3 à 5 cycles, ce qui n'est pas cohérent avec la littérature. Ce résultat pourrait être dû à une erreur dans le procédé de fabrication.

Ces analyses ont permis de montrer que la semi-cristallinité des hydrogels de PVA est assurée dès 3 cycles de congélation/décongélation, quelle que soit la concentration de DMSO, ce qui est primordial pour répondre à notre objectif. En effet, la semi-cristallinité assure la porosité, qui elle-même permet au glucose et à l'oxygène de diffuser jusqu'aux électrodes.

3. Porosité par porosimétrie au Mercure

Afin d'approfondir cette étude sur la structure des hydrogels de PVA, des mesures de porosité au mercure ont été réalisées. L'objectif était d'évaluer l'influence des paramètres de fabrication (nombres de cycles de congélation/décongélation, concentration en DMSO) sur la taille et la quantité des pores présents dans les membranes de PVA. Ces mesures sont complémentaires à celles présentées dans la partie précédente car la présence de pores est liée à la structure semi-cristalline des hydrogels [80].

a) *Technique*

Cette technique permet en effet l'investigation des milieux poreux en faisant pénétrer du mercure dans les pores du matériau sous pression croissante. Le mercure est, vis à vis de la quasi-totalité des solides, un fluide non mouillant : c'est à dire qu'il ne pénètre pas spontanément dans les cavités comme le ferait l'eau par exemple. Ceci permet de contrôler l'injection au moyen de la pression. À mesure que la pression augmente, le mercure occupe des régions de plus en plus confinées de la porosité, remplissant des pores de plus en plus fins. Les appareils les plus puissants sur le marché permettent de faire varier la pression de 3 kPa à 400 MPa, donnant accès aux pores dont la taille va de 400 μm à 3 nm environ.

L'information fournie par la caractéristique d'injection est un spectre de taille des pores présents dans le matériau. L'opération est pratiquée sur des échantillons de petite taille, typiquement centimétriques, qu'on introduit dans une cellule appelée pénétromètre. L'échantillon peut se présenter sous différentes formes. Il peut s'agir d'un fragment unique du matériau, de plusieurs fragments, ou de granulés, voire de poudre, dans la mesure où les particules composant la poudre sont elles-mêmes poreuses et la taille des pores comprise dans la gamme de l'appareil.

L'échantillon préalablement séché est placé dans le pénétromètre (Figure 25), un vide poussé est ensuite établi. Cette opération rend indispensable l'utilisation d'échantillons secs, car la pression atteinte lors de la mise sous vide est en principe inférieure à la pression de vapeur saturante de l'eau. Le mercure est ensuite introduit dans le pénétromètre à basse pression, puis la pression est augmentée progressivement. À chaque pas de pression, le volume pénétrant les pores est mesuré après stabilisation. En effet, la pénétration n'est pas instantanée et les porosimètres sont équipés d'un dispositif de régulation de la pression jusqu'à stabilisation à la valeur de consigne.

Le volume de mercure pénétrant dans le matériau est mesuré au moyen de la position du ménisque dans la tige capillaire du pénétromètre. Le métal liquide est poussé par de l'air puis par de l'huile.

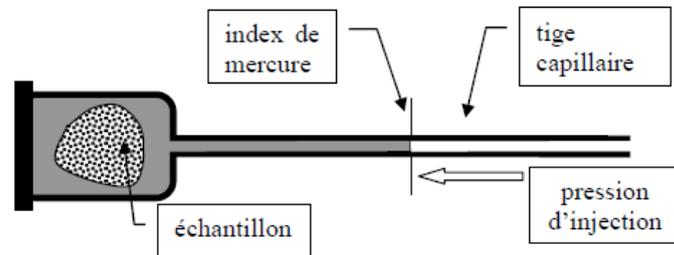


Figure 25: Pénétromètre

Le résultat brut d'un essai de porosimétrie au mercure est ainsi la caractéristique d'injection, qui donne le volume pénétré dans l'échantillon en fonction de la pression du mercure (Figure 26). Les logiciels associés aux porosimètres à mercure donnent généralement le volume de mercure par unité de masse du matériau (mL/g) et calculent par ailleurs la porosité, rapport du volume total des pores explorés au volume extérieur de l'échantillon.

Cette information est parfois complétée par la caractéristique d'extraction du mercure, obtenue en ajoutant dans la table de pression, après la pression maximale, une série de valeurs décroissantes, jusqu'à la pression atmosphérique. L'expérience d'extraction montre que la pénétration du mercure est

un phénomène irréversible. Un volume de mercure plus ou moins important reste piégé dans l'échantillon en fin d'extraction.

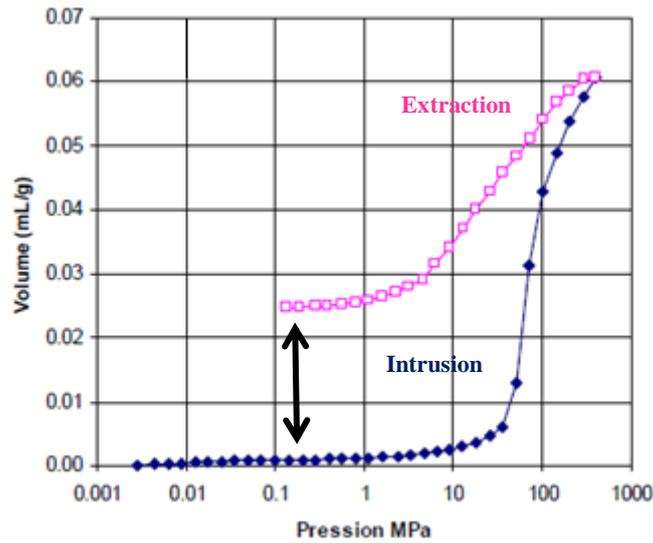


Figure 26: Caractéristiques d'injection et d'extraction brutes

Après traitement, le logiciel fournit également le volume d'intrusion en fonction du diamètre des pores calculé (Figure 27) : la courbe d'intérêt est celle d'intrusion (en rouge). On distingue deux zones où le volume d'intrusion augmente rapidement : la première n'est pas exploitable car elle correspond au remplissage initial de la cellule et de ses espaces vides. En revanche, la seconde correspond au remplissage effectif des pores du matériau étudié. Ainsi, la taille des pores issue de cette figure se situe autour de 10 nm.

Les principales informations obtenues par cette expérience sont le volume total d'intrusion, le diamètre moyen des pores et le pourcentage de porosité.

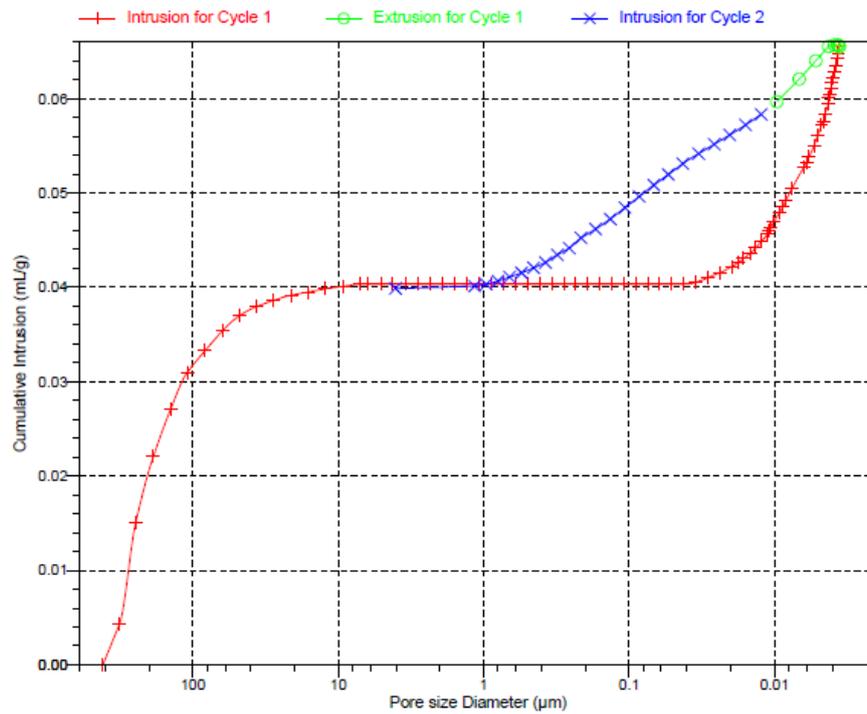


Figure 27: Caractéristique d'intrusion après traitement

b) Méthode

Les expériences ont été réalisées sur un appareil de l'IEM, un Autopore IV 9500 (Micromeritics) (Figure 28).

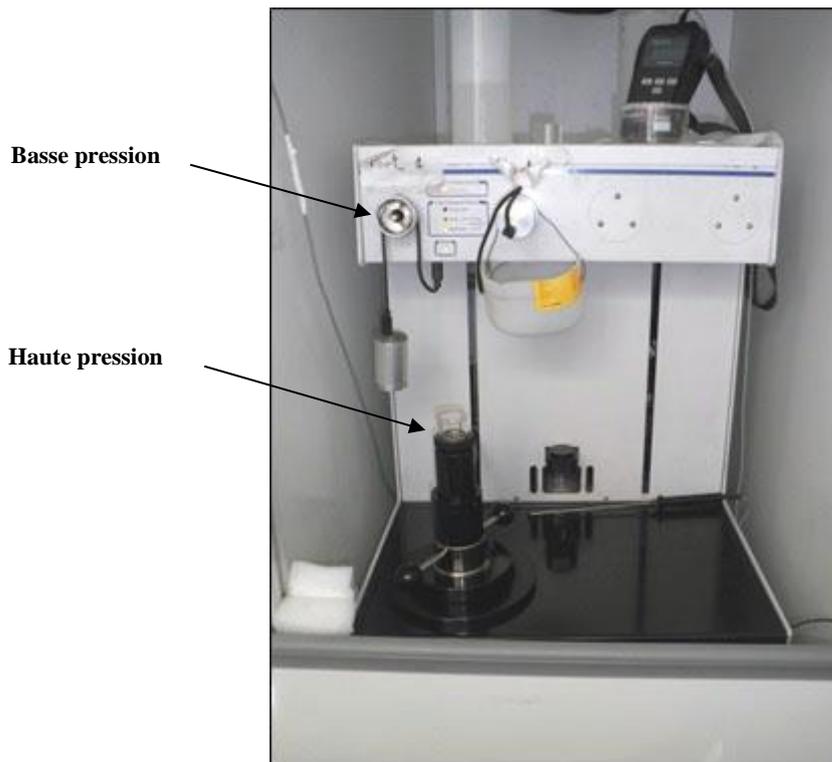


Figure 28: Porosimètre au Mercure IEM

Notons que la porosimétrie au mercure est une technique adaptée aux matériaux inorganiques. Les hydrogels de PVA étant organiques, il a fallu les faire sécher au préalable. La porosité des gels séchés n'est pas la même que celle des gels humides, mais nous voulions surtout faire une étude comparative selon les paramètres de fabrication.

Ainsi, après avoir fait sécher plusieurs membranes dont le nombre de cycles ou la concentration en DMSO étaient différents, elles ont été découpées en petits morceaux afin d'en mettre la plus grande quantité possible dans le pénétrromètre. En effet, les échantillons étaient si peu poreux qu'il fallait maximiser la surface de contact avec le mercure afin que les résultats obtenus soient justes (bonne position du ménisque dans la tige du pénétrromètre).

c) Résultats et Analyse

Pour chaque type de membrane étudié, un seul échantillon a été analysé au cours d'une première série de mesures. Par la suite, des mesures complémentaires ont été nécessaires pour certains échantillons afin de s'assurer des valeurs mesurées (80 % DMSO et 5 cycles).

Les informations les plus pertinentes dans cette expérience sont le diamètre moyen des pores et le pourcentage de porosité. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

		Diamètre moyen des pores (nm)	Porosité (%)
80 % DMSO	3 cycles	9,9	5,27
	5 cycles	21,4	10,9
	10 cycles	10,2	5,69
	15 cycles	8,8	5,08
0 % DMSO	3 cycles	67,7	27,0
	5 cycles	16,2	8,30

Ainsi, il est mis en évidence que la présence de DMSO dans le procédé de fabrication a une influence importante sur la porosité des membranes finales : le DMSO diminue significativement la taille des pores ainsi que leur pourcentage. En effet, comme évoqué précédemment, l'utilisation de solvant dans le procédé de fabrication favorise la cristallisation sans variation de volume. Ceci permet la formation de pores plus petits [74, 75].

Remarquons que les membranes fabriquées avec 80 % de DMSO et ayant subi 5 cycles se démarquent par rapport aux autres. Plusieurs mesures ont été réalisées sur des échantillons de ce même type, mais les résultats étaient toujours les mêmes. A ce jour, il n'a pas été possible d'expliquer cette valeur.

Si l'on se concentre sur les membranes fabriquées sans DMSO, le passage de 3 à 5 cycles réduit la taille des pores d'environ 75 % et la porosité d'environ 70 %. Donc plus le nombre de cycles est grand, plus les pores sont petits et peu nombreux.

En mettant en relation ce résultat avec ce qui est démontré dans la partie précédente, l'augmentation du nombre de cycles de congélation/décongélation a pour effet d'augmenter le degré de cristallinité et de diminuer la porosité simultanément. Ainsi, ces deux grandeurs sont inversement proportionnelles. Si l'on se reporte au modèle de Yokoyama [73], cela s'explique par le fait qu'en augmentant le nombre de cycles, le nombre de cristaux de PVA augmente progressivement et leur proportion dans l'hydrogel devient importante. En parallèle de ce phénomène, on observe une densification des zones de PVA amorphe en périphérie des lacunes d'eau. Ainsi, la taille des lacunes diminue progressivement, ce qui revient à dire que la porosité diminue.

Notons que pour les membranes fabriquées avec 80 % de DMSO, le diamètre moyen des pores est faible (de l'ordre de 10 nm) et stable dès 3 cycles de congélation/décongélation. Les hydrogels de PVA étant séchés au préalable pour ces expériences de porosimétrie au mercure, la taille des pores mesurée est égale ou inférieure à celle des membranes humides. Comme détaillé dans la section D de

ce chapitre, cette taille de pores permet la diffusion du glucose à travers les hydrogels de PVA. En effet, cette molécule a une taille moyenne de 1,5 nm.

C. Propriétés mécaniques

Dans cette troisième partie, nous nous intéresserons aux propriétés mécaniques des hydrogels de PVA en fonction du nombre de cycles de congélation/décongélation, et en fonction de la concentration de DMSO utilisée dans le procédé de fabrication.

1. Gonflement

La mesure de gonflement d'un polymère, en anglais « *swelling ratio* », informe sur la capacité dudit matériau à absorber le liquide dans lequel il est plongé (généralement de l'eau). Ce comportement dépend de l'affinité du polymère pour le liquide, mais aussi de sa capacité à se déformer pour accepter des molécules au sein de son réseau. Cette dernière caractéristique est directement liée à la polymérisation du matériau. La caractérisation du gonflement du PVA reflète donc son niveau de polymérisation et, indirectement, ses propriétés mécaniques.

a) Méthode

Les propriétés de gonflement de différents hydrogels de PVA ont été comparées en fonction du nombre de cycles réalisés (3/5/10/15) et en fixant la concentration de DMSO initiale à 80 %. Deux méthodes de moulage ont été testées: directement dans le fond d'une boîte de Pétri ou entre deux lames de verre dans un moule en silicone. La polymérisation se fait donc avec ou sans contrainte, respectivement.

Les membranes ont été pesées directement après la fin des cycles de congélation/décongélation (masse initiale, m_i), puis elles ont été plongées dans de l'eau distillée. Elles ont alors été pesées après 24 heures de rinçage (m_{24}), puis 48 heures (m_{48}) et enfin 72 heures (m_{72}). Une membrane par nombre de cycle a été pesée.

Notons que nous n'évoquerons que brièvement les résultats des mesures de gonflement réalisées après séchage complet sous étuve, car cette étape modifie la structure des hydrogels de PVA de manière irréversible. De plus, dans le cas particulier de l'encapsulation de la biopile, le polymère sera maintenu à l'état humide tout au long du procédé.

b) Résultats et Analyse

Les résultats des hydrogels coulés dans le fond de boîtes de Pétri sont visibles en Figure 29. On observe une différence significative de comportement entre ceux qui ont subi 3 ou 5 cycles de congélation/décongélation et ceux qui en ont subi 10 ou 15.

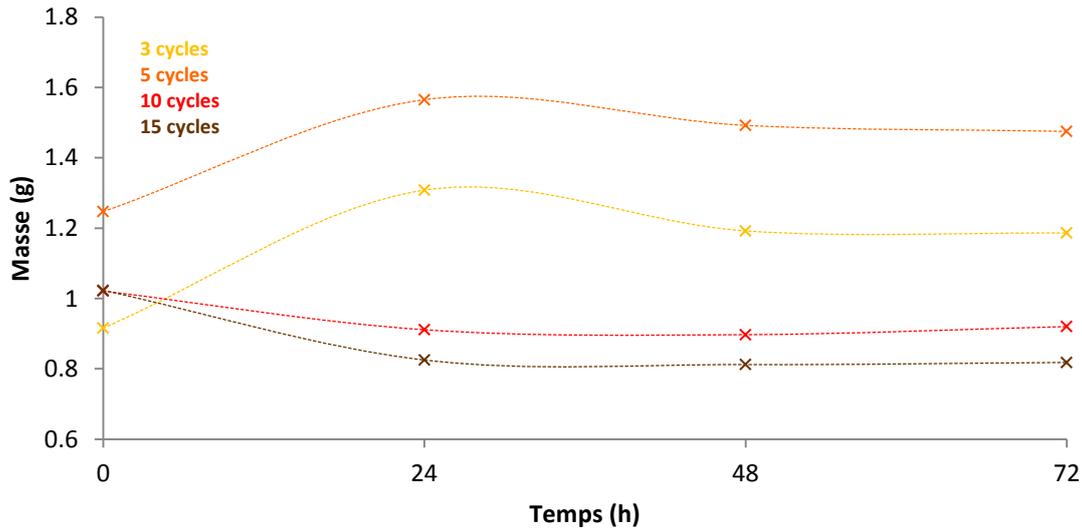


Figure 29: Evolution de la masse des hydrogels de PVA en fonction du temps de rinçage et du nombre de cycles de congélation/décongélation, pour des hydrogels coulés dans le fond de boîtes de Pétri

En effet, les deux premiers types d'hydrogels (3 et 5 cycles) présentent une augmentation de leur masse de l'ordre de 20 % après 24h de rinçage. Puis celle-ci diminue pour se stabiliser à un niveau plateau dont la valeur est supérieure à la masse initiale. Ce comportement peut s'expliquer par la combinaison de plusieurs mécanismes: incorporation de l'eau distillée à l'intérieur des membranes, et expulsion du DMSO en surplus ainsi que des résidus de PVA non polymérisés. Ainsi, le taux de gonflement (Swelling Ratio, SR) caractéristique de ces hydrogels peut être calculé à 72h, lorsque leur masse a atteint le plateau, d'après la formule suivante :

$$SR^{72h} (\%) = \frac{m_{72} - m_i}{m_i} \cdot 100 \quad (2)$$

	3 cycles	5 cycles
SR ^{72h} (%)	29,5	18,3

Le même type d'analyse est possible sur les membranes ayant subi 10 et 15 cycles de congélation/décongélation. Celles-ci présentent plutôt une légère diminution de leur masse au cours du temps de rinçage jusqu'à un plateau inférieur à la masse initiale. Cela peut s'expliquer par le fait que les hydrogels se vident du DMSO en surplus et des résidus de PVA non polymérisés, mais leur capacité de gonflement est relativement faible du fait d'une polymérisation plus importante. Ainsi, le taux de gonflement à 72h est donc négatif, car la masse a diminué par rapport au début du rinçage.

	10 cycles	15 cycles
SR^{72h} (%)	- 9,9	- 20

Pour conclure, il apparaît que le nombre de cycles de congélation/décongélation a une influence sur les propriétés de gonflement des hydrogels de PVA : plus le nombre de cycles est élevé, moins le taux de gonflement est important.

Ce résultat est cohérent avec la partie précédente puisque la porosité des hydrogels correspond à leur capacité de stockage en eau. Ainsi, plus le nombre de cycles est grand, plus le degré de cristallinité est élevé et moins la capacité de stockage en eau est importante. De plus, le degré de cristallinité est fortement lié à la capacité de déformation des hydrogels de PVA puisque les cristaux représentent des nœuds rigides dans un matériau constitué de chaînes amorphes et mobiles. Si la proportion en cristaux augmente, la mobilité des chaînes amorphes va diminuer et la capacité de gonflement sera restreinte.

D'après les deux types de comportement observés ici, nous pouvons en conclure qu'à partir de 10 cycles la capacité de gonflement est significativement réduite. L'évolution de la masse durant le rinçage est alors dirigée par l'évacuation du DMO. La réticulation semble donc complète et maximale dès 10 cycles de congélation/décongélation : on n'observe plus de gain de masse durant les premières 24h.

La même étude a été réalisée sur des hydrogels de PVA coulés entre deux lames de verre séparées par un moule en silicone. Les mesures de masse en fonction du temps de rinçage sont regroupées en Figure 30.

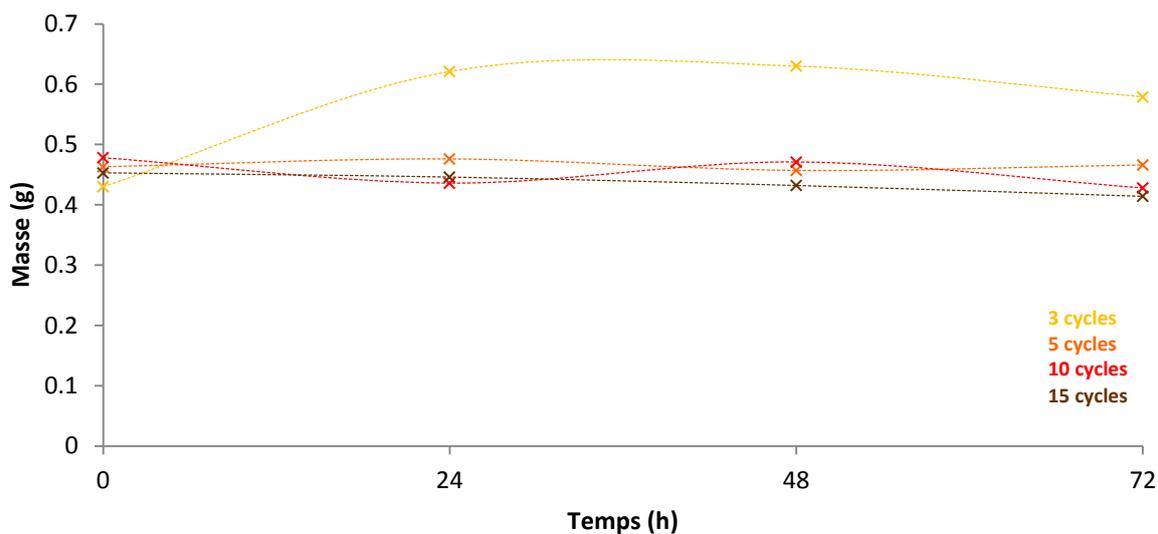


Figure 30: Evolution de la masse des hydrogels de PVA en fonction du temps de rinçage et du nombre de cycles de congélation/décongélation, pour des hydrogels coulés entre deux lames de verre et un moule en silicone

Deux comportements sont à nouveau identifiables, mais cette fois-ci la membrane qui a subi 3 cycles est différente des trois autres (5, 10 ou 15 cycles). La masse de celle-ci augmente pour finalement se stabiliser à une valeur correspondant à un swelling ratio de 34.7 %. Les autres membranes ont tendance à perdre de la masse de manière linéaire. Le tableau qui suit regroupe les valeurs de SR après 72h de rinçage.

	3 cycles	5 cycles	10 cycles	15 cycles
SR ^{72h} (%)	34,7	0,65	- 10,5	- 8,6

En faisant le même raisonnement que précédemment, nous pouvons en conclure que cette fois-ci la réticulation semble complète et maximale à partir de 5 cycles de congélation/décongélation. Ainsi, lors du rinçage, la variation de masse est dirigée par l'évacuation du DMSO.

Comme évoqué précédemment, nous avons réalisé le même type de mesures sur des membranes plongées dans de l'eau pendant 72 heures, puis séchées dans une étuve à 27 °C pendant 24 heures. La proportion d'eau dans les hydrogels étant très élevée, les mesures de gonflement obtenues étaient de l'ordre de 1300 % (pour 3 cycles) à 650 % (pour 15 cycles) selon le nombre de cycles de congélation/décongélation réalisé.

Gupta *et. al.* [96] retrouvent des valeurs de swelling ratio de l'ordre de 1550 % pour des hydrogels de PVA à 10 %, fabriqués sans utilisation de solvant, et ayant subi 45 cycles de congélation/décongélation. Dans ce cas, l'influence du DMSO est mise en évidence puisque nous obtenons les mêmes capacités de gonflement dès 3 cycles de congélation/décongélation, avec une concentration initiale en DMSO fixée à 80 %. Dans la littérature, d'autres valeurs de swelling ratio peuvent être retrouvées, mais elles ne peuvent pas être comparées aux nôtres étant données les différences des procédés de fabrication des hydrogels de PVA.

Retenons que cette étape de séchage engendre des modifications structurelles irréversibles dans les membranes, c'est pourquoi nous nous attacherons au contraire à éviter tout séchage de l'enrobage au cours du processus d'encapsulation des électrodes de la biopile.

Ces expériences ont permis de mettre en évidence que la mise sous contraintes de l'hydrogel de PVA par les deux lames de verre au cours du procédé de cristallisation a pour effet d'accélérer le processus de réticulation. Celle-ci semble complète dès 5 cycles de congélation/décongélation lorsqu'elle est réalisée sous contraintes, alors qu'elle ne l'est qu'à partir de 10 cycles autrement. Un autre avantage de la polymérisation entre deux lames de verre est qu'elle permet un meilleur contrôle de l'épaisseur. C'est pourquoi nous avons privilégié cette méthode pour la suite des études.

2. Elasticité et robustesse

Nous avons vu précédemment que la proportion de la structure cristalline des hydrogels de PVA avait une influence sur la porosité et par conséquent sur la robustesse également. Comme l'enrobage des électrodes de la biopile à glucose doit être relativement résistant aux déchirures, à la manipulation et aux étirements, il était important d'étudier et d'optimiser les propriétés mécaniques des hydrogels en fonction des paramètres de fabrication. Pour cela, des expériences de rhéologie extensionnelle ont été réalisées.

a) Méthode

Le principe de cette expérience est le suivant : une membrane de polymère est fixée à l'horizontale sur deux tambours verticaux à l'aide de mors qui la pincent (Figure 31). Les deux tambours vont tourner sur eux-mêmes dans des sens opposés afin d'exercer une contrainte sur la membrane qui va alors se déformer. L'étude de la contrainte en fonction de la déformation nous donnera le module d'élasticité longitudinale. Les expériences ont été réalisées sous une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ et sans flux d'air pour que les membranes restent humides.



Figure 31: Rhéomètre utilisé, Positionnement de la membrane dans les mors (Anton Paar Physica MCR301 - Géométrie UXF12, Four CTD180)

b) Résultats et Analyse

Différentes membranes ont été testées, l'objectif était de comparer leur comportement en réponse à l'étirement par rapport à leurs paramètres de fabrication : nombre de cycles de congélation/décongélation et pourcentage en DMSO. Pour chaque type de membrane, 3 échantillons ont été caractérisés. Les courbes obtenues pour chacune des membranes avaient la même allure (Figure 32) : une première pente correspondant à un 1^{er} module d'élasticité, une seconde pente correspondant à un 2^{ème} module d'élasticité, puis un maximum correspondant à la rupture.

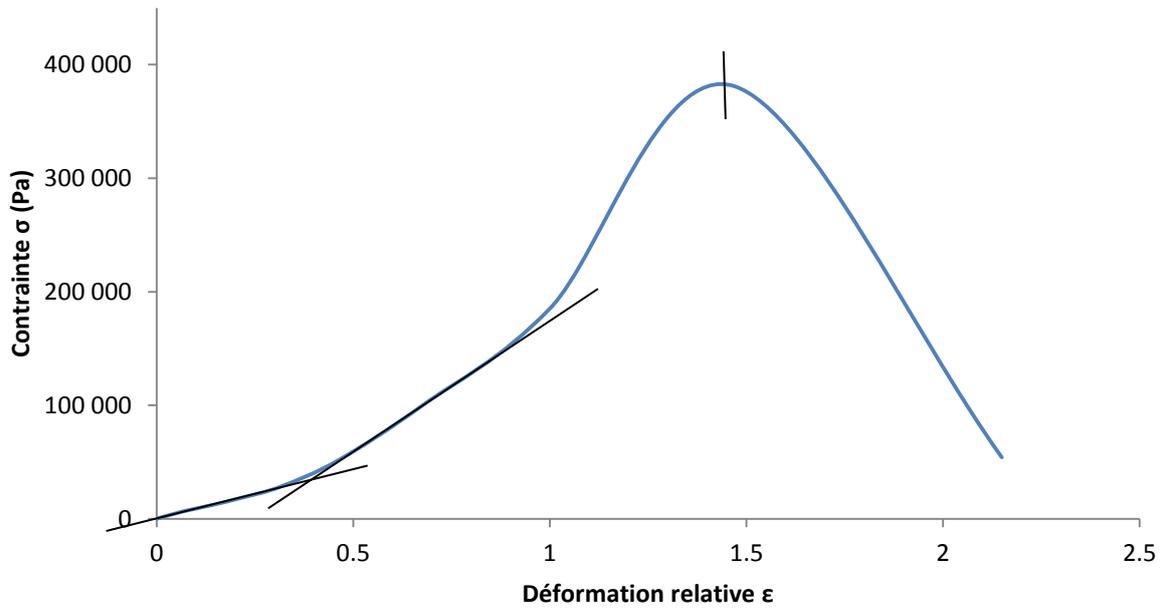


Figure 32: Contrainte en fonction de la déformation d'un hydrogel de PVA

Pour chacun des 6 types de membranes testés, le pourcentage de déformation à la rupture ainsi que le 1^{er} et le 2^{ème} module d'élasticité ont été calculés. Les résultats sont regroupés sur les Figure 33, Figure 34 et Figure 35, respectivement.

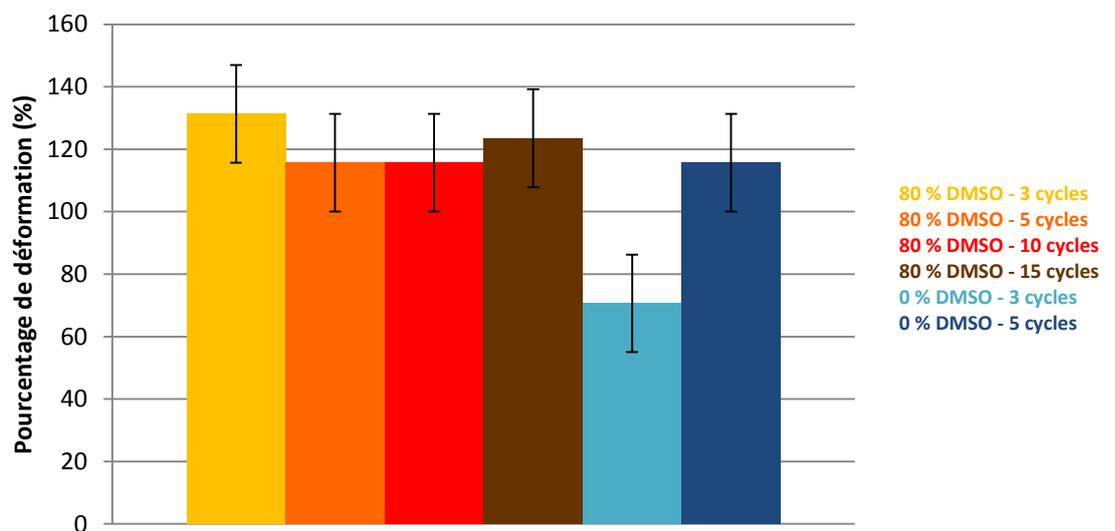


Figure 33: Pourcentage de déformation à la rupture

D'après la Figure 33, les membranes contenant 80 % de DMSO dans le procédé de fabrication ne montrent pas de différence significative de la déformation à la rupture selon qu'elles aient subi 3/5/10/15 cycles. La rupture a lieu à environ 122 % de déformation. Par contre, lorsqu'il n'y a pas de DMSO dans le procédé de fabrication il y a une différence significative entre une membrane qui a subi 3 cycles de congélation/décongélation et une autre qui en a subi 5. Après 3 cycles, la rupture a lieu à seulement 71 % \pm 16 % de déformation, alors que cette valeur atteint 116 % \pm 16 % après 5 cycles. Cette dernière valeur est comparable à celles des membranes fabriquées avec 80 % de DMSO. Le solvant permet donc d'atteindre une résistance à la déformation maximale dès 3 cycles thermiques, alors qu'il en faut 5 sans lui. S'il n'y a pas de DMSO dans le procédé de fabrication, il faut augmenter le nombre de cycles de congélation/décongélation pour obtenir une résistance à la déformation maximale de l'ordre de 120 %.

Xu *et. al.* [35] mesurent une déformation à la rupture de 170 % pour des hydrogels de PVA fabriqués à partir d'une solution aqueuse de DMSO à 80 %, et ayant subi 7 cycles de congélation/décongélation. Néanmoins leur concentration en PVA n'est pas connue et le procédé de fabrication est légèrement différent.

D'autre part, si l'on compare la déformation à la rupture du PVA (égale à 120 %) à celle d'autres polymères utilisés comme enrobages semi-perméables dans des applications biomédicales [97], celle-ci est inférieure. En effet, le silicone a un pourcentage de déformation à la rupture de l'ordre de 220 %, tandis que celui du polyuréthane est de l'ordre de 270 %, et celui d'un composite de PDMS et polyuréthane est de l'ordre de 285 %. Ainsi, les hydrogels de PVA sont moins résistants à l'étirement que ces matériaux, mais leurs propriétés sont tout à fait satisfaisantes pour l'application visée.

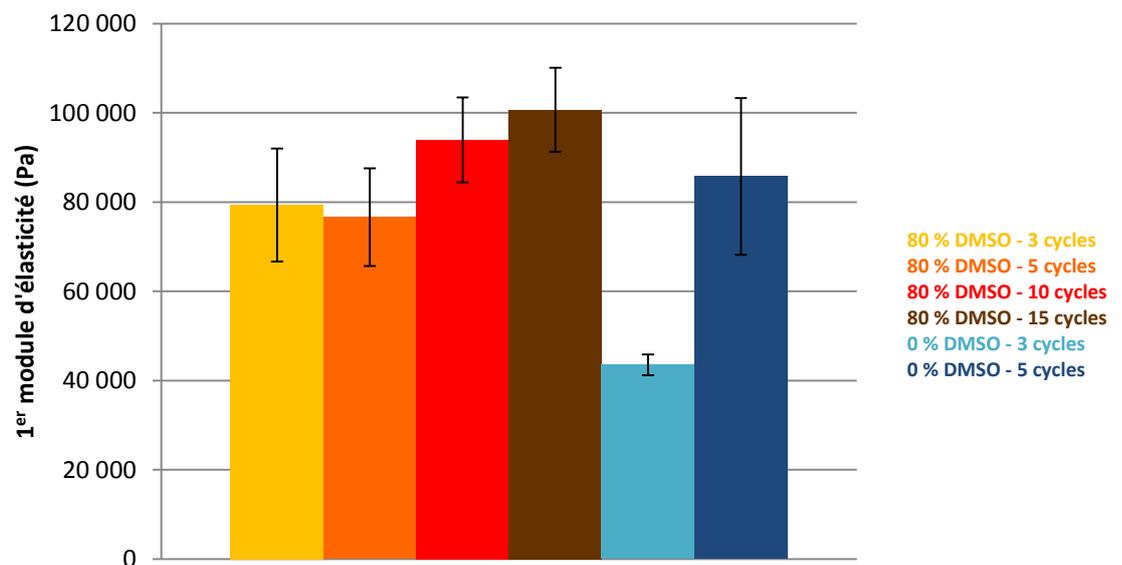


Figure 34: 1^{er} Module d'élasticité (Pa)

D'après la Figure 34, si l'on considère les membranes produites avec 80 % de DMSO, le 1^{er} module d'élasticité semble être influencé par le nombre de cycles, contrairement à la déformation à la rupture. Entre 3 et 5 cycles de congélation/décongélation, ce 1^{er} module d'élasticité apparaît relativement stable, mais il augmente successivement à 10 cycles et 15 cycles, passant de $77 \text{ kPa} \pm 11 \text{ kPa}$ pour 5 cycles à $101 \text{ kPa} \pm 9,4 \text{ kPa}$ pour 15 cycles. Une augmentation significative du nombre de cycles a donc pour effet d'augmenter le 1^{er} module d'élasticité.

Les membranes produites sans DMSO voient leur module d'élasticité augmenter de $44 \text{ kPa} \pm 2,32 \text{ kPa}$ à $86 \text{ kPa} \pm 18 \text{ kPa}$ quand le nombre de cycles passe de 3 à 5, il est alors comparable à celui des membranes produites avec 80 % de DMSO. Le solvant semble donc permettre d'atteindre un 1^{er} module d'élasticité élevé dès 3 cycles.

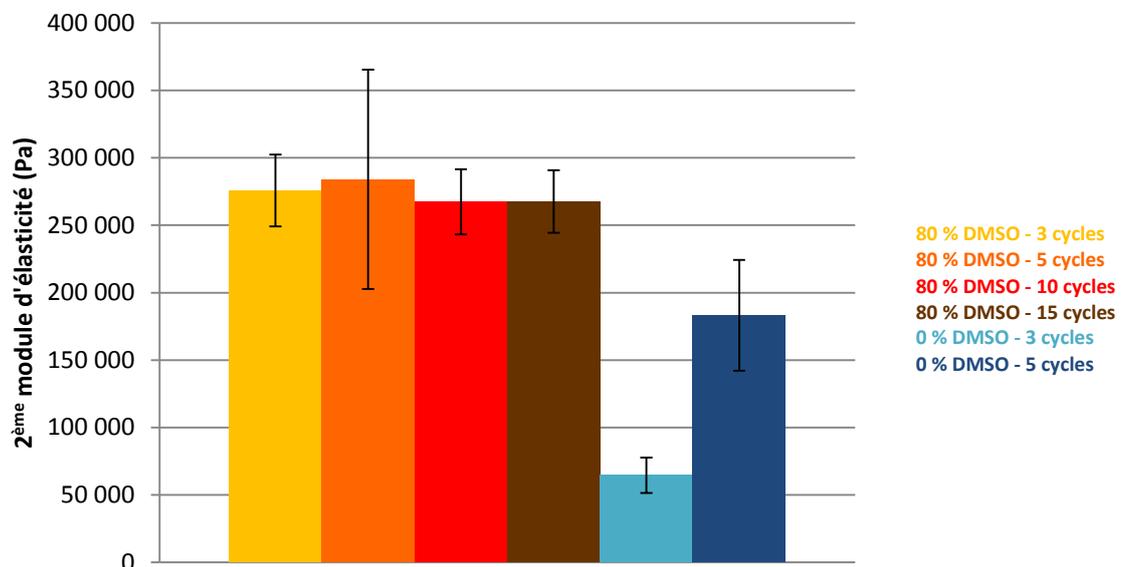


Figure 35: 2^{ème} Module d'élasticité (Pa)

Sur cette troisième figure on observe que le 2nd module d'élasticité des échantillons produits avec du DMSO ne semble pas être influencé par le nombre de cycles, il stagne à environ 275 kPa. En l'absence de DMSO, ce module est de $65 \text{ kPa} \pm 13 \text{ kPa}$ après 3 cycles et augmente à $183 \text{ kPa} \pm 41 \text{ kPa}$ au bout de 5 cycles. A ce moment-là, il n'est pas encore comparable à celui des membranes fabriquées avec 80 % de DMSO. Comme pour le 1^{er} module, le solvant permet d'atteindre rapidement une valeur élevée du 2nd module d'élasticité. On peut imaginer que ce dernier augmentera encore pour des membranes fabriquées sans DMSO si le nombre de cycles de congélation/décongélation est supérieur à 5. Gupta et. al [96] mesurent des modules d'élasticité considérablement supérieurs aux nôtres puisqu'ils sont de l'ordre de 70 MPa pour des hydrogels à 10 % de PVA, fabriqués sans solvant, et

ayant subi 45 cycles de congélation/décongélation. Le nombre élevé de cycles ainsi que la non-utilisation de solvant rend cette mesure peu comparable aux nôtres.

Pour conclure, ces résultats sont en accord avec la littérature : l'élasticité et la robustesse des hydrogels de PVA augmentent avec le nombre de cycles de congélation/décongélation qu'elles ont subi. En effet, plus le nombre de cycles est grand, plus la proportion de cristaux dans l'hydrogel est importante. Ces cristaux constituant des points d'ancrage rigides pour les chaînes de PVA amorphe, la structure globale est d'autant plus rigide que la proportion de cristaux est importante.

D'autre part, la présence de DMSO dans le procédé de fabrication permet d'atteindre les meilleures propriétés mécaniques avec moins de cycles. Ainsi, avec 80 % de DMSO, dès 3 cycles de congélation/décongélation, l'élasticité et la robustesse des membranes en PVA semblent optimales.

Ces expériences permettent donc de confirmer l'intérêt du solvant dans le procédé de fabrication, afin d'obtenir les meilleures propriétés mécaniques possibles (résistance à l'étirement) en minimisant le nombre de cycles nécessaire. D'un point de vue pratique, ceci peut constituer un gain de temps non négligeable. C'est pourquoi, dans la suite des caractérisations, nous nous sommes concentrés sur des membranes ayant subi 3 cycles de congélation/décongélation au maximum.

D. Semi-perméabilité

Une des étapes primordiales de mon travail de recherche a été l'étude de la diffusion de molécules à travers les hydrogels de PVA afin de vérifier sa porosité et sa capacité à enrober la biopile. L'objectif était d'obtenir une membrane semi-perméable laissant passer le glucose et l'oxygène, mais bloquant les plus grosses molécules telles que les anticorps et les enzymes de l'organisme hôte.

1. Diffusion du glucose

Dans un premier temps, la diffusion du glucose à travers différents gels de PVA a été étudiée.

a) Méthode

Les expériences de diffusion ont été réalisées à l'aide d'une cellule de diffusion horizontale de la marque *PermeGear*. Une vue schématique de cet équipement est reportée en Figure 36. Celle-ci comporte deux chambres en verre (5 mL chacune) sous agitation magnétique et thermorégulées par

une circulation d'eau dans une double paroi. La membrane à étudier (diamètre d'étude = 1,5 cm) est installée de façon étanche entre les cuves (Figure 37).

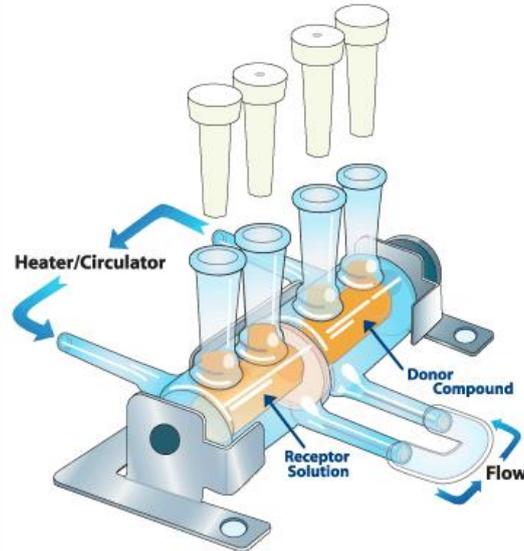


Figure 36: Cellule de diffusion *PermeGear*

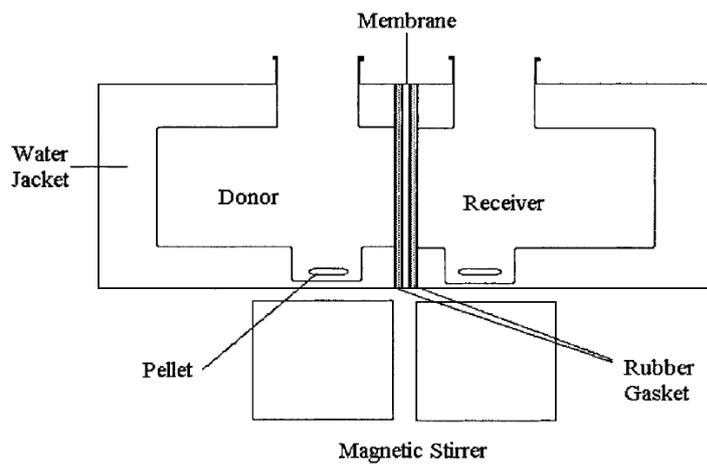


Figure 37: Cellule de diffusion horizontale à deux chambres [98]

Le principe de l'expérience est de mesurer la concentration de glucose dans la chambre « réceptrice » en fonction du temps, la chambre « donneuse » étant une solution de glucose à 1 g/l (à $t = 0$) dans un tampon de phosphate salin (PBS) à pH = 7,4 (comme dans le corps humain). Notons que

le PBS est composé de 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄, et 1,76 mM de KH₂PO₄. Les deux chambres sont remplies simultanément afin d'éviter tout effet de pression, et des échantillons de 100 µl sont prélevés périodiquement dans le compartiment récepteur. La concentration du glucose dans les prélèvements est déterminée grâce à un kit de coloration par dosage enzymatique (Sigma), puis par lecture de l'absorbance à 510 nm.

b) Résultats et Analyse

Afin d'étudier la diffusion du glucose optimale à travers les hydrogels de PVA, nous avons choisi de caractériser dans un premier temps des membranes ayant subi le moins de cycles de congélation/décongélation possible. En effet, plus le nombre de cycles est petit, plus la proportion de cristaux dans l'hydrogel est faible et plus leur porosité est grande. Trois expériences de diffusion ont donc été réalisées en parallèle sur trois membranes (M1, M2, M3) de même composition et ayant subi un seul cycle de congélation/décongélation (Figure 38). Ainsi, 3 échantillons ont été caractérisés pour un même type d'hydrogel (PVA à 10 % dans un mélange à 80 % de DMSO, 1 cycle). L'objectif de cette expérience était de déterminer avec précision le coefficient de diffusion effectif du glucose à travers ces gels de PVA dans les conditions de l'organisme, c'est pourquoi la température de circulation extérieure était fixée à 37°C.

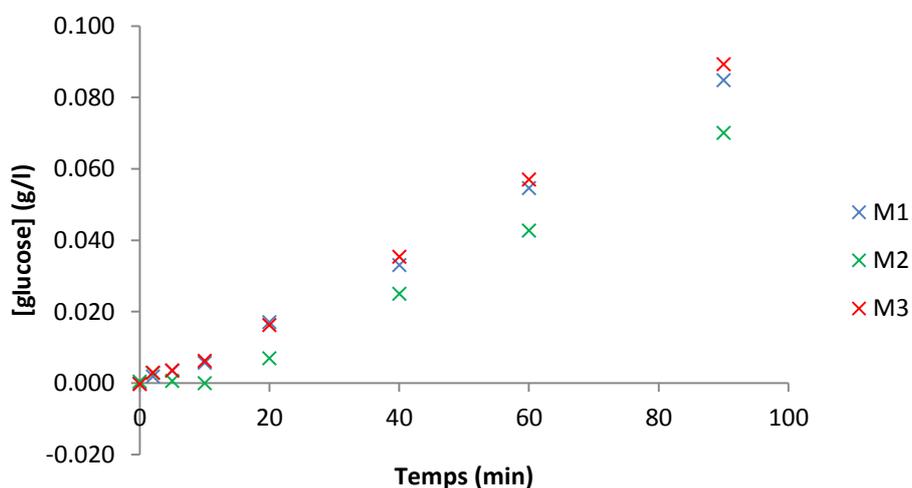


Figure 38: Concentration du glucose dans le compartiment récepteur en fonction du temps

Bien que les concentrations dans les chambres donneuse et réceptrice changent constamment au cours de l'expérience, nous pouvons supposer que le flux à travers les membranes atteint rapidement un état stationnaire. Par une régression linéaire, nous pouvons donc avoir accès à la

variation de concentration du glucose par unité de temps, dans la chambre receveuse, à l'état stationnaire (Figure 39).

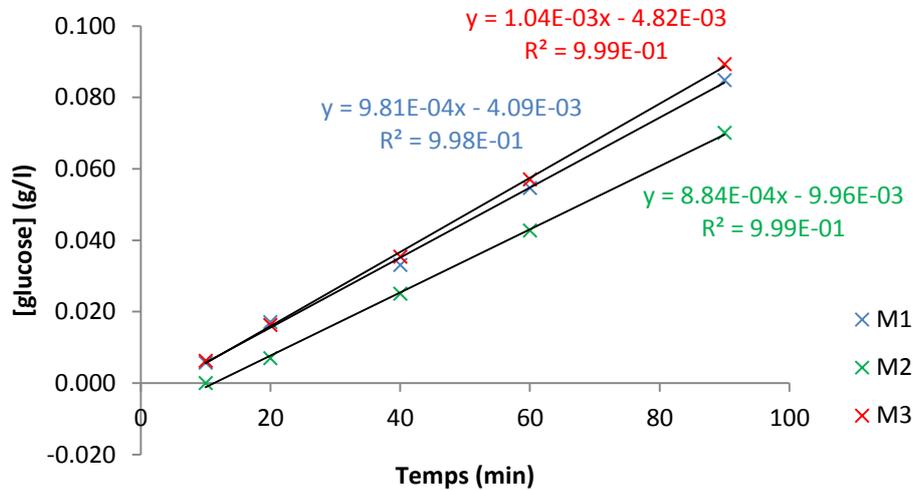


Figure 39: Régression linéaire des courbes de diffusion à l'état stationnaire

Ainsi, les résultats obtenus sont les suivants :

	Membrane n°1	Membrane n°2	Membrane n°3
Variation de la concentration du glucose par unité de temps à l'état stationnaire	$5,45 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$4,91 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$5,78 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

Il est ensuite possible d'accéder au coefficient de diffusion effectif du glucose en appliquant la loi de Fick pour un état stable (3) :

$$\ln \left(\frac{C_D - C_R}{C_{D_0} - C_{R_0}} \right) = -\frac{A}{L} \cdot \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_R} \right) \cdot Dt \quad (3)$$

où :

- C_D est la concentration de glucose dans le compartiment donneur
- C_{D_0} est la concentration initiale de glucose dans le compartiment donneur (soit 1 g/l)
- C_R est la concentration de glucose dans le compartiment récepteur
- C_{R_0} est la concentration initiale de glucose dans le compartiment récepteur (soit 0 g/l)
- A est l'aire de la membrane (soit $1,77 \text{ cm}^2$)

- L est l'épaisseur de la membrane (soit 0,1 cm)
- V_D et V_R sont les volumes des compartiments donneur et récepteur respectivement (soit $V_D = V_R = 5 \text{ ml} = 5 \text{ cm}^3$)
- D est le coefficient de diffusion effectif du glucose à travers la membrane (en cm^2/s)
- t est le temps de diffusion (en s)

Soit :

$$-\frac{LV}{2A} \cdot \ln\left(1 - 2 \frac{C_R}{C_{D_0}}\right) = Dt \quad (4)$$

Ainsi, en traçant $-\frac{LV}{2A} \cdot \ln\left(1 - 2 \frac{C_R}{C_{D_0}}\right)$ en fonction de t et en calculant le coefficient directeur de la droite, nous pouvons déterminer le coefficient de diffusion effectif du glucose à travers les membranes (Figure 40).

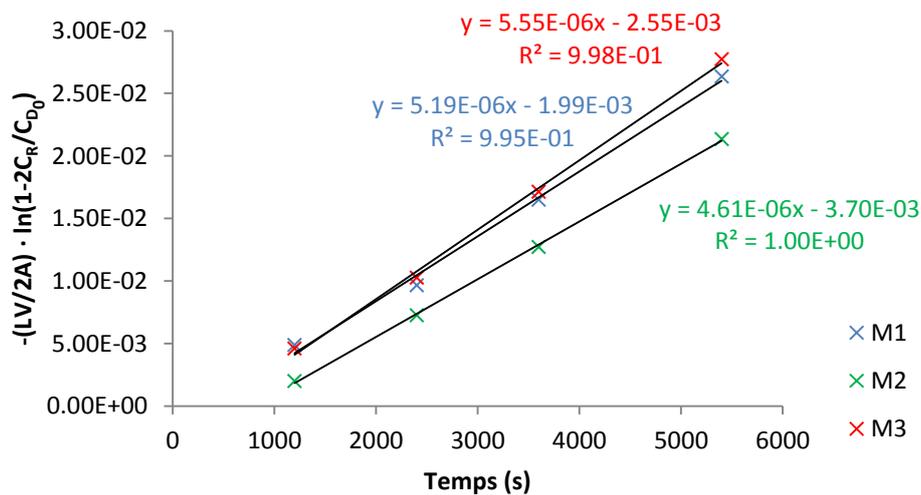


Figure 40: Calcul du coefficient de diffusion effectif du glucose

Les coefficients de diffusion effectifs du glucose extraits de la Figure 40 sont regroupés dans le tableau qui suit :

	Membrane n°1	Membrane n°2	Membrane n°3
Coefficient de diffusion effectif du glucose (D)	$5,19 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	$4,61 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	$5,55 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

Les hydrogels de PVA fabriqués à partir d'une solution à 10 % dans un mélange DMSO:H₂O à 80:20, et n'ayant subi qu'un cycle de congélation/décongélation, ont donc un coefficient de perméabilité au glucose de l'ordre de $5,12 \pm 0,27 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ dans les conditions de l'organisme. Cette valeur est proche de celle du coefficient de diffusion du glucose dans l'eau : $6,80 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ d'après Longworth (1952) [99]. Ainsi, les hydrogels de PVA ayant subi un seul cycle permettent une excellente diffusion du glucose jusqu'aux électrodes, et ce phénomène ne constitue pas ou peu un facteur limitant le fonctionnement de l'anode.

Ce résultat est supérieur mais comparable aux valeurs trouvées par Praveen *et. al.* [98] qui ont mesuré un coefficient de diffusion du glucose égal à $1,22 \pm 0,11 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à travers leurs membranes de PVA. Leur étude portait sur des hydrogels fabriqués à partir de PVA à 10 % dans une solution aqueuse à 80 % de DMSO, ayant subi 2 cycles de congélation/décongélation, dont le premier à -80°C et le deuxième à -20°C. Le degré de polymérisation de ces membranes devait être plus élevé. Cela pourrait s'expliquer par la combinaison d'un nombre de cycles plus élevé et d'une température plus basse pour le 1^{er} cycle.

Ensuite, il était important d'étudier l'influence du nombre de cycles de congélation/décongélation sur de tels hydrogels de PVA. De la même manière que précédemment, trois expériences ont été réalisées en parallèle sur des membranes ayant subi 1, 2 ou 3 cycles. Cette fois-ci, un seul échantillon par type de membrane a été caractérisé et la température de circulation extérieure était fixée à 25°C (et non pas à 37°C comme précédemment).

	1 cycle ¹	2 cycles	3 cycles
Coefficient de diffusion effectif du glucose (D)	$2,54 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	$2,87 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	$1,40 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

On peut remarquer qu'entre une membrane qui a subi 1 cycle et une membrane qui en a subi 2, le coefficient de diffusion reste relativement stable en passant de $2,54 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à $2,87 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Si l'on rapporte cette différence à l'incertitude déduite lors des mesures précédentes, on remarque que cet écart n'est pas significatif. En revanche, à partir du 3^{ème} cycle de congélation/décongélation le coefficient chute de plus de 50 % et se rapproche des valeurs mesurées par Praveen *et. al.*

Cela met donc en évidence une diminution de la porosité du PVA avec le nombre de cycles de congélation/décongélation, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que le nombre croissant de cycles augmente la cristallinité et donc réduit la taille et/ou le nombre de pores dans l'hydrogel. En effet, un plus grand nombre de cycles est synonyme d'une multiplication des points d'ancrage cristallins reliés entre eux par des chaînes de PVA amorphe. Ce comportement est un inconvénient pour la production

¹ La différence de coefficient par rapport à l'expérience précédente s'explique probablement par la température de la circulation extérieure qui était cette fois-ci égale à 25°C (au lieu de 37°C dans le 1^{er} cas)

de courant à partir du glucose, mais un avantage en ce qui concerne le blocage de molécules de plus grande taille (protéines, anticorps, etc...).

Cette expérience a permis de mettre en évidence l'excellente perméabilité au glucose des hydrogels de PVA ayant subi 1 cycle de congélation/décongélation, et la diminution de cette propriété avec l'augmentation du nombre de cycles. Il est donc nécessaire, à ce stade, de déterminer quelles sont les molécules de plus grande taille qui vont pouvoir diffuser à travers ces hydrogels de PVA et éventuellement détériorer la biopile.

2. Seuil de coupure par FRAP

Dans un deuxième temps, nous avons comparé la diffusion de molécules de tailles différentes à travers les membranes de PVA afin de mettre en évidence la notion de seuil de coupure.

a) Méthode

Pour ce faire, des expériences de diffusion ont été réalisées avec de la fluorescéine isothiocyanate, abrégé FITC-dextran, de taille connue. Trois molécules différentes ont été testées: la première (FITC-10S) ayant une masse moléculaire de 10 kDa, la deuxième (FITC-70S) de 70 kDa, et la troisième (la fluorescéine libre) de 330 Da environ.

Rappelons que le glucose a une masse moléculaire de 180 Da, soit une taille approximative de 1,5 nm. Le poids moléculaire des protéines varie de 5 à plus de 1000 kDa (Tableau 1). Par exemple, l'insuline fait 5,7 kDa tandis que les immunoglobulines font entre 140 et 900 kDa. Les enzymes, elles, peuvent faire 12 à 1000 kDa.

Enzymes	12-1000 kDa
Protéines	5-1000 kDa
Insuline	5,7
Ribonucléase	12,6
Myoglobine	16,9
Hémoglobine	64,5
Immunoglobulines	140-900

Tableau 1: Poids moléculaires des enzymes et protéines

Cette fois-ci, ce sont des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) qui ont été réalisées afin de s'assurer de la mobilité ou non des molécules à l'intérieur de la membrane.

La redistribution de fluorescence après photoblanchiment est une méthode utilisée en microscopie à fluorescence pour mesurer la vitesse de diffusion moléculaire. En effet, lorsqu'une population moléculaire fluorescente est distribuée de manière homogène, sa fluorescence peut être inhibée irréversiblement dans une zone restreinte de l'échantillon. Ceci se fait par photoblanchiment en exposant très brièvement la zone avec un laser. Deux populations de molécules sont donc créées : une fluorescente, l'autre pas ; elles sont spatialement distinctes. Si les molécules sont capables de se déplacer dans le milieu, on assiste à une redistribution des deux populations entre la zone blanchie et le milieu adjacent, jusqu'à l'homogénéisation des populations : la zone blanchie (ou bleachée) redevient progressivement fluorescente. Un schéma des mécanismes de photoblanchiment et d'homogénéisation est reporté en Figure 41. Au contraire, si les molécules ne sont pas capables de se déplacer dans le milieu, il n'y aura pas de redistribution de la fluorescence, soit pas d'homogénéisation des populations, et la zone blanchie restera non fluorescente. Cependant, notons qu'il est important de mesurer la fluorescence absolue de l'échantillon analysé avant tout photoblanchiment. En effet, si la molécule fluorescente est trop grosse pour pénétrer dans l'échantillon, elle ne passera pas en quantité significative à l'intérieur de celui-ci, et la fluorescence mesurée avant ou après photoblanchiment ne sera donc pas représentative de la réalité. La mesure réalisée sera en fait une mesure de bruit.

Etant donné que le laser affecte l'échantillon mais aussi la solution dans lequel il est immergé, la mesure de fluorescence doit se faire grâce à un microscope confocale. Cela permet de ne collecter que la lumière en provenance de la membrane.

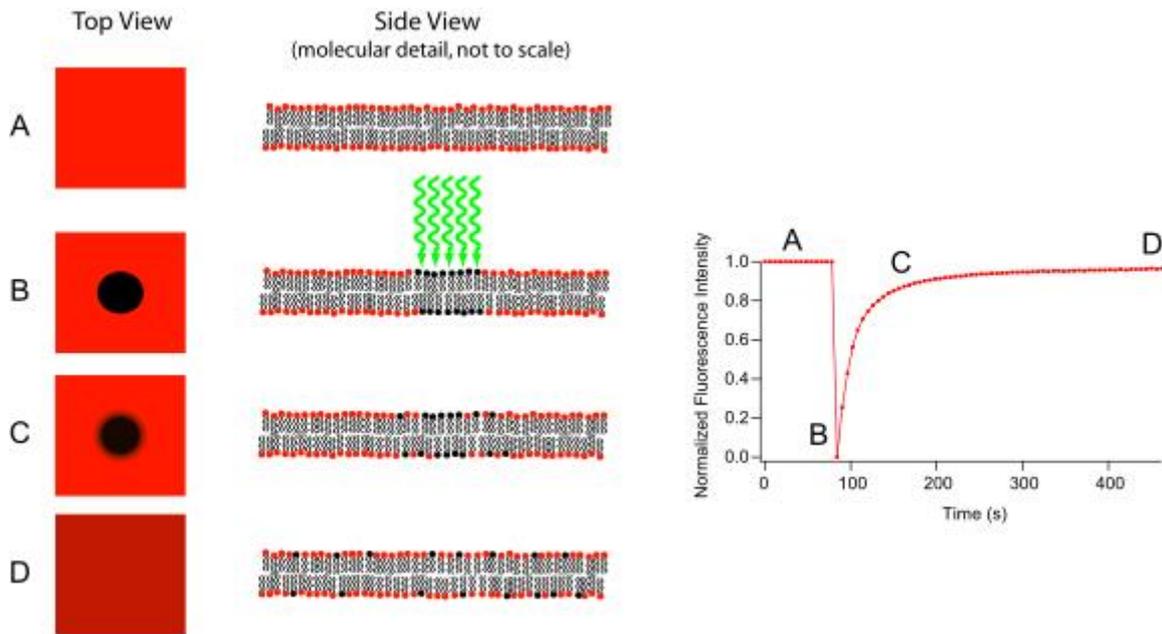


Figure 41: Schéma explicatif du FRAP

Cette expérience a été réalisée sur des membranes de même composition (10 % de PVA dans une solution aqueuse à 80 % de DMSO) et ayant subi 1,2 ou 3 cycles de congélation/décongélation. Pour chaque taille de molécules à tester, un seul échantillon a été analysé par type de membrane, mais 9 mesures ont été réalisées sur chaque échantillon.

Après avoir été conservées pendant 1 mois environ dans des solutions de fluorescéine libre ou de FITC-10S ou encore de FITC-70S, elles ont subi une série de photoblanchiments localisés dont le recouvrement a été suivi. La redistribution de fluorescence a été modélisée par une fonction mono-exponentielle de la forme $f(t) = c - a \cdot e^{-t/T}$, afin de déterminer trois paramètres : le temps caractéristique de recouvrement (T), le temps de demi-vie ($T_{1/2}$) et la fraction mobile. Celle-ci représente la proportion de protéines d'intérêt qui se déplacent et qui permettent ainsi le retour de fluorescence dans la région d'intérêt photoblanchie.

L'analyse de la cinétique de récupération de fluorescence permet aussi de déduire le coefficient de diffusion latérale de la protéine, qui est caractéristique de la vitesse de déplacement de la molécule dans un milieu homogène. La diffusion latérale représente le mouvement aléatoire des molécules à l'intérieur de la membrane elle-même, non forcé par un gradient de concentration, contrairement à ce qui a été mesuré lors des expériences précédentes de diffusion du glucose à travers des membranes de PVA.

b) Résultats et Analyse

Afin de mieux se représenter le type de courbes obtenues, prenons le cas particulier d'une membrane ayant subi 1 cycle de congélation/décongélation et ayant trempé dans une solution de fluorescéine libre, de FITC-10S, et de FITC-70S. Leurs courbes de photoblanchiment et recouvrement sont rapportés en Figure 42, Figure 43 et Figure 44.

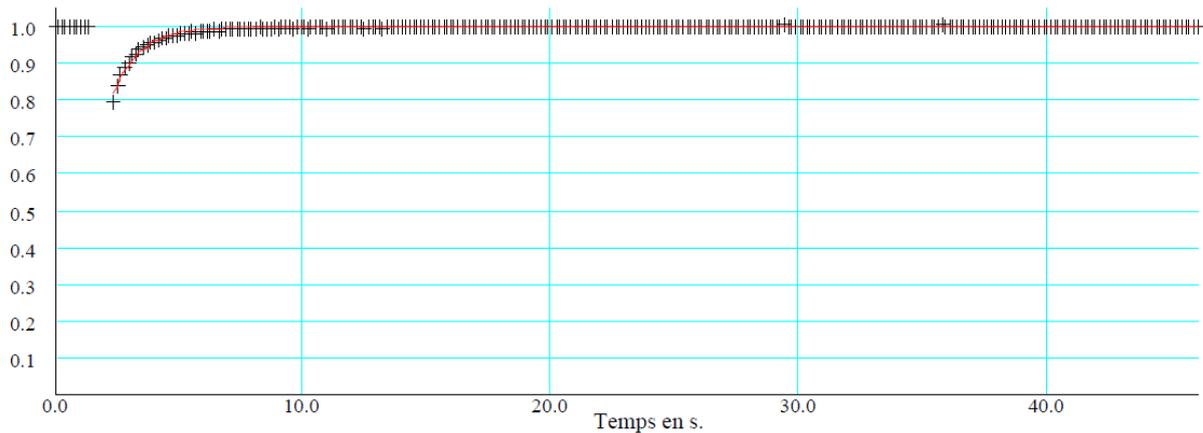


Figure 42: Recouvrement de fluorescence de la fluorescéine après photoblanchiment (1 cycle)

Sur cette figure (Figure 42) on observe un cas typique de disparition de la fluorescence pendant le photoblanchiment à environ 2,5 s, puis un recouvrement suivant un modèle exponentiel jusqu'à atteindre la fluorescence maximale de départ. Après analyse on peut déterminer les temps caractéristiques et de demi-vie de ces molécules fluorescentes, ainsi que leur fraction mobile dans une membrane de PVA qui a subi 1 cycle de congélation/décongélation.

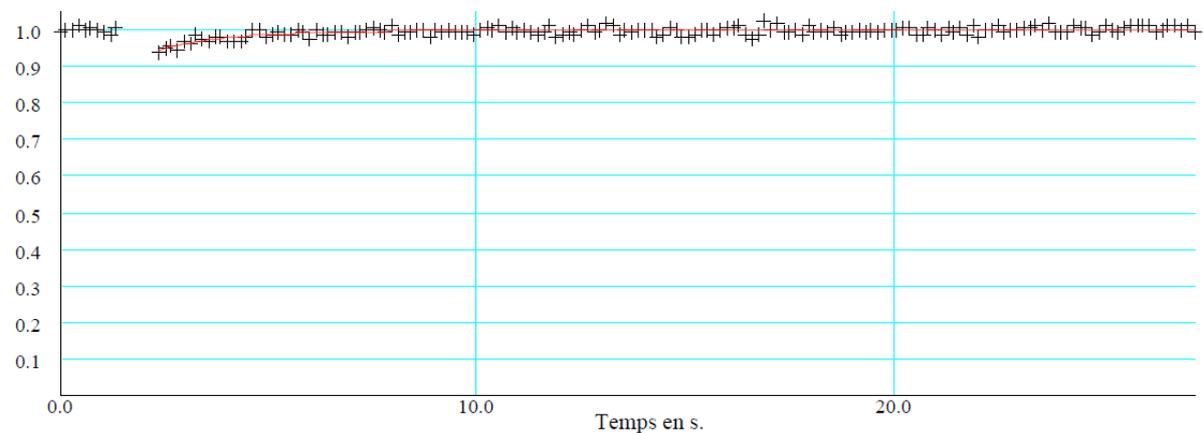


Figure 43: Recouvrement de fluorescence du FITC-10S après photoblanchiment (1 cycle)

D'après la Figure 43, pour une molécule plus grosse que précédemment (10 kDa) on observe un recouvrement de la fluorescence après photoblanchiment qui suit à nouveau un modèle exponentiel mais qui est cette fois-ci beaucoup plus lent et moins marqué.

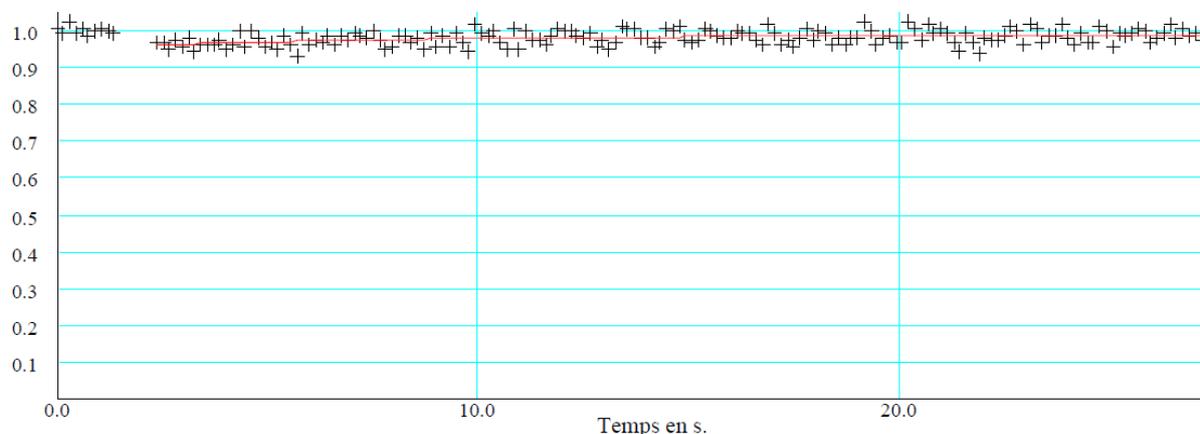


Figure 44: Recouvrement de fluorescence du FITC-70S après photoblanchiment (1 cycle)

Comme on peut le voir sur la Figure 44, la courbe de redistribution de fluorescence ne peut cette fois-ci pas être modélisée par une courbe exponentielle. Il n'y a pas réellement de photoblanchiment ni de recouvrement de la fluorescence. Les temps caractéristiques, de demi-vie, et la fraction mobile obtenus après analyse sont totalement incohérents. Les molécules de FITC-70S n'ont pas pu rentrer dans les membranes de PVA, qu'elles aient subi 1,2 ou 3 cycles de congélation/décongélation.

Afin de s'assurer du fait que les molécules de 70 kDa n'ont pas pu pénétrer dans les hydrogels de PVA, nous avons analysé la fluorescence à l'intérieur des membranes avant tout photoblanchiment. Pour cela, les graphiques présentés Figure 45 représentent la répartition des pixels de l'image en niveaux de gris. Celle-ci dépend de la fluorescence. Ainsi, l'intensité moyenne de la fluorescence des membranes ayant baigné dans les molécules FITC-70S est égale à 28,2. Cette valeur est trop faible pour être significative, en particulier lorsqu'on la compare à celle de la fluorescéine libre (133,6) et du FITC-10S (109,7). Nous pouvons donc en conclure que les molécules ayant une masse moléculaire supérieure ou égale à 70 kDa ne pourront pas passer à travers de tels gels de PVA, et le seuil de coupure de ces gels est compris entre 10 et 70 kDa.

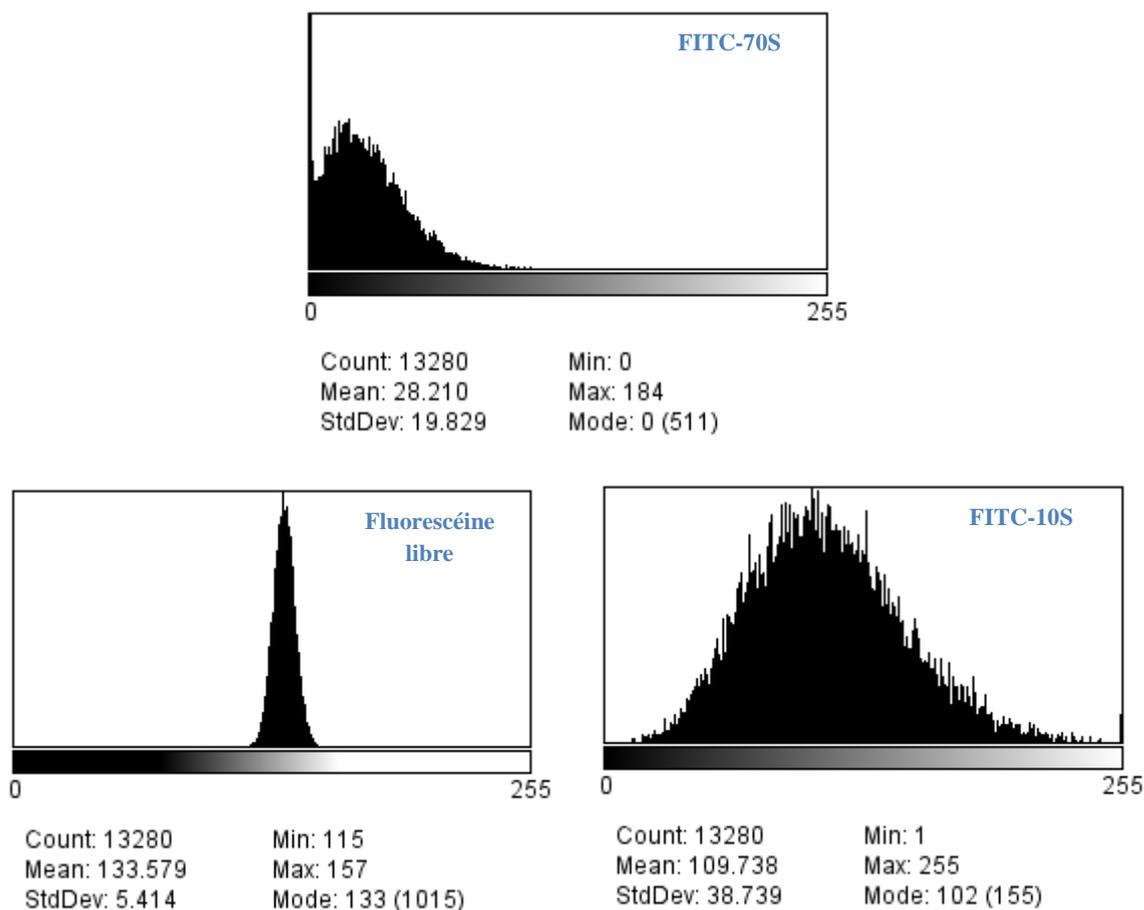


Figure 45: Fluorescence à l'intérieur de la membrane de PVA pour les différentes molécules testées

Une fois les molécules de FITC-70S exclues de l'analyse car ne pénétrant pas dans les membranes de PVA, nous avons comparé les vitesses de diffusion de la fluorescéine libre et du FITC-10S dans des membranes qui n'ont pas subi le même nombre de cycles de congélation/décongélation. D'après Axelrod et Soumpasis [100, 101] le coefficient de diffusion obtenu par FRAP est proportionnel à $(T_{1/2})^{-1}$, nous nous concentrerons donc sur cette grandeur ainsi que sur la fraction mobile.

Les résultats obtenus sont regroupés ci-dessous :

		1 cycle	2 cycles	3 cycles
Fluorescéine libre	$(T_{1/2})^{-1} (s^{-1})$	$1,316 \pm 0,008$	$1,316 \pm 0,019$	$1,329 \pm 0,013$
	<i>Fraction mobile (%)</i>	$99,54 \pm 0,08$	$98,59 \pm 0,57$	$99,61 \pm 0,06$
FITC-10S	$(T_{1/2})^{-1} (s^{-1})$	$0,553 \pm 0,049$	$0,517 \pm 0,028$	$0,602 \pm 0,095$
	<i>Fraction mobile (%)</i>	$93,97 \pm 1,32$	$95,60 \pm 1,11$	$94,28 \pm 1,38$

On peut remarquer que quelle que soit la molécule fluorescente, fluorescéine libre (~ 330 Da) ou FITC-10S (10 kDa), $(T_{1/2})^{-1}$ est stable quel que soit le nombre de cycles (1, 2 ou 3). Le coefficient de diffusion de ces molécules est donc lui aussi indépendant du nombre de cycles subi par les membranes de PVA. De la même façon, la fraction mobile des deux molécules fluorescentes est stable lorsque le nombre de cycles augmente.

Notons que $T_{1/2}$ et la fraction mobile sont plus faibles pour les molécules FITC-10S que pour la fluorescéine libre. Cela s'explique par la taille des molécules qui est plus grande, et qui pourrait ainsi ralentir voire empêcher le déplacement de certaines d'entre elles.

Ainsi, d'après cette expérience il n'y a pas de variation majeure entre les différentes membranes (ayant subi 1, 2 ou 3 cycles de congélation/décongélation) pour la diffusion de la fluorescéine libre et du FITC-10S. Comme cela a été expliqué précédemment, ce résultat n'est pas contradictoire avec les différences observées pour la diffusion du glucose puisqu'il s'agit ici de diffusion latérale aléatoire et non de diffusion transversale avec un gradient de concentration. Les phénomènes ne sont donc pas tout à fait comparables.

Le seuil de coupure estimé dans cette étude étant compris entre 10 et 70 kDa, l'enrobage en PVA protégera la biopile de certaines agressions de l'organisme hôte, notamment des anticorps dont la taille est d'au moins 140 kDa.

E. Conclusion

Dans cette première partie de caractérisation physico-chimique, nous avons mis en évidence l'influence des paramètres de fabrication sur les propriétés des hydrogels de PVA obtenus, en particulier le nombre de cycles de congélation/décongélation et la concentration en DMSO utilisée. L'objectif était de définir un protocole de fabrication permettant d'obtenir les propriétés optimales pour l'enrobage d'une biopile à glucose implantable.

Ainsi, l'augmentation du nombre de cycles a pour effet d'augmenter la cristallinité des hydrogels de PVA, ce qui a pour effet d'augmenter la proportion des points d'ancrage rigides, et donc d'augmenter la résistance à l'étirement. En parallèle, la structure créée par les chaînes de PVA amorphe se rétracte et se compacte, ayant pour effet de diminuer les propriétés de gonflement. Ces deux phénomènes conjugués conduisent à une diminution de la taille des lacunes d'eau, c'est-à-dire à une diminution de la porosité des hydrogels (diminution du nombre et/ou de la taille des pores).

L'augmentation de la concentration en DMSO utilisé au cours du procédé de fabrication a pour effet d'augmenter et surtout d'accélérer la cristallisation. En effet, en utilisant une concentration

en DMSO égale à 80 %, l'élasticité et la robustesse optimales peuvent être obtenues dès 3 cycles de congélation/décongélation alors qu'il faudrait réaliser au moins 5 cycles s'il n'y avait pas de DMSO.

En gardant en tête l'objectif de cette étude qui est l'enrobage d'une biopile à glucose, nous avons déterminé le procédé de fabrication qui nous permettait de répondre aux besoins en obtenant une membrane enrobante solide et facile à manipuler, poreuse afin de laisser passer le glucose et l'oxygène de manière optimale jusqu'à l'électrode, et protectrice vis-à-vis des protéines de l'organisme de plus grandes tailles.

Ainsi, le procédé de fabrication choisi est celui qui utilise une concentration en DMSO égale à 80 %. Ceci nous permet d'assurer de bonnes propriétés mécaniques aux hydrogels de PVA obtenus, quel que soit le nombre de cycles. Ensuite, nous avons fixé le nombre de cycles de congélation/décongélation à 1 puisque cela nous permet d'obtenir un hydrogel très perméable au glucose mais avec un seuil de coupure compris entre 10 et 70 kDa. Cette valeur permet d'empêcher la diffusion des grosses protéines comme les anticorps jusqu'à la biopile, ces organismes étant source d'altérations.

Une fois le procédé de fabrication optimal élaboré, nous nous sommes concentrés sur l'étude de la biocompatibilité des membranes de PVA obtenues puisque le but ultime de la biopile à glucose est un fonctionnement *in vivo*, en implantation dans l'organisme. Nous avons donc étudié la toxicité de ces membranes *in vitro* en s'assurant, dans un premier temps, de l'efficacité du rinçage du DMSO. En effet, ce solvant utilisé pour la cryoprotection des cellules est néanmoins connu pour avoir des effets secondaires toxiques sur les cultures. Puis nous avons observé le comportement des cellules aux abords et à la surface des membranes de PVA. Enfin, nous avons besoin d'en savoir davantage sur l'intégration à long terme d'un tel matériau implanté dans un organisme vivant. Pour cela, nous avons réalisé une série d'implantations dans des rats.

Chapitre IV. Biocompatibilité du PVA

Dans ce chapitre, nous discuterons de la biocompatibilité des membranes de PVA fabriquées selon le procédé validé dans le chapitre précédent. En premier lieu sont rapportées les études de biocompatibilité *in vitro*: élimination du DMSO et non-toxicité cellulaire. Puis nous passerons aux implantations de membranes pour l'étude de la biocompatibilité *in vivo*.

A. Études *in vitro*

1. Elimination du DMSO

a) Méthode

Le DMSO est un solvant polaire très puissant capable de pénétrer rapidement dans la peau intacte en emportant avec lui des contaminants pouvant être carcinogènes ou des toxines. Certaines lignées cellulaires sont affectées par un contact prolongé avec le DMSO, ou lorsqu'il est utilisé à de fortes concentrations. Il est le plus souvent utilisé à une concentration finale de 5 à 15% lorsqu'il sert de cryoprotecteur pour la culture cellulaire. Dans notre cas, le PVA est dissous dans une solution aqueuse à 80 % de DMSO. Ainsi, le rinçage abondant des membranes à l'eau distillée à la fin du procédé de fabrication est indispensable pour éliminer un maximum de DMSO et n'en retrouver qu'une faible concentration après rinçage (< 5 %).

Néanmoins, notons que ce produit est utilisé pour ses propriétés thérapeutiques dans diverses applications médicales et paramédicales. Etant donné qu'il est capable de pénétrer la peau et d'autres membranes sans les endommager, il pourrait transporter d'autres composés au sein d'un système biologique. Il est utilisé principalement comme un analgésique topique, *i.e.* un véhicule pour application topique de produits pharmaceutiques, en tant qu'agent anti-inflammatoire et antioxydant.

Afin de déterminer si oui ou non ce solvant était bien éliminé à la fin du rinçage, des mesures de spectroscopie infra-rouge à Transformée de Fourier (FTIR) ont été réalisées sur les eaux de rinçage

des membranes, de J1 à J7 (la méthode FTIR a été décrite dans le chapitre III). Les membranes ont été immergées dans 500 mL d'eau distillée, et cette eau a été changée toutes les 24 heures.

b) Résultats et Analyse

Des courbes d'étalonnage ont tout d'abord été réalisées avec des solutions aqueuses contenant de 0 % à 100 % de DMSO. Celles-ci sont regroupées en Figure 46.

On peut remarquer que la concentration en DMSO influence de manière importante les différentes bandes d'intensité. Plus particulièrement, l'intervalle de longueur d'onde se situant entre 1900 et 2700 cm^{-1} constitue une zone d'intérêt puisqu'il nous permet de situer précisément les spectres des eaux de rinçage par rapport aux courbes étalons. La Figure 47 représente justement les courbes d'étalonnage sur cet intervalle. La courbe rouge correspond à 100 % de DMSO et la courbe rose à 0 % de DMSO.

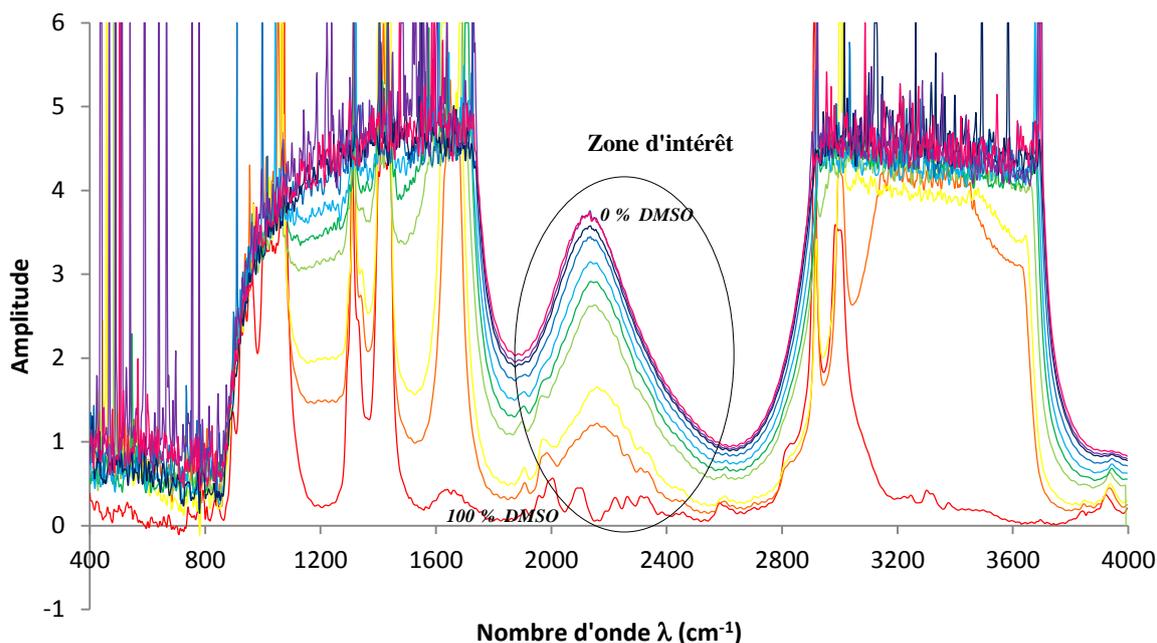


Figure 46: Courbe d'étalonnage en fonction de la concentration en DMSO

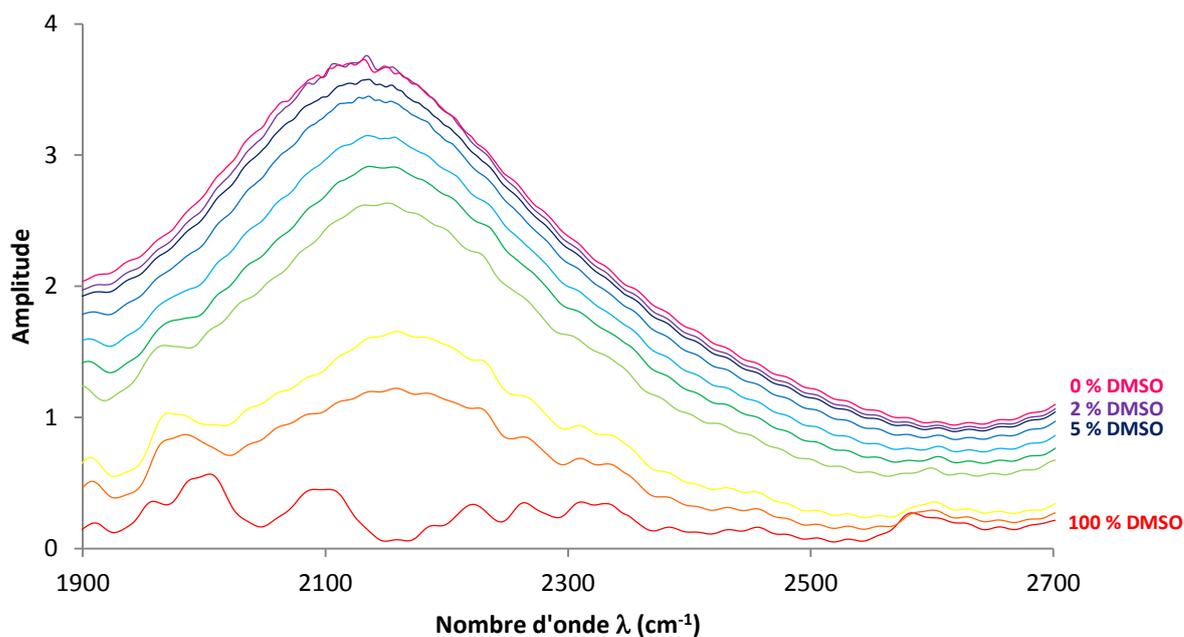


Figure 47: Zone d'intérêt de la courbe d'étalonnage

Après avoir établi une zone d'intérêt pour l'étalonnage, trois membranes identiques (10 % de PVA, 80 % de DMSO, 3 cycles) ont été fabriquées. Elles ont ensuite été immergées dans un volume d'eau distillée constant. Cette eau de rinçage a été changée toutes les 24 heures et conservée afin d'en déterminer la concentration en DMSO de J1 à J7. Ainsi, d'un jour à l'autre il est possible de mesurer la quantité de DMSO relarguée et donc de savoir si la membrane en contient encore. Pour chacune des membranes étudiées, le résultat a été le même (Figure 48) : à J1 la concentration en DMSO de l'eau de rinçage est de l'ordre de 5 %, à J2 elle est de l'ordre de 0 à 2 %. Au-delà de J2, la courbe de mesure se confond avec la courbe d'étalonnage correspondant à 0 % de DMSO.

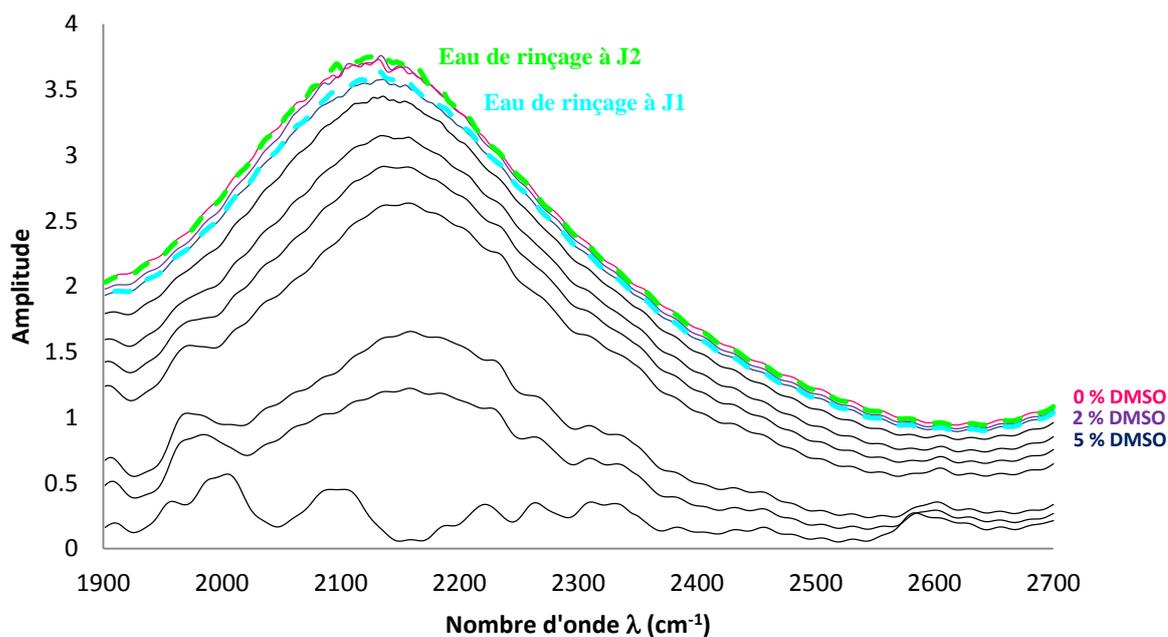


Figure 48: Détermination de la concentration en DMSO des eaux de rinçage à J1 et J2

Lors de la fabrication des hydrogels, le DMSO n'intervient pas directement dans la polymérisation du réseau, mais influence la taille finale des pores obtenus grâce à celle-ci. En effet, le DMSO forme des complexes avec l'eau présente dans les lacunes du réseau semi-cristallin. Il permet de ralentir le processus de cristallisation et ainsi de restreindre l'augmentation de volume, ce qui aboutit à de plus petits pores.

La taille des molécules de DMSO étant de l'ordre de 0,5 nm [102], celles-ci peuvent diffuser facilement à travers les hydrogels de PVA. A la fin du procédé de congélation/décongélation, le DMSO se situant dans les pores du matériau peut donc être rincé : il diffusera dans l'eau environnante grâce au gradient de concentration. Une eau de rinçage sans DMSO détectable indique donc son absence dans l'ensemble de l'hydrogel.

Ainsi, les mesures ont permis de montrer que 3 jours de rinçage suffisent à éliminer totalement le DMSO contenu dans les membranes en fin de cycles. La toxicité du DMSO à forte concentration est donc un problème résolu pour des hydrogels de PVA correctement rincés après les cycles de congélation/décongélation.

2. Culture cellulaire

Dans un second temps, il était primordial d'étudier l'effet de membranes de PVA sur des cellules en culture et d'observer le comportement de ces dernières vis-à-vis des hydrogels.

a) *Méthode*

Pour cela, plusieurs échantillons de PVA de même composition (PVA à 10 % dans une solution aqueuse à 80 % de DMSO, 1/2/3 cycles) ont été mis en contact avec des cellules épithéliales de prostate (RWPE-1) (200 000 cellules par puit), dans un milieu de culture complet KFSM (*Keratinocyte Serum Free Medium*) supplémenté avec un facteur de croissance épidermique humain recombinant (rhEGF) et de l'extrait pituitaire bovin (BPE), pendant 17 jours.

Pour commencer, nous avons souhaité comparer 2 types de stérilisation des hydrogels de PVA : à l'éthanol et par irradiation aux rayons gammas. La stérilisation à l'éthanol est un procédé simple, connu et efficace, mais qui pourrait déshydrater les gels et les déformer. La stérilisation par irradiation aux rayons γ est la méthode d'ores et déjà utilisée pour la stérilisation de la biopile avant implantation. Il fallait donc vérifier l'innocuité de l'irradiation sur les interactions cellules-PVA. Notons que le protocole d'irradiation consistait en une dose de 12 kGy accumulée sur une durée de 12 heures. En effet, les électrodes étaient constituées de chitosan [24] et ce matériau se dégrade au-delà de 10 kGy d'irradiation. L'activité des enzymes, elle, est maintenue jusqu'à 42 kGy, dès l'instant qu'elles sont dans un milieu sec. La dose de 12 kGy était donc un compromis permettant de stériliser le DMI sans pour autant endommager le polymère constituant les électrodes. Aujourd'hui, le chitosan ayant été remplacé par un autre polymère (évoqué dans le chapitre 5), le problème ne se pose plus. Les électrodes sont stérilisées à 25 kGy en ayant au préalable fait légèrement sécher l'enrobage en PVA. Le PVA polymérisé physiquement n'est pas endommagé par les rayons γ , sa cristallinité peut augmenter à cause de l'irradiation mais ce phénomène semble négligeable à cette dose et ne devrait que peu influencer ses propriétés mécaniques et sa porosité. Les irradiations sont réalisées au CEA-Grenoble.

Au cours de cette expérience, nous avons comparé des membranes qui avaient subi 1, 2 ou 3 cycles de congélation/décongélation afin de déterminer si leur surface était différente ou non, et si cela pouvait avoir une influence sur le comportement des cellules. Nous avons également comparé une membrane classique et lisse (gel de 1 mm d'épaisseur fabriqué entre 2 lames de verre et un moule en silicone) avec une membrane rugueuse (gel épais coupé en deux) ; et nous avons comparé les hydrogels de PVA à d'autres matériaux utilisés dans des applications biomédicales. Nous avons aussi étudié une membrane classique de PVA non rincée, afin de voir l'influence du DMSO résiduel. Pour chaque type de membranes étudiées dans cette section, 3 échantillons ont été analysés.

Pour cette étude comparative, des photos de la surface des membranes et du fond des puits ont été prises. L'analyse morphologique des cellules a été réalisée de manière visuelle et qualitative, mais leur comptage était non significatif. En effet, sur les membranes de PVA, les cellules étaient trop peu nombreuses et leur adhérence trop faible ; tandis que sur les autres matériaux, leur concentration était

trop élevée. Pour le PVA, nous avons finalement étudié leur forme, circulaire ou plutôt étirée voire ellipsoïde, grâce au logiciel ImageJ.

Ainsi, pour chacune des photos à étudier (exemple sur la Figure 49), l'image a été convertie en 8 bits (Figure 50) et plusieurs manœuvres ont été réalisées : repérage des cellules grâce à leur taille (surface comprise entre 500 et 1000 pixel²), sélection des cellules solitaires et bien définies permettant de visualiser leur forme, contournage (Figure 51). Plusieurs données peuvent ensuite être extraites de cette dernière image.

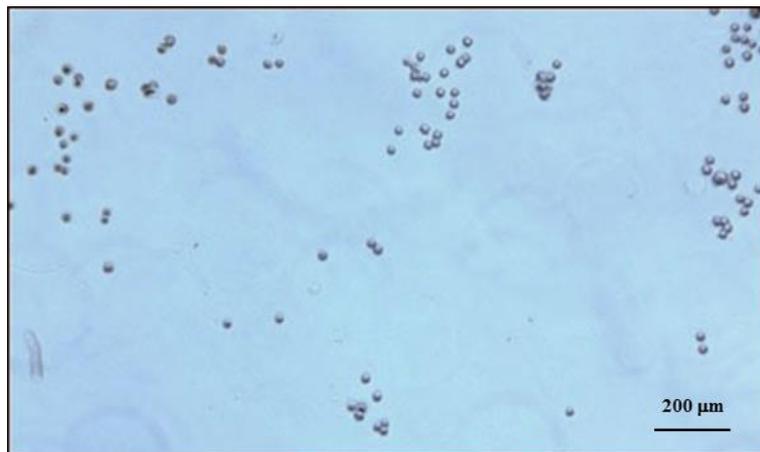


Figure 49: Photo de cellules à la surface d'une membrane de PVA

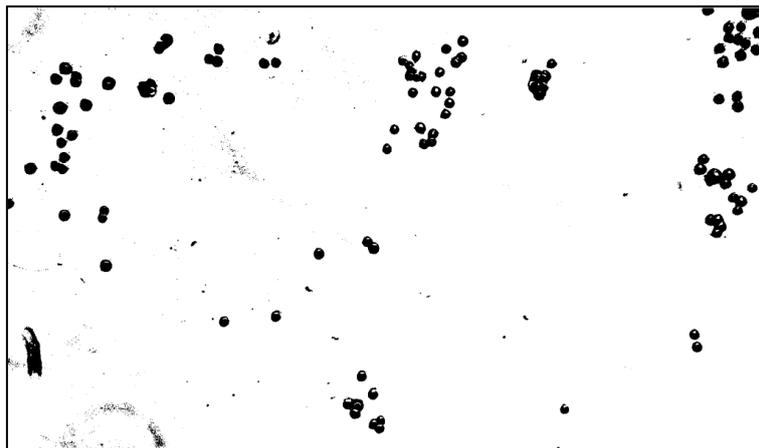


Figure 50: Conversion de l'image précédente en 8 bits

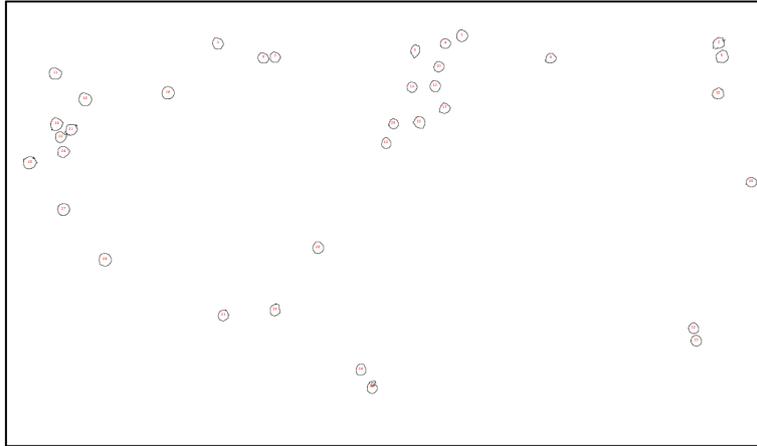


Figure 51: Repérage et contourage des cellules

A partir du contourage des cellules repérées sur l'image, une analyse de la circularité peut être réalisée. Celle-ci est calculée d'après la formule suivante pour chacune des cellules :

$$\text{Circularité} = 4\pi * \frac{\text{Aire}}{(\text{Périmètre})^2} \quad (5)$$

Lorsque sa valeur est proche de 1, la forme de la cellule en question est proche d'un cercle parfait. Au contraire, lorsqu'elle est proche de 0, la cellule a une forme « allongée ».

Une autre méthode consiste à approcher la forme des cellules détectées avec une ellipse pour en déterminer ensuite le rapport Grand axe/Petit axe. Il est alors possible de calculer un autre coefficient de circularité, que l'on appellera « Rondeur », par la formule suivante :

$$\text{Rondeur} = 4 * \frac{\text{Aire}}{(\pi * \text{Grand axe}^2)} \quad (6)$$

Notons que pour une image de cercle parfait passée en 8 bits, la circularité obtenue par cette méthode est égale à 0,899 tandis que la rondeur est égale à 1. Cela provient de la méthode de calcul et de la précision des pixels.

Après avoir extrait toutes ces données de l'image de départ, le logiciel nous fournit un histogramme représentant la distribution des valeurs de circularité obtenues. Nous pouvons ensuite en déduire une valeur moyenne représentative de la population cellulaire observée.

Lorsque les cellules épithéliales se développent, prolifèrent et adhèrent à la surface d'un matériau, on dit qu'elles ont une affinité pour le matériau en question. Dans ce cas, du fait de leur étroite juxtaposition et de leur jointivité, elles prennent une forme pavimenteuse, cubique ou

prismatique, au lieu de la forme grossièrement arrondie des cellules libres, ou de la forme étoilée de certaines cellules comme les neurones, les astrocytes ou les fibroblastes.

Au contraire, lorsque ces cellules n'ont pas d'affinité pour un matériau, elles vont très peu se multiplier, très peu adhérer à la surface, et garder une forme arrondie de cellules libres. Distinguer les cellules épithéliales selon leur forme ellipsoïde ou arrondie permet donc de déterminer leur degré d'affinité pour un matériau particulier.

b) Résultats et Analyse

Afin de comparer les deux techniques de stérilisation à l'éthanol et aux rayons γ , des images de la surface des membranes et du fond des puits de culture sont reportées sur la Figure 52.

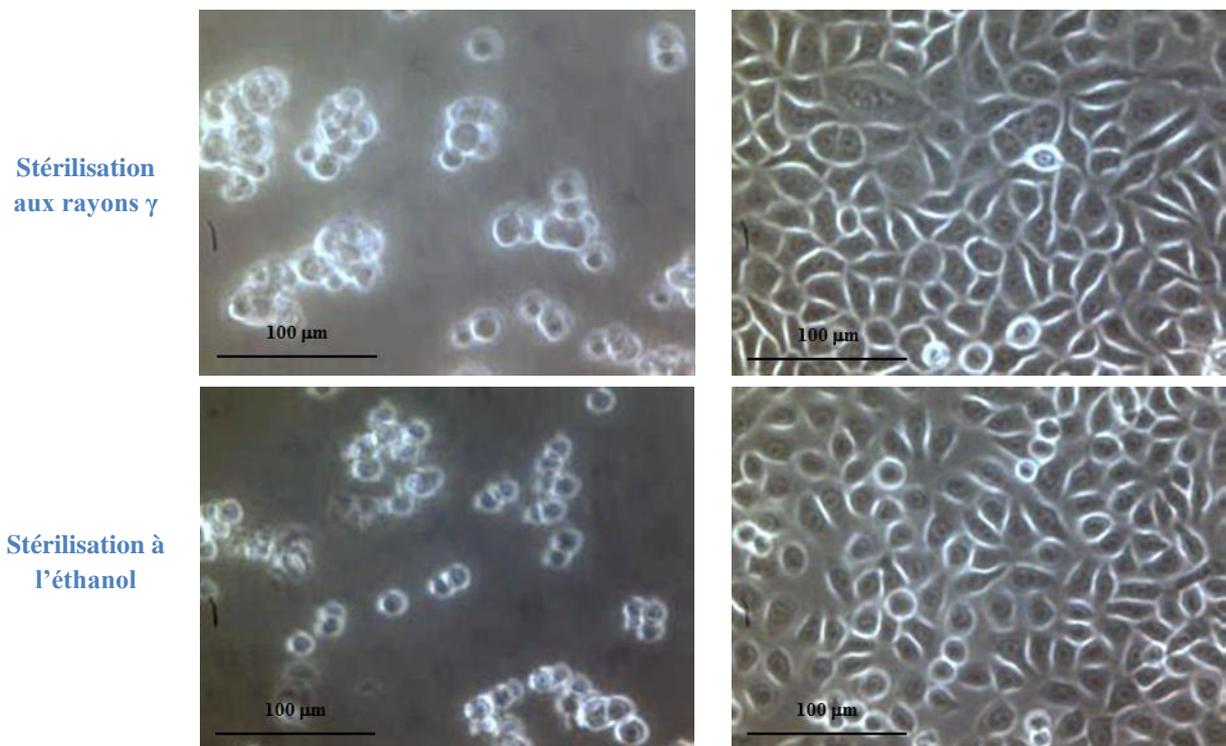


Figure 52: Cellules à la surface du PVA (gauche) vs au fond des puits (droite) après 17 jours de culture, pour une stérilisation aux rayons γ (haut) versus une stérilisation à l'éthanol (bas). Il s'agit de membranes de PVA ayant subi 1 cycle de congélation/décongélation.

La simple observation des clichés permet de tirer quelques informations préliminaires. Tout d'abord, il ne semble pas y avoir de différence entre la stérilisation à l'éthanol et la stérilisation aux rayons γ , ni en quantité de cellules ni en forme. De plus, sur des images non reportées ici, nous avons

observé qu'il ne semblait pas y avoir de différence entre les membranes qui ont subi 1, 2 ou 3 cycles de congélation/décongélation. C'est pourquoi nous avons choisi de ne représenter ici qu'un seul type de membranes : celles qui ont subi 1 cycle.

Sur ces images nous voyons que, même après 17 jours de culture, les cellules sont très peu nombreuses à la surface des membranes de PVA par rapport au fond des puits. De plus, elles ont une forme arrondie (Figure 52 à gauche). Ces deux observations nous amènent à penser que les cellules n'ont pas d'affinité pour les membranes de PVA. Néanmoins, ce matériau n'est pas toxique puisque les cellules qui se détachent et qui tombent au fond des puits se multiplient et adhèrent au plastique, en reprenant une forme étirée de cellules épithéliales (Figure 52 à droite).

Afin de réaliser une analyse plus poussée, nous nous pencherons sur les résultats obtenus pour les coefficients de circularité et de rondeur, qui sont regroupés dans le tableau ci-dessous (Figure 53). Notons que certaines cases ont été laissées vides, ceci est dû à la qualité et au contraste des images qui ne permettaient par leur analyse avec le logiciel ImageJ.

	1 cycle		2 cycles		3 cycles		Fond des puits
	Ethanol	Gammas	Ethanol	Gammas	Ethanol	Gammas	
Circularité							
36h	0,672 ± 0,023	0,794 ± 0,017	0,742 ± 0,034	0,675 ± 0,026		0,541 ± 0,015	0,306 ± 0,024
216h (9j)		0,672 ± 0,048					
408h (17j)	0,791 ± 0,056			0,776 ± 0,016	0,598 ± 0,044		0,188 ± 0,013
Rondeur							
36h	0,832 ± 0,022	0,913 ± 0,010	0,877 ± 0,016	0,852 ± 0,016		0,648 ± 0,013	0,525 ± 0,036
216h (9j)		0,839 ± 0,031					
408h (17j)	0,907 ± 0,028			0,915 ± 0,057	0,788 ± 0,044		0,452 ± 0,022

Figure 53: Tableau récapitulatif des coefficients de circularité et de rondeur calculés pour des membranes de 1, 2 ou 3 cycles, selon qu'elles aient été stérilisées à l'éthanol ou aux rayons γ , à différentes durées de culture

D'après ce tableau, on distingue deux populations de cellules dont la forme est différente : celles qui sont à la surface des membranes de PVA (quel que soit le mode de stérilisation) et qui ont une circularité relativement élevée, proche de 0,75 en moyenne ; celles qui poussent au fond des puits et qui ont une circularité faible, en moyenne égale à 0,25. On observe la même répartition en deux populations de formes différentes si l'on se concentre sur le coefficient de rondeur : il est élevé et

proche de 0,9 pour les cellules à la surface des membranes ; il est faible et proche de 0,5 pour les cellules au fond des puits.

Ces chiffres mettent en exergue le fait que les cellules n'ont pas d'affinité pour les membranes de PVA puisqu'elles restent rondes à leur surface, et ce même après 17 jours de culture. Néanmoins, dès le pourtour des membranes ou lorsqu'elles tombent au fond des puits, les cellules retrouvent leur forme allongée naturelle. Ce résultat nous permet d'affirmer que le PVA n'est pas toxique pour les cellules, ce qui est cohérent avec d'autres résultats de la littérature [103]. Ramires et Milella ont réalisé des études de cytotoxicité et cytocompatibilité sur des membranes de PVA polymérisées chimiquement par des vapeurs de glutaraldehyde. En effet, ce dernier étant un produit toxique, l'élimination de tout résidu après rinçage devait être assurée. Ils ont ainsi démontré que les membranes obtenues n'avaient aucun effet toxique sur les fibroblastes 3T3 : elles n'affectaient ni leur viabilité ni leur prolifération, et n'entraînaient aucun dommage sur leurs fonctions mitochondriales et lysosomales. Ils ont également observé la faible adhésion des cellules à la surface des membranes, ainsi que leur tendance à se localiser plutôt sur les pourtours de ces dernières en ne présentant toutefois aucun signe d'altération.

D'autre part, le nombre de cycles de congélation/décongélation semble influencer la forme des cellules. En effet, à 36h de culture, et pour la stérilisation aux rayons gammas en particulier, on observe une diminution significative des coefficients de circularité et de rondeur à mesure que le nombre de cycles augmente. Par exemple, la circularité passe de $0,794 \pm 0,017$ (pour 1 cycle) à $0,541 \pm 0,015$ (pour 3 cycles). Lorsque l'on observe les photos prises sous microscope, on constate qu'il y a en fait un mélange de cellules plus ou moins arrondies à la surface des membranes ayant subi 3 cycles.

Afin de réaliser une analyse quantitative plus précise, nous avons tracé un diagramme représentant la répartition des cellules selon leur coefficient de circularité. Les résultats sont reportés sur les Figure 54 et Figure 55, pour des membranes ayant subi 1 et 3 cycles respectivement. La comparaison des diagrammes met en évidence une différence de comportement des cellules selon le nombre de cycles. Sur une membrane ayant subi 1 cycle, les cellules ont une circularité moyenne de 0,8. Pour 3 cycles, la population est dispersée et semble être constituée de deux types de cellules qui auraient une circularité d'environ 0,3 ou 0,8.

Ainsi, l'affinité moyenne des cellules pour les hydrogels de PVA augmente avec le nombre de cycles de congélation/décongélation. En passant de 1 à 3 cycles, la population évolue progressivement de cellules libres à cellules adhérentes.

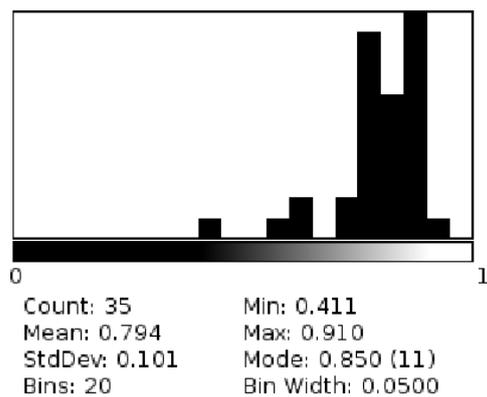


Figure 54: Répartition des cellules selon leur coefficient de circularité pour une membrane de PVA ayant subi 1 cycle de congélation/décongélation

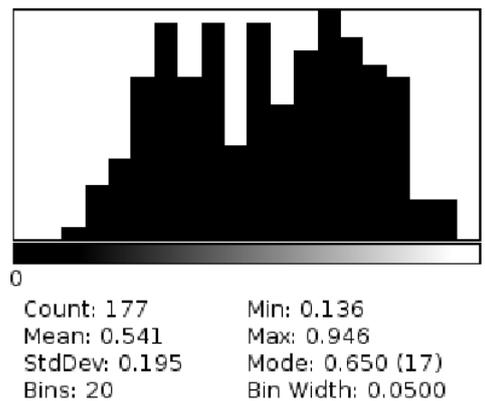


Figure 55: Répartition des cellules selon leur coefficient de circularité pour une membrane de PVA ayant subi 3 cycles de congélation/décongélation

Pour un même nombre de cycles, les résultats obtenus nous permettent d'affirmer que la technique de stérilisation n'a pas d'influence significative sur le comportement des cellules vis-à-vis des membranes de PVA. En effet, que la stérilisation ait été faite à l'éthanol ou aux rayons gammas, les coefficients de circularité et de rondeur des cellules à la surface des membranes restent élevés, et surtout significativement différents de ceux des cellules au fond des puits.

Une fois l'équivalence démontrée entre les deux modes de stérilisation et l'augmentation de l'affinité avec un nombre croissant de cycles, nous nous sommes concentrés sur le comportement intéressant des cellules vis-à-vis des membranes de PVA. En effet, un manque d'affinité pour un matériau peut éviter la formation précoce d'une capsule enrobante épaisse, qui empêcherait l'alimentation de la biopile en glucose et en oxygène.

Comme nous avons constaté que les cellules avaient tendance à pousser sur le bord des membranes, c'est-à-dire sur le pourtour des disques et en particulier sur les faces coupées, nous nous sommes interrogés sur une possible affinité des cellules pour le PVA rugueux et nous avons réalisé une seconde expérience. De la même manière que précédemment, des cellules épithéliales de prostate ont été mises en culture avec différents types de membranes de PVA. Néanmoins, nous nous sommes concentrés sur des gels ayant subi un seul cycle de congélation/décongélation et stérilisés à l'éthanol (pour des raisons de simplicité et d'équivalence).

Ainsi, une membrane lisse (fabriquée entre deux lames de verre et un moule en silicone) identique à celles de l'expérience précédente a été comparée à une membrane rugueuse (bloc de PVA découpé) et à une autre membrane de PVA lisse mais non rincée après fabrication (DMSO toujours

présent dans l'hydrogel). Des photos prises au microscope sont regroupées dans la Figure 56 ci-dessous.

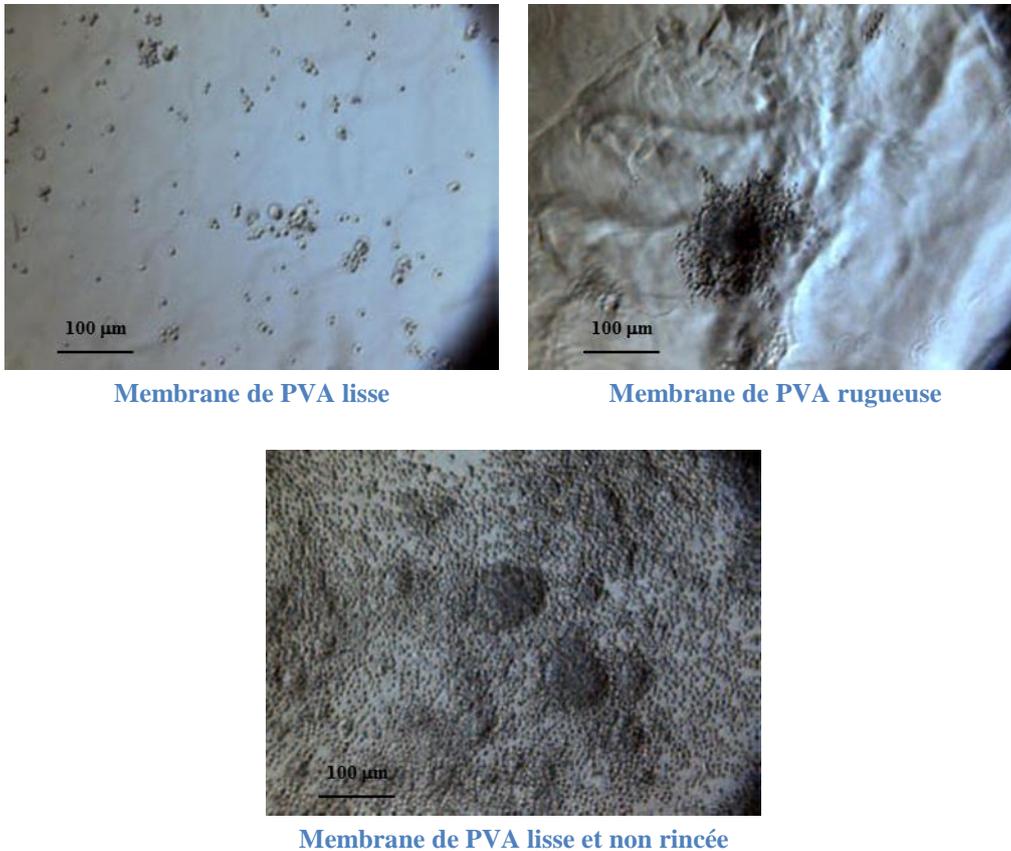


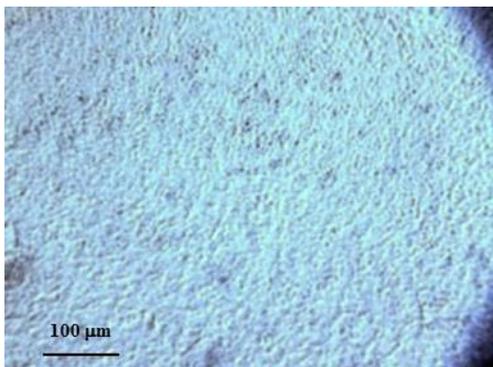
Figure 56: Cellules à la surface des membranes de PVA après 10 jours de culture

D'après ces images, les cellules ont toujours une forme arrondie quelle que soit la membrane de PVA étudiée. La croissance des cellules reste relativement faible, que ce soit sur les membranes rugueuses ou sur les lisses (Figure 56, en-haut). Elles réussissent cependant à faire des amas sur le PVA rugueux, grâce à des niches probablement. En revanche, si l'on observe la membrane de PVA lisse non rincée (Figure 56, en bas), on constate une augmentation importante de la population cellulaire. Ainsi, malgré le DMSO résiduel, les cellules restent vivantes et se multiplient même de manière plus importante. Il y a probablement une dilution du DMSO avec le milieu de culture, il n'est donc plus toxique dans ces conditions, il semble même être stimulant pour la prolifération cellulaire.

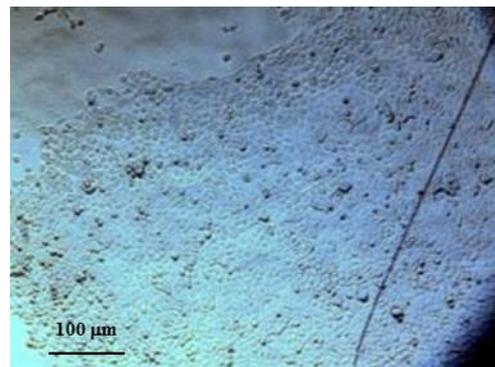
Pour conclure cette étude comparative, nous avons étudié le comportement des cellules vis-à-vis d'autres matériaux que le PVA. Nous avons donc choisi une membrane de chitosan fabriquée au

sein de l'équipe par un procédé de crosslinking chimique (génipine) puis de séchage [24], une autre de parylène et enfin une membrane en acétate de cellulose commerciale (Figure 57). Ces trois matériaux (évoqués dans le 2^{ème} chapitre du manuscrit) sont connus pour être biocompatibles ou déclenchant une réaction inflammatoire mais non toxique pour les cellules. Le chitosan et l'acétate de cellulose ont été longuement utilisés par l'équipe pour l'enrobage de la biopile [7, 9]. Il était donc intéressant de comparer le comportement cellulaire vis-à-vis de ces matériaux et du PVA. Le parylène a la propriété d'entraîner une prolifération et une adhérence cellulaire importantes à sa surface [104]. Les conditions d'ensemencement cellulaire des 3 matériaux ont été les mêmes que pour les hydrogels de PVA, c'est-à-dire : 200 000 cellules RWPE-1 par puit, dans un milieu de culture complet KSFM supplémenté avec rhEGF et BPE, pendant 10 jours. Pour chaque matériau, 3 échantillons ont été analysés. Nous avons observé un comportement cellulaire significativement différent de l'un à l'autre, mais également par rapport au PVA.

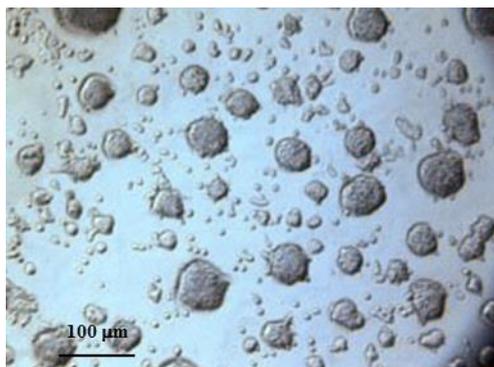
D'après la Figure 57, les cellules se multiplient abondamment sur les films de chitosan (en-haut à gauche) et de parylène (en-haut à droite). Elles y adhèrent et sont même confluentes, formant ainsi rapidement une capsule cellulaire enrobante donnant cet aspect grumeleux aux membranes. Sur l'acétate de cellulose en revanche, les cellules se regroupent par amas et formeront probablement des agrégats cellulaires avec le temps. Les coefficients de circularité et de rondeur n'ont pas pu être calculés cette fois-ci car les cellules étant trop nombreuses et confluentes, le traitement d'image était impossible. Néanmoins, il est évident que le comportement cellulaire observé sur ces 3 matériaux n'est pas comparable à celui observé sur les membranes de PVA.



Membrane de chitosan



Membrane de parylène



Membrane d'acétate de cellulose

Figure 57: Cellules à la surface des membranes de chitosan/parylène/acétate de cellulose après 10 jours de culture

Ainsi, la non-toxicité cellulaire des hydrogels de PVA a été vérifiée. De plus, il a été montré que les cellules n'ont pas d'affinité pour ces membranes : elles ne se multiplient pas abondamment à leur surface et ne sont pas confluentes. Ce dernier point peut être un atout pour l'enrobage de la biopile *in vivo* à long terme puisque cela permettrait d'éviter la formation d'une gangue cellulaire encapsulante qui pourrait empêcher, ou tout au moins ralentir, les échanges avec l'organisme. Sur ce point, le PVA se démarque des autres matériaux biocompatibles bien connus que sont le chitosan, le parylène et l'acétate de cellulose. En effet, ceux-ci sont très rapidement recouverts d'une couche cellulaire particulièrement dense ou d'agrégats cellulaires.

B. Étude *in vivo* : implantation du matériau

Après s'être assuré de la biocompatibilité des hydrogels de PVA *in vitro*, la biocompatibilité *in vivo* a été étudiée. Connaître la réaction de l'organisme vis-à-vis de ce corps étranger est essentiel pour anticiper toute réaction inflammatoire ou tout phénomène d'isolement de ce dernier. De plus, une implantation sur plusieurs mois nous a également permis d'étudier la résistance des membranes sur le long terme.

1. Protocole

Au cours de cette étude, 12 membranes de PVA ont été implantées dans 6 rats (2 membranes par rat) pour des durées différentes. Ces dernières sont des disques de 3,5 mm de diamètre et de 1 mm d'épaisseur. Elles ont été fabriquées par le même procédé que précédemment : 10 % de PVA dans une

solution aqueuse à 80 % de DMSO, 1 cycle de congélation/décongélation (10 h / 2 h). Après avoir été rincées abondamment pendant 3 jours, les membranes ont été stérilisées aux rayons gammas (12 kGy en 12 h).

L'implantation a été réalisée en intra-abdominal, dans la cavité péritonéale, sous anesthésie générale par Isoflurane. Deux disques ont été placés de part et d'autre de l'abdomen (l'un sur le flanc droit et l'autre sur le flanc gauche).

Il est important de noter que les hydrogels de PVA ont une texture qui s'est révélée particulièrement intéressante pour ce type d'expérience. En effet ils sont solides et souples à la fois, faciles à manipuler et à glisser dans l'abdomen sans toucher la peau de l'animal. La stérilité peut ainsi être conservée au maximum. De plus, ils peuvent être facilement mis à plat dans l'organisme et ne pas gêner l'animal.

Les explantations ont été réalisées après différentes durées d'implantation : 24, 49, 99, 171, 232 et 275 jours. Les membranes ont alors été récupérées pour réaliser deux études en parallèle : une analyse faite par un anatomopathologiste du CHU de Grenoble afin de mieux comprendre le type de réaction de l'organisme, et une expérience de diffusion afin de vérifier si les pores des membranes étaient bouchés par des cellules ou autres molécules de l'organisme et également pour s'assurer de l'absence de modification des membranes après une certaine durée d'implantation.

2. Intégration des membranes dans l'organisme

Dans cette section nous nous concentrerons sur la description macroscopique des membranes après explantation, ainsi que sur l'étude anatomopathologique des lames histologiques réalisées sur la plateforme HESS (UGA).

a) Description macroscopique après explantation

Au cours de chaque explantation, une observation macroscopique minutieuse de la cicatrice ainsi que des organes tels que les reins, les poumons, le cœur, l'estomac, le foie et les intestins a été réalisée. Nous cherchions à détecter toute anomalie ou tout signe d'inflammation, ainsi que la présence éventuelle d'adhérences entre les implants et les tissus environnants (cicatrice, graisse intra-abdominale, organes). Dans le même temps, après avoir repéré la position des membranes dans l'abdomen, nous les avons soigneusement extraites en conservant tout ce qui s'était développé à leur contact. Les photos prises après chaque explantation sont regroupées de la Figure 58 à la Figure 63.



Figure 58: Membranes après 24 jours d'implantation



Figure 59: Membranes après 49 jours d'implantation



Figure 60 : Membranes après 99 jours d'implantation



Figure 61 : Membranes après 171 jours d'implantation

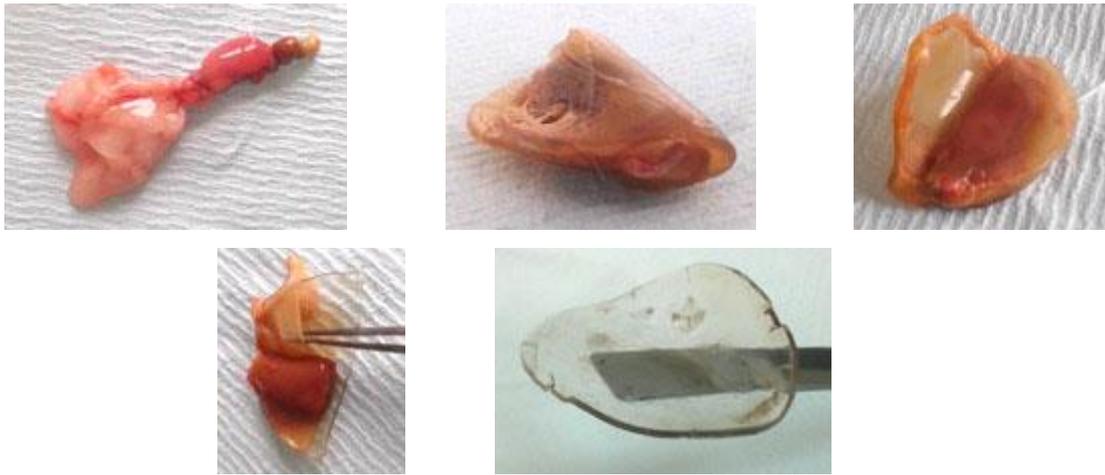


Figure 62: Membranes après 232 jours d'implantation

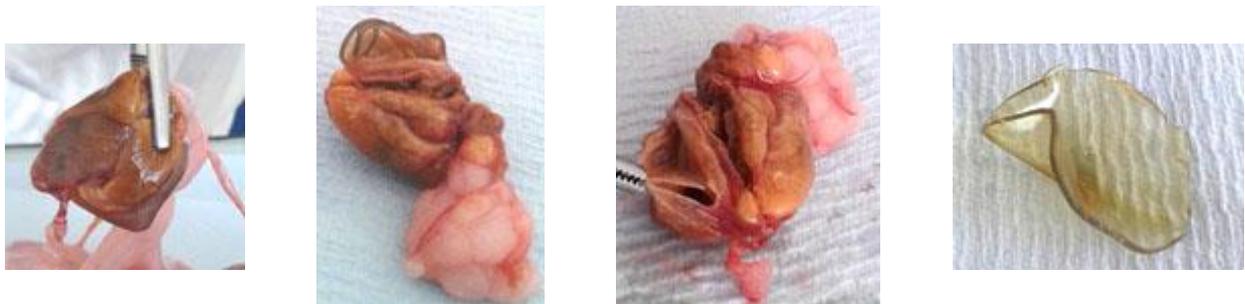


Figure 63 : Membranes après 275 jours d'implantation

A chacune des explantations, la cicatrice était propre, il n'y avait aucun signe d'inflammation et les organes étaient intacts, sans anomalie. Nous avons également pu observer qu'à chaque fois, les membranes de PVA s'étaient déplacées dans l'abdomen et superposées pour ne former qu'un seul et même « implant ».

Jusqu'à 171 jours d'implantation, aucune adhérence n'a été observée entre l'implant et les tissus environnants. Mais à partir de l'explantation à 232 jours, des adhérences avec la cicatrice et avec la graisse intra-abdominale sont visibles. Celles-ci ont entraîné des phénomènes d'enroulement de l'implant sur lui-même, enfermant ainsi des macrophages et autres cellules, puis entraînant leur hypoxie. La matière formée par ces déchets est de couleur jaunâtre/marron, plus ou moins dure voire calcifiée, formant une masse atteignant une taille de 1,5 cm sur 1 cm environ à 275 jours d'implantation.

Dès la 1^{ère} explantation, à J24, on observe la prolifération de cellules au contact des hydrogels de PVA. Celles-ci forment des filaments fibreux et rigides, qui mettent parfois en tension les

membranes et sont même capables de les plier. Les cellules ont tendance à former une capsule enrobante autour de l'implant, très fine au début, mais qui est de plus en plus épaisse et rigide à mesure que la durée d'implantation s'allonge, en particulier lorsqu'elle atteint 232 jours. La capsule enrobante est de couleur blanchâtre à jaunâtre, évoquant du tissu conjonctif, et une vascularisation s'y développe à partir de J171. La particularité de ce tissu enrobant est qu'il n'adhère pas aux hydrogels de PVA. En effet, lorsqu'on le découpe, les films de PVA se déplient et se libèrent. Ils sont en parfait état, plutôt propres et transparents malgré quelques agrégats en surface. Ainsi, le comportement des cellules épithéliales de prostate observé lors des analyses de cytocompatibilité *in vitro* est concordant avec ce que l'on observe *in vivo*.

A noter que l'on observe systématiquement, à partir de l'explantation à J99, la formation de petites masses dures et grisâtres dans l'abdomen, à proximité de l'implant mais non en contact direct. Celles-ci n'ont aucune adhérence avec les tissus environnants.

Ainsi, d'après ces implantations de membranes de PVA sur une période maximale de 9 mois, nous sommes confortés dans l'idée que ce matériau n'engendre pas de réaction inflammatoire importante ou toxique. La formation d'une capsule enrobante de tissu conjonctif est relativement lente, ce qui est un avantage. De plus, elle semble fine et pourrait peut-être laisser passer le glucose et l'oxygène, en tout cas dans les premiers temps.

Néanmoins, la production et l'agrégation de tissu conjonctif fibreux semble conduire à la formation de nodules. De plus, la forme de l'implant tel qu'il a été installé au cours de ces expériences a conduit à la formation d'enroulements de graisse intra-abdominale et à l'emprisonnement de tissus environnants. Il est vrai que nous n'avons pas observé d'adhérence avec la paroi abdominale ou d'autres organes, il n'y a donc pas eu d'ischémie. Cependant, ce phénomène pourrait être dangereux pour l'organisme à long terme, il pourrait aussi être néfaste pour la biopile à glucose en l'isolant et en l'asphyxiant.

b) Etude anatomopathologique

Après chaque explantation, une des deux membranes implantées a été conservée dans une solution de formaldéhyde à 5 % avec les tissus environnants. Un procédé de déshydratation, puis d'inclusion en paraffine, a permis de réaliser des coupes de 5 µm. Elles ont ensuite été étalées et séchées sur des lames de verre. Une coloration standard HES (Hématoxyline-Eosine-Safran) a été réalisée : l'hématoxyline colore les noyaux en violet foncé, l'éosine les cytoplasmes en rose, et le safran les fibres collagènes en jaune. Pour finir, des lamelles de verre ont finalement été déposées et

collées afin de fixer et de protéger les coupes. Celles-ci ont ensuite pu être observées au microscope, et les photos prises sont reportées de la Figure 64 à la Figure 74.

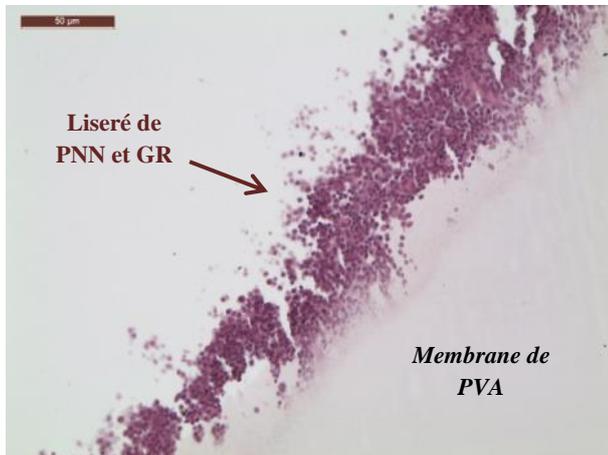


Figure 64: Liseré de polynucléaires neutrophiles (PNN) et globules rouges (GR) bordant la membrane de PVA après 24 jours d'implantation (coloration HES)

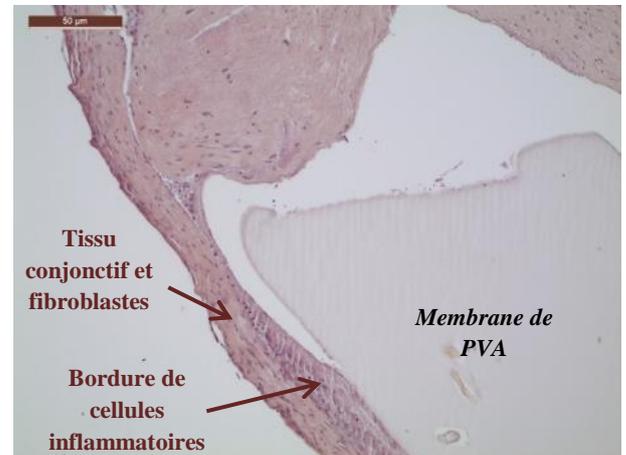


Figure 65: Tissu environnant la membrane de PVA après 24 jours d'implantation. Il est composé d'une bordure de cellules inflammatoires et d'un tissu conjonctif avec des fibroblastes (coloration HES)

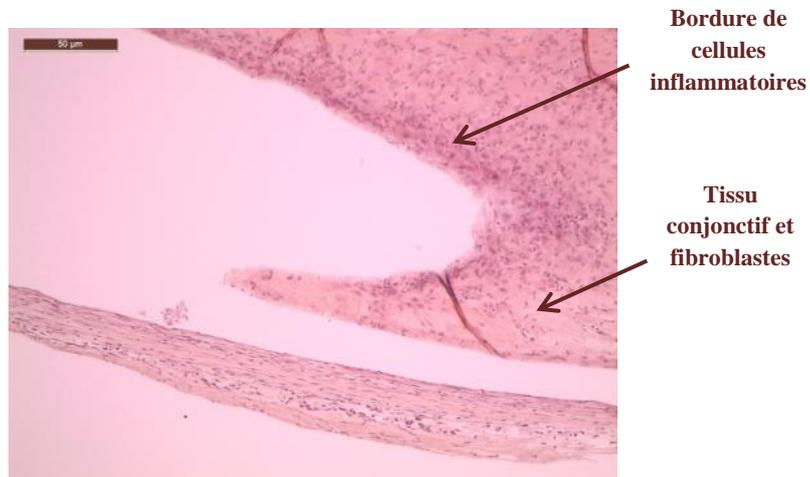


Figure 66 : Tissu environnant la membrane de PVA après 49 jours d'implantation. Bordure de cellules inflammatoires et tissu conjonctif avec des fibroblastes (coloration HES)

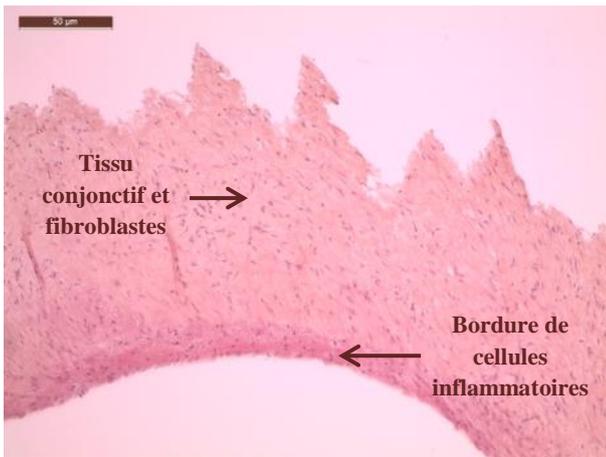


Figure 67: Tissu enrobant la membrane de PVA après 99 jours d'implantation. La bordure de cellules inflammatoires est moins importante qu'auparavant, et le tissu conjonctif est toujours présent (coloration HES)



Figure 68: Nodule de tissu conjonctif très dense formant des cavités dont les centres sont parfois nécrotiques avec quelques dépôts de minéralisation. Gangue enrobante très fibreuse (coloration HES)

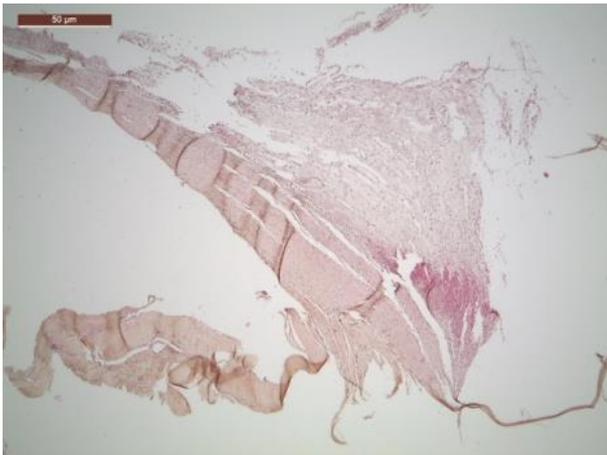


Figure 69: Tissu enrobant la membrane de PVA après 171 jours d'implantation, essentiellement composé de tissu conjonctif très fibreux (coloration HES)

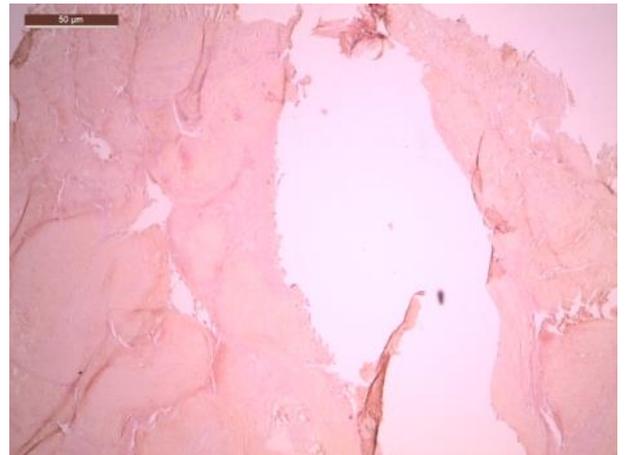


Figure 70: Nodule de tissu conjonctif très dense formant des cavités dont les centres sont nécrotiques avec quelques dépôts de minéralisation (coloration HES)

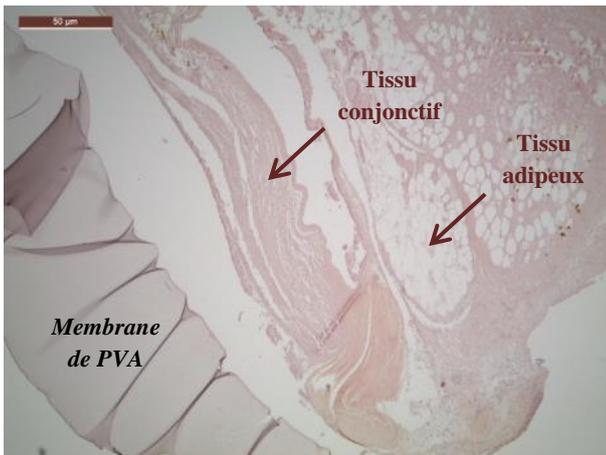


Figure 71: Tissu enrobant la membrane de PVA après 232 jours d'implantation. Fine lame de tissu conjonctif enrobée de tissu adipeux vascularisé (coloration HES)

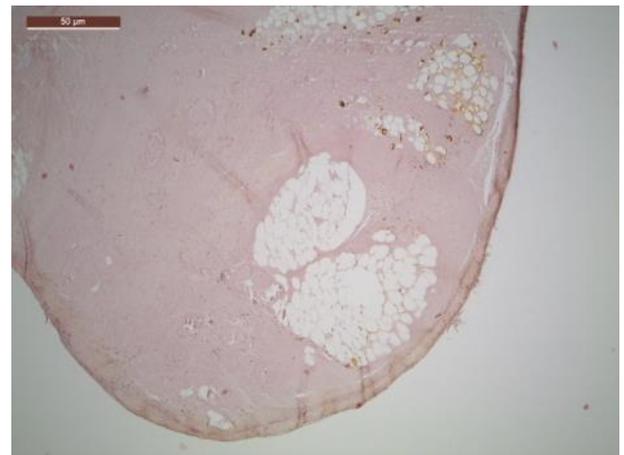


Figure 72: Enroulement constitué d'un nodule de tissu conjonctif très dense et de tissu adipeux fortement vascularisé (coloration HES)

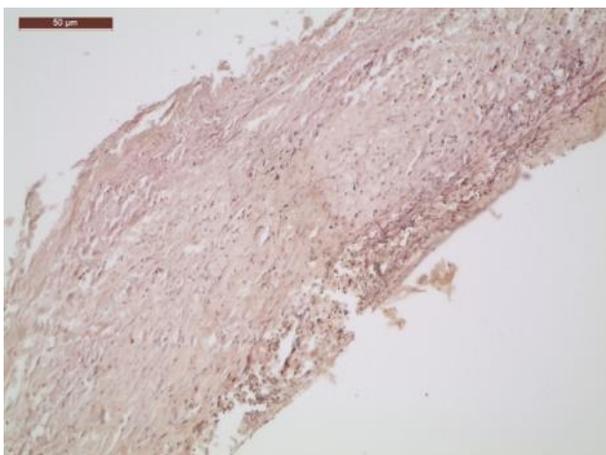


Figure 73: Tissu enrobant la membrane de PVA après 275 jours d'implantation. Léger tissu cicatriciel inflammatoire et fine lame de tissu conjonctif très fibreux (coloration HES)

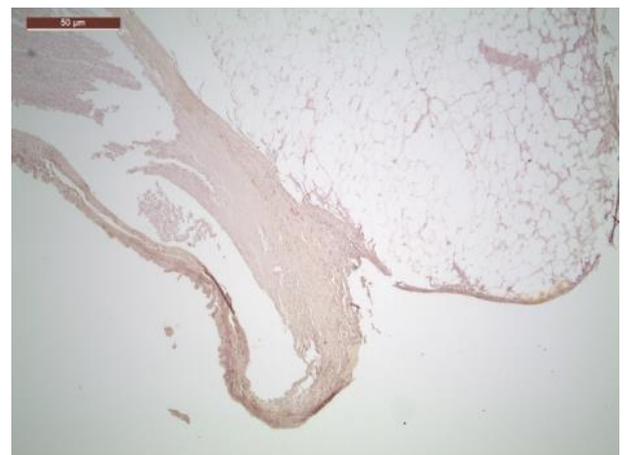


Figure 74: Enroulement constitué de tissu adipeux fortement vascularisé et de quelques zones de tissu conjonctif très dense (coloration HES)

Après 24 jours d'implantation, on observe une réaction inflammatoire au contact du film : une réaction lymphohistiocytaire et granulomateuse. Il s'agit d'une réaction normale de l'organisme par rapport au corps étranger, mais ce n'est pas une réaction de type toxique ou purulente. Cette réaction inflammatoire est retrouvée quelle que soit la durée d'implantation, néanmoins elle est de moins en moins marquée à mesure que le temps passe. On observe également des fibroblastes après la bordure de cellules inflammatoires, formant un tissu conjonctif cicatriciel jeune. Celui-ci se vascularise après 171 jours d'implantation, il est très fibreux et son épaisseur reste relativement fine.

Nous avons également observé les nodules retrouvés dans l'abdomen des rats à proximité de l'implant. Ceux-ci sont en fait des masses aux cavités multiples composées de tissu conjonctif très dense, dont les centres sont parfois nécrotiques avec quelques dépôts de minéralisation, le tout enrobé d'une gangue très fibreuse et dure.

D'autre part, les tissus constituant les enroulements sont essentiellement du tissu adipeux, fortement vascularisé par de nombreux capillaires de différentes tailles, avec quelques zones de tissu conjonctif très dense.

Ainsi, en anatomopathologie, aucune réaction toxique ou purulente n'est observée au contact des membranes de PVA. En revanche, une réaction inflammatoire modérée est visible. Celle-ci est une réaction normale qui correspond à l'agression que constituent la chirurgie et la mise en place d'un corps étranger dans l'organisme. En outre, l'inflammation initiale est modérée et semble diminuer au cours du temps.

L'analyse des tissus enrobant les membranes de PVA, ainsi que ceux pris dans les enroulements, montre la prolifération de fibroblastes autour du matériau. Ceux-ci forment un tissu conjonctif particulièrement dense qui semble conduire à la formation de nodules minéralisés. Ce phénomène pourrait être problématique à long terme car une capsule enrobante épaisse et dense pourrait conduire à l'isolement de l'implant. Dans le cas particulier de la biopile à glucose, les échanges de molécules avec l'organisme vivant pourraient être considérablement diminués, voire abolis. D'autre part, l'augmentation de la taille des nodules au cours du temps pourrait être problématique et dangereuse en entraînant des phénomènes de compression comme peut le faire toute tumeur. Les adhérences observées ainsi que les phénomènes d'enroulement sont peut-être liés à cette intense prolifération de fibroblastes. C'est pourquoi il faudrait réaliser de nouvelles implantations du dispositif entier afin d'optimiser son design pour éviter ce problème.

3. Diffusion après implantation

Pour chaque explantation, la 2^{ème} membrane récupérée a été rincée pendant 30 minutes dans une solution tampon de PBS afin de réaliser une expérience de diffusion. Le but était de vérifier si oui ou non les pores des hydrogels étaient bouchés par des cellules ou molécules de l'organisme.

De la même manière que décrit précédemment ($T = 37^{\circ}\text{C}$), l'étude de la diffusion du glucose à travers les membranes en PVA après implantation nous a permis d'accéder au coefficient de perméabilité au glucose. Ainsi, nous avons pu comparer ces coefficients après différentes durées d'implantation. Les résultats obtenus sont résumés ci-dessous.

Date d'explantation	Coefficient de perméabilité au glucose
J0	$5,12 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
J24	$4,16 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
J49	$3,17 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
J99	$4,16 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
J171	$4,47 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
J232	$3,4 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
J275	$4,65 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

D'après ce tableau, la durée d'implantation et en particulier les molécules adhérentes aux hydrogels de PVA n'ont pas de réelle influence sur le coefficient de perméabilité au glucose. Cependant, il faut noter que ces expériences ne sont pas révélatrices de la réalité puisque la membrane de collagène enrobant les 2 hydrogels de PVA superposés a été enlevée pour pouvoir réaliser ces expériences de diffusion. En effet, au cours de ces implantations nous nous sommes heurtés à un problème : les membranes initialement implantées séparément, chacune d'un côté de l'abdomen, se sont rapidement rejointes dans l'abdomen pour se coller l'une à l'autre et être ainsi enrobées ensemble, par un même film de collagène. Ainsi, au moment de les récupérer pour faire de l'anatomopathologie et de la diffusion, nous avons été obligé de découper cette membrane enrobante afin de les récupérer séparément. Il faudrait donc réaliser une expérience au cours de laquelle une seule membrane serait implantée, et ensuite testée dans la cellule de diffusion, avec le film de collagène enrobant maintenu autour d'elle.

C. Conclusion

Dans cette seconde partie concentrée sur l'étude de la biocompatibilité *in vitro* et *in vivo* des hydrogels de PVA, nous avons démontré la non-toxicité cellulaire du PVA ainsi que sa bonne intégration dans l'organisme. En effet, ce matériau n'engendre pas de réaction inflammatoire trop importante ni de réaction toxique.

De plus il a une propriété particulièrement intéressante dans le cadre de l'enrobage de la biopile à glucose, qui est que les cellules n'ont pas d'affinité marquée pour lui et ne se multiplient pas abondamment à sa surface. Néanmoins, en implantation *in vivo* on observe la formation d'une fine

capsule de collagène. Il faudrait à présent pouvoir vérifier si cette fine capsule est perméable au glucose ou non.

D'autre part, une étude plus poussée doit être menée sur le phénomène d'enroulement observé ainsi que sur les calcifications formées. Pour cela, des implantations de biopiles entières, enrobées d'une membrane de PVA et en mouvement dans l'abdomen, doivent être réalisées afin d'observer l'influence du design de l'implant sur la prolifération des fibroblastes.

Chapitre V. Enrobage des électrodes

Les hydrogels de PVA ayant été caractérisés physico-chimiquement, leur non-toxicité cellulaire ayant été vérifiée et leur intégration dans l'organisme ayant été observée, il est maintenant indispensable d'étudier la faisabilité de l'enrobage des électrodes. En effet, le but ultime étant d'enrober la biopile à glucose, le bon fonctionnement des électrodes enrobées d'une membrane en PVA doit être assuré.

Pour ce faire, la méthode de fabrication ainsi que le design des électrodes ont tout d'abord dû être optimisés afin de rendre le système plus robuste et d'augmenter la surface d'échange avec l'environnement. Ensuite, la méthode d'enrobage en elle-même et la manière de sceller le système ont été développées. Pour finir, des mesures électrochimiques ont été réalisées afin de vérifier le bon fonctionnement des électrodes enrobées d'une membrane de PVA.

A. Méthode d'encapsulation

1. Modifications apportées aux électrodes

En parallèle de l'évaluation du PVA en tant que moyen d'encapsulation des futures électrodes (anodes et cathodes), des modifications ont été apportées par l'équipe au procédé de fabrication de celles-ci. Ces modifications visaient à améliorer les performances de la biopile, mais également à rendre possible l'utilisation du PVA comme interface avec le milieu vivant. En effet, la friabilité des électrodes fabriquées par compression mécanique rend délicate l'étape d'encapsulation par une enveloppe élastique, sans risquer de les endommager. Bien entendu, améliorer la résistance mécanique des électrodes pour permettre leur encapsulation augmentera aussi leur stabilité dans le temps, ce qui est particulièrement important pour l'implantation *in vivo*.

Pour cela, nous avons pensé à utiliser un polymère au cours de la fabrication des électrodes, afin que celui-ci joue le rôle de liant entre les nanotubes de carbone et les enzymes. Une fois sec, le polymère agit comme une colle qui rend la pastille moins friable. Ainsi, du chitosan est utilisé pour la fabrication de la cathode [23, 24] et un autre polymère est utilisé pour l'anode (protection en cours

d'établissement). Nous ne présenterons pas toutes les caractéristiques de ce nouveau procédé de stabilisation de la compression des constituants actifs, nous nous focaliserons simplement sur les avantages apportés qui permettent en particulier de réaliser l'encapsulation par le PVA.

Le liant utilisé pour les deux types d'électrodes permet de constituer une pâte homogène composée des nanotubes de carbone, des enzymes lyophilisées et des médiateurs en proportions voulues. Cette pâte est immédiatement moulée au format souhaité et, après quelques minutes à température ambiante, est suffisamment sèche pour être manipulée. La connexion du fil conducteur au cœur de la pastille, avec la pâte de carbone, peut être réalisée à ce moment-là (Figure 75). Plusieurs heures de séchage complémentaire (10 à 15 heures) à température ambiante sont alors nécessaires avant de réaliser l'encapsulation des électrodes. À cette étape, les électrodes sont parfaitement dures et aucune particule ne s'effrite lors de la manipulation.

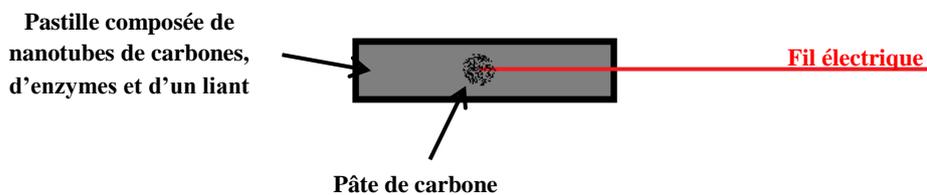


Figure 75: Nouveau design d'électrode utilisant un liant (polyacrylate de sodium) pour le renforcement mécanique de la pastille, avec une connexion électrique au cœur de celle-ci.

2. Avantage lié à l'élasticité de l'hydrogel de PVA

Les pastilles obtenues par la méthode de fabrication initiale nécessitaient une membrane supplémentaire pour éviter le relargage d'enzymes dans l'organisme. Elle était constituée d'un polymère: le chitosan (CS). Ce macro polymère naturel permet de réaliser de fines membranes aux propriétés intéressantes. Celles-ci ne sont cependant pas suffisamment élastiques pour permettre un enrobage complet (d'un seul tenant) d'une pastille de forme cylindrique. La solution alors retenue (Figure 76) consistait à découper une membrane de chitosan circulaire, de diamètre inférieur à celui de la pastille, afin d'assurer l'interface avec le milieu vivant. Cette membrane était ensuite maintenue par un bourrelet de mastic silicone pâteux, étanche et biocompatible, qui enveloppait également le reste de la surface de la pastille.

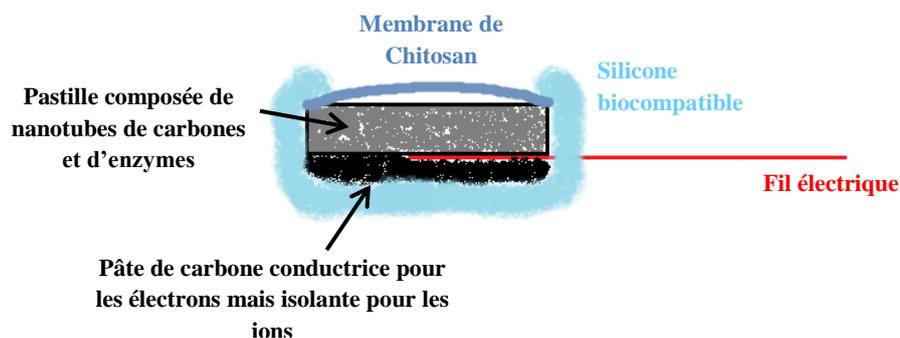


Figure 76: Électrode réalisée avec la méthode de fabrication initiale, recouverte d'une membrane de chitosan scellée grâce à un bourrelet de silicone biocompatible enrobant la totalité de la pastille.

Cette opération délicate avait pour effet de maintenir en place la membrane de chitosan, mais hypothéquait par la même occasion une part importante de la surface d'échanges active qui n'était plus disponible. Ainsi, pour une électrode de format standard (diamètre = 10 mm, épaisseur = 2 mm), environ 2/3 de la surface potentiellement active étaient perdus avec ce procédé de montage. De plus, le volume de l'électrode était inutilement augmenté (d'un facteur 2 environ) et son contour irrégulier était susceptible d'augmenter la réaction inflammatoire locale après implantation.

L'élasticité de l'hydrogel de PVA précédemment décrit est un atout pour réaliser un enrobage d'une seule pièce de la pastille, comme nous le verrons au paragraphe 4.

Deux modalités différentes de création d'une enveloppe ont été envisagées. Soit en moulant une enveloppe au format exact souhaité, en créant un moule et son contre-moule selon les procédés habituels de la plasturgie ; soit en enveloppant directement la pastille dans une « nappe » de PVA d'épaisseur régulière. Le premier procédé est tout à fait réaliste et plusieurs prototypes ont été réalisés, mais le second procédé (décrit au paragraphe 4) s'est avéré plus facile à mettre en œuvre et donne de meilleurs résultats.

3. Capacité d'auto-cicatrisation d'un hydrogel de PVA

Quelle que soit la modalité de réalisation de la capsule enrobant la pastille (moulage ou enrobage), il est nécessaire de prévoir une fermeture de la membrane autour du fil collecteur d'électrons de l'électrode. Plusieurs tentatives de collage de l'hydrogel de PVA sur lui-même se sont avérées décevantes avec l'utilisation des colles commercialisées, le maintien de la membrane sur elle-même étant inopérant ou insuffisant.

Ceci nous a amenés à établir les conditions de scellement spontané de l'hydrogel sur lui-même, ce qui permet d'envelopper le fil conducteur (fil de cuivre torsadé et isolé de diamètre extérieur

compris entre 0,2 et 0,5 mm) sur une longueur de quelques millimètres au sortir de la pastille (Figure 77 et photos paragraphe 4). Le procédé élaboré au sein de l'équipe ne sera pas développé dans ce manuscrit car une protection est en cours d'élaboration.

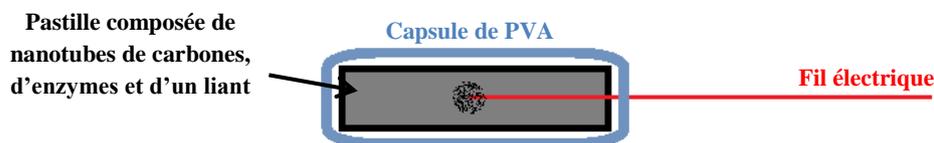


Figure 77: Electrode enrobée d'une capsule de PVA scellée autour du fil électrique

4. Protocole d'encapsulation

L'encapsulation d'une électrode consiste tout d'abord à mouler un disque d'hydrogel de PVA à 10% (diamètre = 35 mm, épaisseur = 1 mm) comme indiqué précédemment. La cristallisation (Figure 78 - 1) est réalisée par congélation / décongélation. Grâce à son élasticité et à sa résistance à l'étirement, cette « nappe » de PVA est ensuite mise à la forme souhaitée par contraintes autour d'une pièce de silicone poreuse (fantôme blanc). Une boucle de latex (blanche) est utilisée pour maintenir l'enveloppe en place (Figure 78 - 2) durant au moins 24 heures. Ce montage provisoire est conservé dans un grand volume d'eau distillée afin d'éliminer la totalité du DMSO encore présent dans l'hydrogel (Figure 78 - 3). Pour cela, l'eau est renouvelée plusieurs fois. Plusieurs capsules sont préparées de cette façon et conservées à température ambiante à l'abri de la lumière afin d'éviter le développement de micro-organismes tels que des algues (Chlorelles) car nous ne travaillons pas en milieu stérile.

Au moment de l'encapsulation d'une électrode, le lien de latex est retiré (Figure 78 - 4), ce qui permet de vérifier que l'enrobage est fixé dans sa nouvelle forme, sans pour autant que l'ouverture ne soit soudée. On utilise une pince de forme adaptée (découpée sur mesure dans une lamelle de plastique), introduite de part et d'autre du disque provisoire, pour retirer ce dernier (Figure 78 - 5). Tout en maintenant l'enveloppe de PVA ouverte avec la pince restée en place, on introduit la pastille de l'électrode (Figure 78 - 6) à l'intérieur de l'enveloppe en laissant le fil conducteur en face de l'ouverture (Figure 78 - 7). On utilise à nouveau le lien de latex (Figure 78 - 8) pour maintenir l'enveloppe bien serrée autour du fil conducteur, et le scellement de la membrane de PVA sur elle-même est réalisé (Figure 78 - 9) (procédé en cours de protection). Le surplus d'hydrogel est éliminé avec des ciseaux fins (Figure 78 - 10). Le montage est ensuite renforcé par un manchon de gaine de

polymère thermo-rétractable transparente (diamètre = 3 mm, longueur = 5 mm), placé par-dessus la zone de scellement (Figure 78 - 11).

L'ensemble est ensuite déshydraté durant 48 heures à température ambiante afin de pouvoir procéder à la stérilisation par les rayons gamma (Figure 78 - 12). Une fois stérile, l'électrode est réhydratée par une solution physiologique (PBS) avant son implantation.

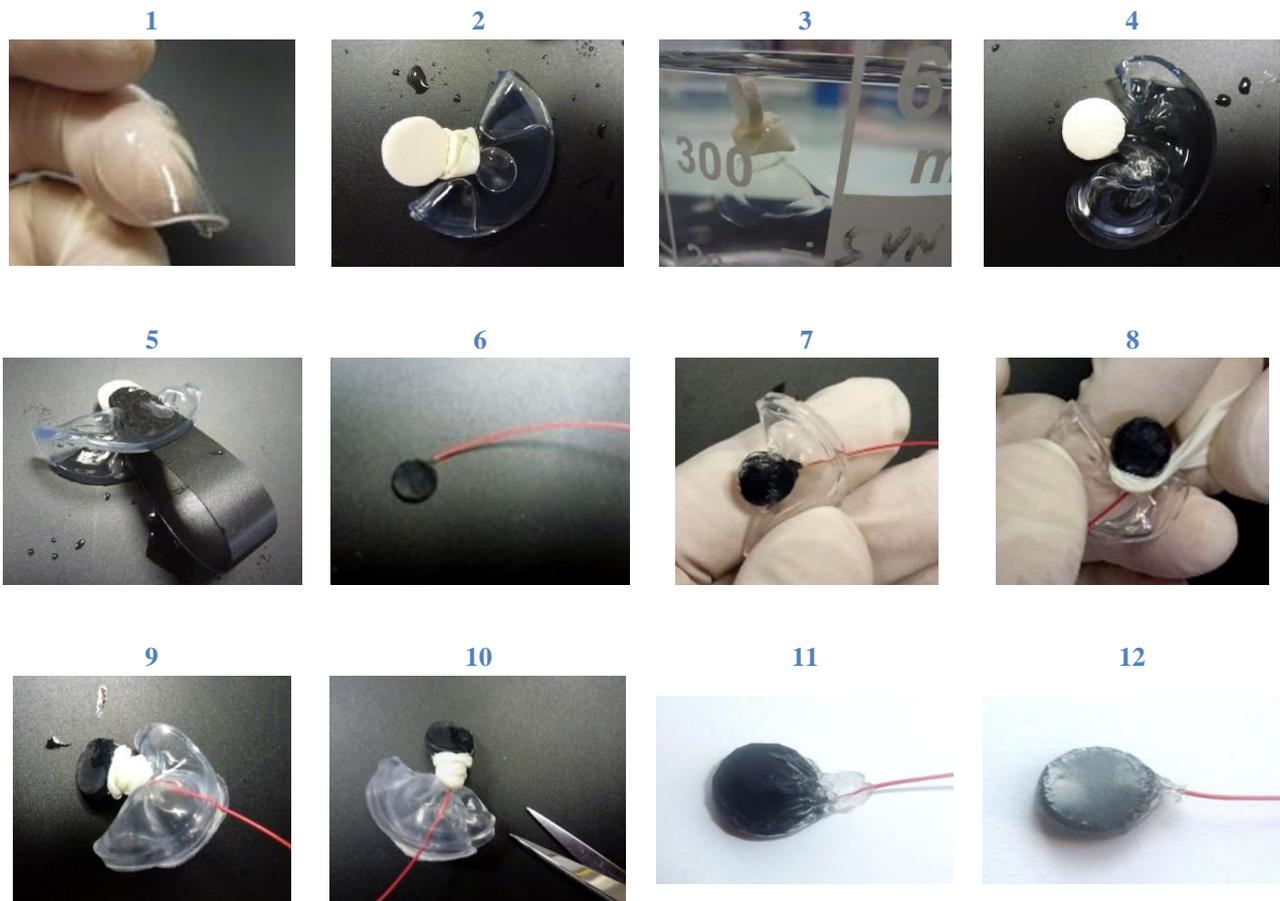


Figure 78: Procédure d'encapsulation d'une électrode : 1-Cristallisation d'une membrane de PVA ; 2-Mise en forme de la membrane autour d'un fantôme grâce à un lien de latex ; 3-Rinçage du DMSO contenu dans la membrane de PVA ; 4-Lien de latex retiré ; 5-Fantôme retiré grâce à une pince sur mesure ; 6-Électrode sèche ; 7-Enrobage de la pastille avec la membrane de PVA préformée ; 8-Mise en place du lien de latex autour du fil électrique et de la membrane ; 9-Scellement de l'enrobage de PVA ; 10-Découpage aux ciseaux du surplus de membrane ; 11-Renforcement du scellement grâce à une gaine de polymère thermo rétractable ; 12-Déshydratation pendant 48h à température ambiante avant stérilisation.

Grâce à ce procédé d'encapsulation, nous parvenons à réaliser des électrodes solides, enrobées d'un matériau lisse et biocompatible scellé autour du fil électrique. Ces électrodes sont de petite taille, et l'ensemble du volume électrochimiquement actif peut participer au fonctionnement de la biopile.

B. Fonctionnement des électrodes enrobées

Pour finir cette étude et afin de démontrer objectivement la faisabilité de l'enrobage des électrodes par une capsule en PVA, des expériences d'électrochimie ont été réalisées. La résistance électrique des membranes de PVA a été étudiée, puis des expériences de diffusion à l'oxygène et au glucose ont été menées.

1. Influence de l'enrobage en PVA sur la réponse électrochimique

Deux techniques électrochimiques ont été utilisées afin d'étudier l'effet d'un enrobage en PVA sur la réponse électrochimique d'une électrode et afin de s'assurer de la porosité de cet enrobage. Pour cela, nous avons utilisé une électrode de carbone vitreux recouverte ou non d'une membrane de PVA, plongée dans une solution tamponnée à pH = 7,4 (pH physiologique) et en présence d'une sonde électrochimique : le ferrocyanure $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (à 5 mM). Une seule expérience a été réalisée pour chaque technique de mesure.

a) Impédance électrochimique

Tout système soumis à un courant alternatif obéit à la loi $V = ZI$. L'impédance Z est une fonction de la fréquence f du signal, de la résistance R , et de la capacité C . Cette mesure s'interprète comme un nombre complexe et peut être décomposée en deux parties, réelle et imaginaire. La composante réelle de l'impédance est caractérisée par une résistance pure. La partie imaginaire reprend tous les termes liés à la fréquence et affecte la différence de potentiel V d'un décalage de phase par rapport au courant.

Dans un système électrochimique, deux composantes de l'impédance seront toujours présentes : la capacité et la résistance. Dans le cas des membranes, la résistance reflète le transfert des espèces au travers de la membrane sous l'effet d'un courant électrique. La capacité est liée aux phénomènes d'accumulation des charges à la surface de la membrane. A titre d'exemple, le module de l'impédance d'un système « résistance-condensateur en série », est donné par la relation suivante :

$$|Z| = \sqrt{R^2 + \left(\frac{1}{C\omega}\right)^2} \quad (7)$$

Généralement, on représente l'impédance dans un diagramme appelé « diagramme de Nyquist » dont l'abscisse correspond à la partie réelle et l'ordonnée à la partie imaginaire.

Pour réaliser cette mesure d'impédance, nous avons utilisé un montage à trois électrodes (Figure 79) : l'électrode de travail, l'électrode auxiliaire, et l'électrode de référence. Ainsi, les potentiels sont mesurés relativement à l'électrode de référence Ag/AgCl, et les échantillons cylindriques en PVA sont fixés à l'extrémité de l'électrode de travail qui est ici une électrode de carbone vitreux (Figure 80). Les potentiels sont appliqués par un potentiostat piloté par ordinateur, et les mesures de spectroscopie d'impédance ont été réalisées dans la gamme de fréquence 0,1 Hz – 10 kHz, à 200 mV.

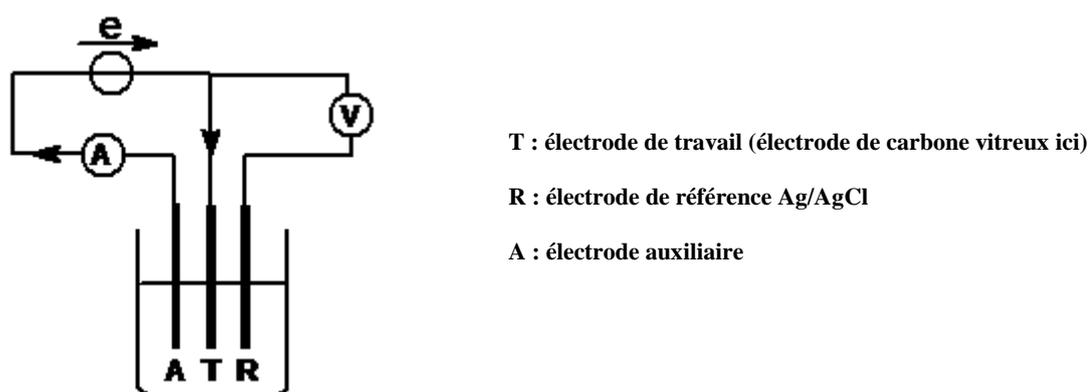


Figure 79: Montage à 3 électrodes

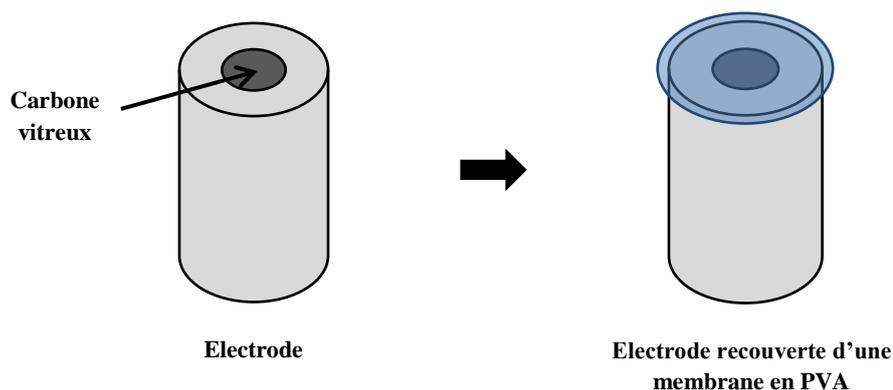


Figure 80: Schéma de l'électrode de carbone vitreux

La mesure de l'impédance a été faite en présence et en absence d'une membrane de PVA sur la surface de l'électrode de carbone vitreux.

Les diagrammes de Nyquist obtenus (Figure 81) avec (en rouge) et sans (en bleu) membrane de PVA ont des allures relativement différentes. De plus, en présence de la membrane de PVA, les deux composantes (réelles et imaginaires) de l'impédance sont considérablement augmentées. Ceci montre que, bien que la membrane soit poreuse, elle gêne la diffusion du ferrocyanure jusqu'à l'électrode. Cette augmentation d'impédance peut être liée à une simple diminution de la surface disponible de l'électrode en présence de la membrane. Mais elle peut également être due à une diminution de la diffusion du ferrocyanure à travers la membrane.

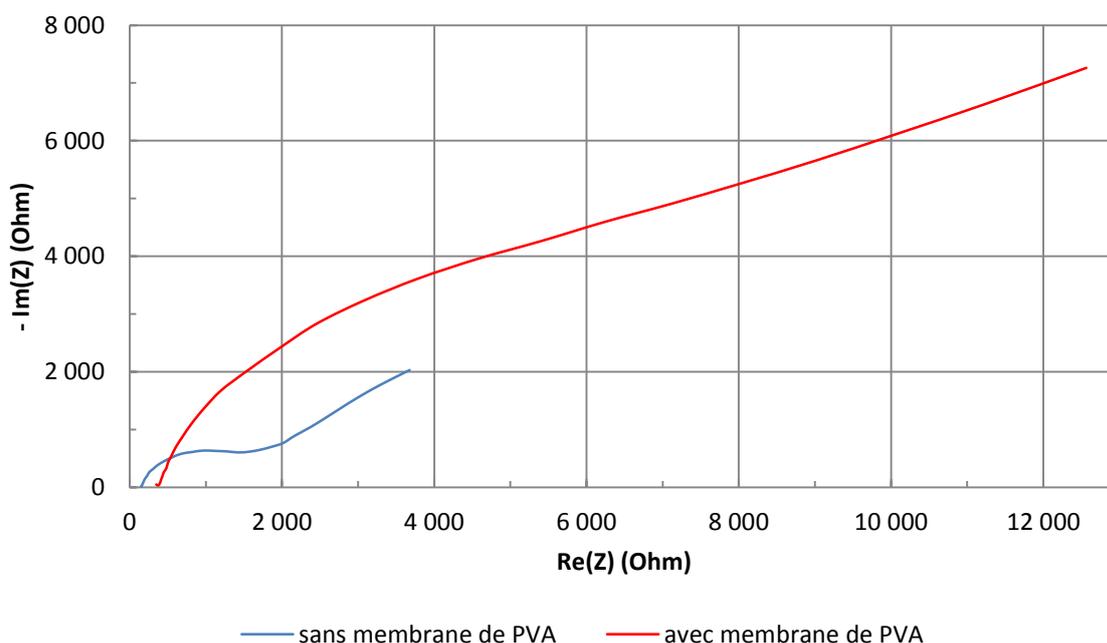


Figure 81: Tracés de l'impédance de l'électrode avec (rouge) et sans (bleu) membrane de PVA sur un diagramme de Nyquist ($f = 0,1-10$ kHz, $V = 200$ mV)

b) Voltamétrie cyclique

Afin de confirmer les résultats obtenus par spectroscopie d'impédance, nous avons réalisé des mesures de voltamétrie cyclique en présence et en absence d'une membrane de PVA sur l'électrode.

Cette technique, classique en électrochimie, consiste à faire varier linéairement avec le temps le potentiel de l'électrode de travail entre deux bornes et à mesurer le courant électrique qui en résulte. Le balayage du potentiel se fait dans un sens puis dans l'autre, définissant un cycle de mesure. La Figure 82 est un exemple de diagramme voltampérométrie cyclique pour un système redox idéal.

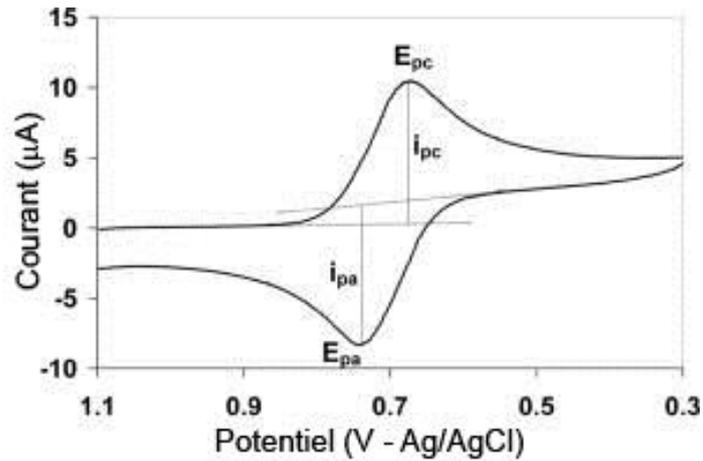


Figure 82: Diagramme voltampérométrie cyclique pour un système redox idéal

La valeur du courant de pic I_p , qui correspond au courant de réduction (ou d'oxydation), est linéairement proportionnelle à la surface de l'électrode S et à la racine carrée du coefficient de diffusion de la molécule réductrice D d'après l'équation de Randles-Sevcik :

$$I_p = 0,4463 * nFC \sqrt{\frac{nFv}{RT}} * S\sqrt{D} \quad (8)$$

où : n est le nombre d'électrons impliqués dans la réaction,

F est la constante de Faraday,

T est la température de réaction en Kelvin,

R est la constante des gaz parfaits,

C est la concentration des espèces électro-actives,

v est la vitesse de balayage du potentiel (ici égale à 50 mV/s).

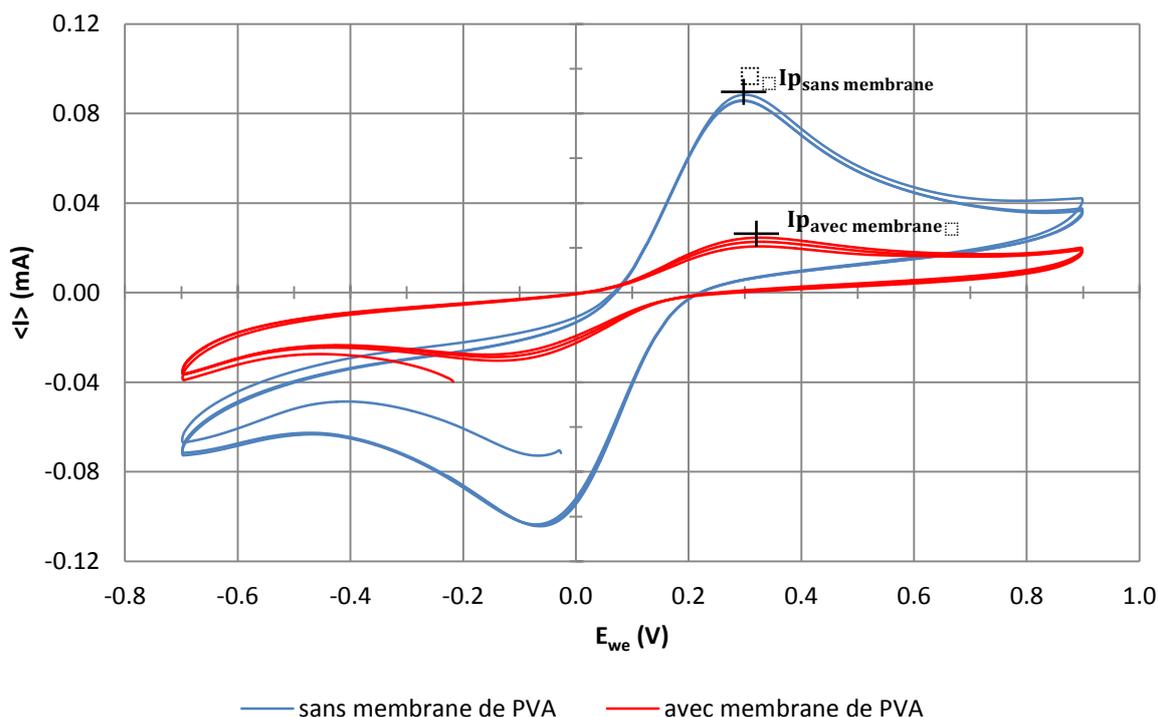


Figure 83: Tracés de voltamétrie cyclique avec (rouge) et sans (bleu) membrane de PVA sur l'électrode (vitesse de balayage du potentiel = 50 mV/s)

La Figure 83 montre les diagrammes de voltampérométrie cyclique obtenus pour l'électrode de carbone vitreux avec (rouge) et sans (bleu) membrane de PVA. Nous pouvons observer sur les deux diagrammes la présence de deux pics : un pic d'oxydation et un autre de réduction, qui correspondent à l'oxydation et à la réduction du ferrocyanure $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$.

Les valeurs des courants en présence de la membrane de PVA diminuent considérablement par rapport à celles sans membrane. En effet, le courant de pic en absence de membrane sur l'électrode est égal à $8,84 \cdot 10^{-2}$ mA ; tandis qu'il est égal à $2,45 \cdot 10^{-2}$ mA lorsqu'une membrane de PVA est placée sur l'électrode. Ainsi, I_p diminue d'un facteur 3,6 en présence de la membrane de PVA, soit le produit $S\sqrt{D}$ diminue d'un facteur 3,6 à cause de l'enrobage de l'électrode.

Ces résultats confirment les résultats obtenus par spectroscopie d'impédance et permettent de supposer que la membrane a probablement le double effet évoqué précédemment : elle doit diminuer la surface disponible de l'électrode et diminuer la diffusion du ferrocyanure jusqu'à l'électrode.

En ce qui nous concerne, les deux molécules d'intérêt pour la diffusion à travers l'enrobage de PVA sont le glucose et l'oxygène. Notons que jusqu'ici nous avons travaillé avec le ferrocyanure dont la taille est plus grande que celle des deux molécules d'intérêt. C'est pourquoi nous avons réalisé des expériences de diffusion en conditions réelles, c'est-à-dire avec une membrane de PVA enrobant une

cathode et une anode (Figure 84). Nous avons ensuite comparé les résultats obtenus avec ceux d'expériences réalisées dans les mêmes conditions mais sans membrane enrobante.

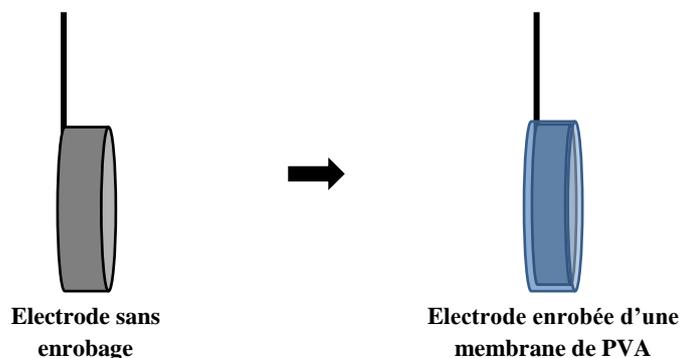


Figure 84: Schéma d'une électrode enrobée d'une membrane de PVA

2. Diffusion de l'oxygène jusqu'à la cathode

Afin d'étudier l'influence d'une membrane enrobante de PVA sur le fonctionnement de la cathode, nous avons réalisé des mesures de chronoampérométrie avec et sans membrane autour d'une même électrode.

La chronoampérométrie consiste à appliquer un potentiel à l'électrode de travail et à mesurer l'intensité en fonction du temps. Pour réaliser ces mesures, nous avons appliqué un potentiel de 300 mV, inférieur au potentiel d'équilibre de la biocathode (égal à 500 mV). Nous nous sommes également placés dans des conditions proches de l'*in vivo*, c'est-à-dire dans une solution tamponnée à pH = 7,4 avec une concentration en NaCl égale à 140 mM.

D'après les deux courbes obtenues (Figure 85), cathode enrobée (rouge) versus cathode libre (bleu), nous remarquons que la présence d'une membrane en PVA diminue le courant cathodique d'un facteur 2. En effet, le courant cathodique stationnaire sans membrane est égal à -0,06 mA ; tandis que celui avec membrane est égal à -0,03 mA. Ce résultat est similaire aux résultats obtenus avec d'autres membranes enrobantes en chitosan ou en nafion.

Cette diminution du courant ne peut être attribuée uniquement à l'effet de blocage de la diffusion dû à la membrane, car nous avons observé que la présence de la membrane enrobante en PVA a une influence sur la forme de la biocathode. En effet, celle-ci a tendance à gonfler après hydratation, ce qui la rend encore plus poreuse. En présence de la membrane de PVA, le gonflement

est limité et la porosité de la pastille n'augmente plus significativement. Ainsi, la porosité et la surface spécifique de la biocathode sont moins importantes, ce qui induit un courant moins important.

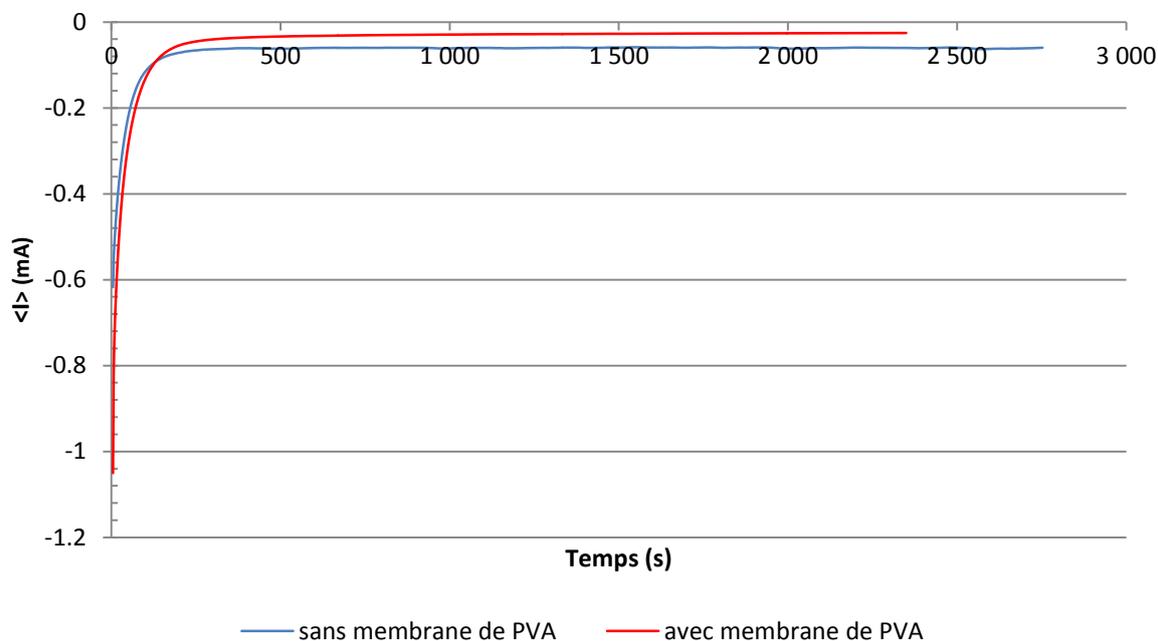


Figure 85: Tracés de chronoampérométrie avec (rouge) et sans (bleu) membrane de PVA sur la cathode ($V = 300 \text{ mV}$)

3. Diffusion du glucose jusqu'à l'anode

De la même manière que précédemment, afin d'étudier l'influence d'une membrane enrobante de PVA sur le fonctionnement de l'anode, nous avons réalisé des mesures de chronoampérométrie avec et sans membrane autour d'une même électrode.

Cette fois-ci, comme il s'agit de mesurer le courant d'oxydation du glucose, nous avons appliqué un potentiel de 0 V qui est supérieur au potentiel d'équilibre de l'anode (égal à -200 mV). Les mesures ont été réalisées dans une solution tamponnée à $\text{pH} = 7,4$ et avec une concentration en glucose égale à 5 mM .

D'après les résultats obtenus (Figure 86), le courant diminue d'un facteur 3 en présence de la membrane de PVA. Le courant anodique stationnaire sans membrane est égale à $0,03 \text{ mA}$; tandis que celui avec membrane est égale à $0,01 \text{ mA}$. La diminution de courant est plus prononcée que dans le cas de la biocathode (réduction d'un facteur 2). Ceci n'est pas surprenant puisque la molécule de

glucose est plus grosse que celle de l'oxygène, l'effet de la membrane sur la diffusion du glucose (à travers et dans la pastille par diminution de la déformation) est donc probablement plus important.

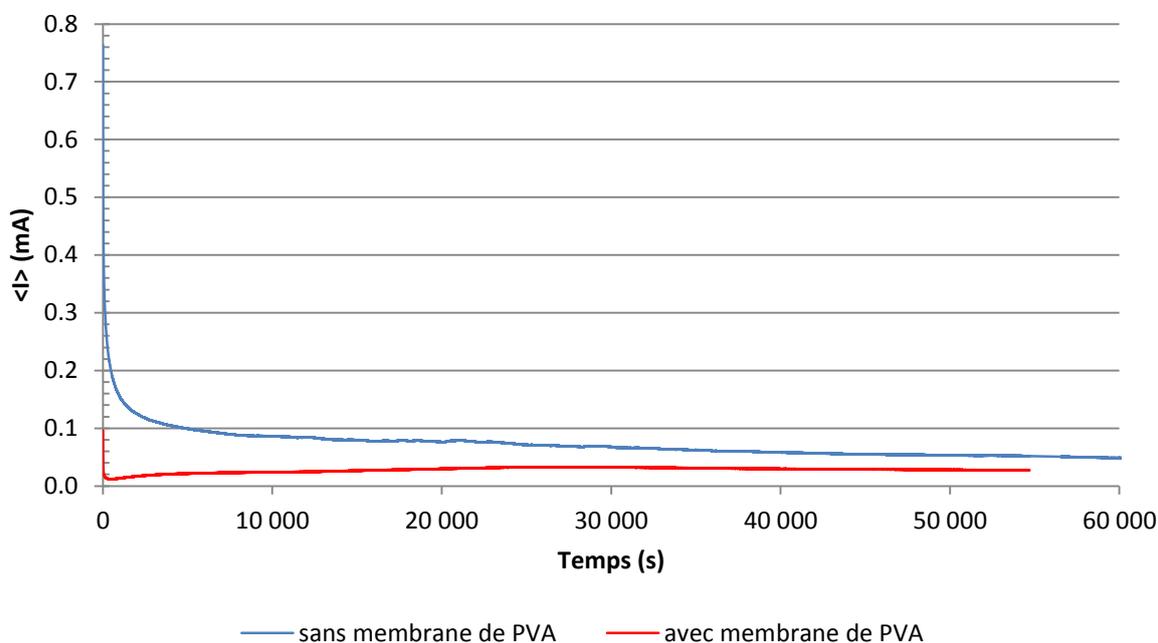


Figure 86: Tracés de chronoampérométrie avec (rouge) et sans (bleu) membrane de PVA sur l'anode ($V = 0$ mV)

En conclusion, bien que la présence d'une membrane de PVA sur la surface des bioélectrodes diminue sensiblement le courant délivré, celle-ci a un effet bénéfique puisqu'elle augmente leur résistance mécanique. Leur manipulation est ainsi facilitée et leur stabilité *in vivo* est augmentée. En complément des mesures réalisées avec la chambre de diffusion, ces expériences ont permis de valider électrochimiquement l'usage du PVA comme enrobage des électrodes de la biopile.

Rappelons ici que le but de cette étude n'était pas de quantifier la performance des bioélectrodes enrobées de PVA en terme de courant délivré, mais plutôt de s'assurer du passage du carburant (glucose) et du comburant (oxygène) à travers la membrane de PVA jusqu'aux enzymes des électrodes. En effet, en plus de la biocompatibilité, la membrane de PVA confère aux électrodes une tenue mécanique considérable sur le long terme, qui permet de lutter contre l'effritement des nanotubes de carbone (Figure 87, Figure 88).



Figure 87: Electrode sans enrobage effritée après hydratation



Figure 88: Electrode enrobée d'une membrane de PVA après hydratation

C. Conclusion

Au cours de cette étude sur la faisabilité de l'enrobage des électrodes de la biopile à glucose par une membrane en PVA, nous avons confirmé et démontré les nombreux atouts de cet hydrogel.

Ses propriétés mécaniques, en particulier sa flexibilité et sa résistance à l'étirement, ont permis de mettre en évidence sa capacité à être mis en forme selon les besoins du système à encapsuler. Le PVA s'adapte à différents modèles géométriques de DMI, tout en leur apportant dans le même temps une tenue mécanique accrue. En outre, la perméabilité des membranes en PVA permet d'enrober des dispositifs symbiotiques implantables en assurant la diffusion des composés de l'organisme jusqu'au cœur du système. Nous avons caractérisé, dans le cas particulier de la biopile, la diffusion du glucose et de l'oxygène à travers une membrane de PVA enrobant une pastille, ce qui conduit à une diminution de la performance des électrodes en fonctionnement, mais qui reste compatible avec l'alimentation de DMI. Cette démonstration fait le lien entre les expériences de diffusion sur membrane test et le fonctionnement purement électrochimique de la pile. C'est en cela une preuve concrète du fonctionnement de la biopile enrobée de PVA et laisse entrevoir un déploiement à plus grand échelle. De plus, la porosité des hydrogels de PVA étant contrôlable par les paramètres du procédé de fabrication, nous pouvons imaginer synthétiser un enrobage sur mesure selon le dispositif symbiotique à encapsuler. Le PVA est donc un matériau extrêmement polyvalent, dont les applications diverses et variées sont encore à explorer.

Pour finir, nous avons mis en évidence une propriété originale et jusqu'alors méconnue des hydrogels de PVA : il s'agit de leur capacité d'auto-cicatrisation. Cette propriété permet de s'affranchir de l'utilisation d'un matériau de collage supplémentaire lors d'une encapsulation. Cette nouvelle caractéristique permet de résoudre un problème inhérent à la biopile à glucose, qui est le scellement de l'enrobage autour du fil électrique. Mais elle permet aussi d'imaginer de nombreuses applications nécessitant d'enfermer un dispositif à l'intérieur d'un « sac » biocompatible et poreux.

Conclusion générale

Le domaine de la santé est aujourd'hui porteur de nombreux projets de recherches visant à augmenter la durée et la qualité de vie des patients. De grands efforts sont notamment fournis pour améliorer la prise en charge des maladies chroniques. Dans ce contexte, des dispositifs médicaux implantables aux multiples fonctions ont vu le jour ou sont en phase de développement.

Parmi eux, certains fonctionnent en parfaite autonomie dans l'organisme hôte. Ils sont isolés du corps grâce à un enrobage biocompatible visant à les rendre inertes et à faciliter leur intégration dans l'organisme. D'autres, au contraire, sont des dispositifs symbiotiques : leur principe de fonctionnement s'appuie sur des échanges perpétuels de molécules avec leur hôte. Ainsi, pour ces DMI, l'enrobage est tout à fait différent et bien plus complexe, puisqu'il doit à la fois favoriser les échanges de matière tout en protégeant simultanément le dispositif des agressions du système immunitaire. C'est sur ce type d'enrobage qu'a porté le travail de recherche décrit dans ce manuscrit, en se concentrant sur l'application particulière qu'est la biopile à glucose.

L'objectif était donc de concevoir une membrane enrobante dans un matériau adéquat, c'est-à-dire souple et robuste, avec une porosité contrôlable, biocompatible mais non biodégradable. Dans ce contexte, les hydrogels d'alcool polyvinylique (Poly(vinyl alcohol) : PVA) polymérisés physiquement par un procédé de congélation/décongélation ont été étudiés. Ce matériau a été sélectionné notamment pour sa structure semi-cristalline intéressante, composée de 3 domaines différents en proportions variables. On retrouve du PVA cristallisé formant des points d'ancrage rigides, du PVA amorphe reliant ces derniers en assurant une certaine élasticité, et de l'eau avec des traces de PVA créant des lacunes et donc des pores. Les proportions de ces trois zones peuvent être modifiées en faisant varier les paramètres de fabrication, ce qui a pour effet de changer les propriétés des hydrogels obtenus.

Ainsi, des hydrogels de PVA fabriqués par ce procédé de congélation/décongélation ont été caractérisés physico-chimiquement afin d'étudier leurs propriétés mécaniques, leur porosité et leur diffusivité, en fonction des paramètres de fabrication que sont le nombre de cycles et la concentration en DMSO. Ces deux paramètres sont déterminants pour la structure finale des hydrogels de PVA.

L'augmentation du nombre de cycles a pour effet d'augmenter la cristallinité des hydrogels de PVA, ce qui entraîne une augmentation de la proportion des points d'ancrage rigides, et donc une augmentation de la résistance à l'étirement. En parallèle, la structure créée par les chaînes de PVA amorphe se rétracte et se compacte. Cela a pour effet de diminuer la capacité de gonflement. Ces deux

phénomènes conjugués conduisent à une diminution de la taille des lacunes d'eau, et donc à une diminution de la porosité des hydrogels (diminution du nombre et/ou de la taille des pores). En contrôlant ces deux caractéristiques (résistance à l'étirement et porosité), on peut s'adapter aux besoins du dispositif à encapsuler. Cela permet notamment de discriminer les éléments qui pourront parvenir jusqu'au dispositif en agissant comme un filtre qui ne laisse passer que les petites molécules.

L'augmentation de la concentration en DMSO utilisée au cours du procédé de fabrication a pour effet d'augmenter et surtout d'accélérer la cristallisation. En effet, pour obtenir les mêmes propriétés mécaniques il faudra réaliser davantage de cycles de congélation/décongélation s'il n'y a pas ou peu de DMSO dans le procédé. Notons que le DMSO est connu pour sa toxicité cellulaire, mais les rinçages abondants réalisés après la fabrication des membranes permettent l'élimination quasi-totale de ce solvant. Il n'y a donc plus de problème de toxicité au moment de l'implantation *in vivo*.

Finalement, en gardant en tête l'objectif de cette étude qui est l'enrobage d'une biopile à glucose, nous avons déterminé le procédé de fabrication qui nous permettait de répondre aux besoins en obtenant une membrane enrobante solide et facile à manipuler, poreuse afin de laisser passer le glucose et l'oxygène de manière optimale jusqu'à l'électrode, et protectrice vis-à-vis des protéines de l'organisme de plus grandes tailles. Ainsi, le procédé de fabrication choisi est celui qui utilise une concentration en DMSO égale à 80%. Ceci nous permet d'assurer de bonnes propriétés mécaniques aux hydrogels de PVA obtenus, quel que soit le nombre de cycles. Ensuite, nous avons fixé le nombre de cycles de congélation/décongélation à 1 puisque cela nous permet déjà d'obtenir un seuil de coupure adapté (entre 10 et 70 kDa) et une bonne diffusion du glucose.

En parallèle de la caractérisation physico-chimique, le travail de recherche a porté sur l'étude de la biocompatibilité du PVA *in vitro* et *in vivo* en se concentrant sur sa toxicité, son influence sur des cellules en culture, et son incorporation par un organisme vivant.

La non-toxicité cellulaire du PVA ainsi que sa relativement bonne intégration dans l'organisme ont été démontrées. En effet, ce matériau n'engendre pas de réaction inflammatoire marquée ni de réaction toxique. De plus, il a une propriété particulièrement intéressante dans le cadre de l'enrobage de la biopile à glucose : les cellules n'ont pas d'affinité marquée pour lui et se multiplient modérément à sa surface. En effet, si les cellules avaient une forte affinité pour les hydrogels de PVA, elles auraient tendance à former rapidement une couche épaisse à leur surface, ce qui empêcherait la diffusion de toute molécule à travers eux et bloquerait le fonctionnement des dispositifs symbiotiques encapsulés.

Néanmoins, en implantation *in vivo* on observe la formation d'une fine capsule de collagène. Il faudrait à présent pouvoir vérifier si cette fine capsule est perméable au glucose ou non. D'autre part, un phénomène d'enroulement de tissus ainsi que des calcifications formées dans l'abdomen des rats implantés ont été observés. Ces résultats pourraient être inquiétants mais sont finalement peu

représentatifs de ce qu'il pourrait se passer en implantant une biopile entière, enrobée de notre membrane, et en mouvement dans l'abdomen.

Pour finir, le travail visant à rendre possible l'utilisation des membranes de PVA comme enrobage des électrodes de la biopile à glucose nous a incités à apporter des modifications au procédé de fabrication des électrodes en elles-mêmes. Un nouveau liant (le polyacrylate de sodium) a donc été utilisé pour obtenir une meilleure tenue mécanique des pastilles, et une connexion du fil électrique au cœur de la pastille a été réalisée. Ainsi, nous avons augmenté la rigidité des pastilles et avons par la même occasion fortement augmenté la surface active échangeuse d'ions des électrodes. Avec ce nouveau modèle de pastille, une encapsulation par une seule et même membrane de PVA a pu être réalisée.

Dans ce contexte, les bonnes propriétés mécaniques du PVA mises en évidence précédemment ont pris tout leur sens. En effet, la grande élasticité des membranes permet de créer une capsule enrobante solide s'adaptant à toutes les géométries possibles de dispositifs implantables. Ce matériau étant également rigide, il améliore la tenue mécanique du dispositif encapsulé et le protège des manipulations éventuelles.

Une nouvelle caractéristique des hydrogels de PVA a également été mise en évidence au cours de ce travail sur l'enrobage des électrodes. Les membranes semi-cristallines obtenues après congélation/décongélation ont la propriété d'être scellées aisément. Il est alors possible de créer une capsule enrobante, d'un seul tenant, scellée autour du fil électrique collecteur d'électrons. Cette propriété originale permet d'imaginer toutes sortes d'enrobages fermés sur eux-mêmes, en évitant les problèmes de fuites.

Après avoir obtenu un enrobage adéquat aux électrodes de la biopile : bicompatible, poreux, solide, scellé et sur mesure ; des mesures électrochimiques ont été réalisées afin d'évaluer les performances du PVA en conditions réelles d'enrobage. Ces expériences ont permis de valider électrochimiquement l'usage du PVA comme enrobage des électrodes de la biopile. De plus, comme expliqué précédemment, l'utilisation de cette capsule enrobante assure une augmentation importante de la tenue mécanique des électrodes, ce qui est un avantage considérable pour leur manipulation et leur utilisation en implantation *in vivo*. En effet, améliorer les propriétés mécaniques des électrodes affecte non seulement leur capacité d'encapsulation, mais également leur stabilité dans le temps.

Cette étude nous a donc permis de mettre en lumière les atouts du PVA en tant qu'enrobage de dispositifs symbiotiques implantables quels qu'ils soient. En effet, ses propriétés structurales modulables sont particulièrement intéressantes pour contrôler les échanges entre un dispositif implanté et l'organisme hôte. En outre, sa grande biocompatibilité le rend d'autant plus attrayant pour de telles applications. Ses propriétés mécaniques lui attribuent des qualités indéniablement recherchées pour

assurer la stabilité de dispositifs implantés ; mais elles lui assurent également une grande polyvalence et une adaptabilité particulièrement intéressante dans le domaine des DMI.

Maintenant que nous connaissons davantage les atouts des hydrogels de PVA et que nous maîtrisons leur procédé de fabrication, des études plus poussées doivent être réalisées concernant l'implantabilité du PVA. De plus, plusieurs applications sont envisagées pour l'avenir.

A court terme, plusieurs études doivent être menées afin de caractériser plus précisément les performances du PVA implanté.

En effet, il faudrait réaliser une étude plus précise du tissu conjonctif qui se développe sur les membranes de PVA implantées *in vivo*. Il faudrait notamment déterminer la porosité de ce tissu, et s'assurer du fait que le glucose et l'oxygène peuvent le traverser. Pour cela, de nouvelles implantations pourraient être réalisées en ne mettant qu'un seul disque de PVA à la fois dans l'abdomen des rats, ou en fixant plusieurs à la paroi abdominale, afin d'éviter que ceux-ci bougent et ne se superposent. Des expériences de diffusion à travers les membranes enrobées de tissu conjonctif pourraient alors être faites en post-explantation.

Pour le cas particulier de la biopile à glucose, une biopile complète enrobée de PVA devrait être implantée afin de s'assurer de son fonctionnement *in vivo* à long terme, mais également afin d'étudier son incorporation dans l'organisme. En effet, les phénomènes d'adhérences observés précédemment et entraînant des enroulements de graisse intra-abdominale doivent être évités. Le design et la taille du dispositif pourraient ensuite être optimisés si besoin.

A plus long terme, les hydrogels de PVA pourraient être utilisés dans bien d'autres applications. Ils pourraient notamment servir d'enrobage pour d'autres dispositifs, mais ils pourraient aussi constituer un dispositif en eux-mêmes.

En effet, les propriétés structurales du PVA permettent d'imaginer de nombreux dispositifs consommateurs ou capteurs de molécules, ou encore des systèmes de filtration. De plus, la grande malléabilité de cet hydrogel ainsi que sa propriété d'auto-cicatrisation nous permet d'imaginer toutes sortes de géométries de dispositifs implantables en résolvant le problème de modélisation et de scellement d'une capsule enrobante.

Par exemple, un projet en cours de développement au sein de notre équipe consiste à créer un dispositif capable de consommer des ressources présentes dans l'intestin et de modifier, par ses produits (ions ou molécules), le biotope des bactéries intestinales (dont l'ensemble représente le « microbiote »). En effet, de multiples études ont mis en évidence le lien entre le microbiote intestinal

et de nombreuses pathologies (obésité, diabète, certains cancers, ...). Un tel dispositif pourrait également produire localement des molécules d'intérêt thérapeutique, telles que l'insuline ou L-Dopa, pour des maladies chroniques telles que le diabète de type 1 ou la maladie de Parkinson.

Dans ce contexte, les hydrogels de PVA décrits dans ce manuscrit pourraient répondre aux besoins de ce dispositif en immobilisant, au sein de leur matrice semi-perméable, des éléments capables d'interagir avec le contenu de la lumière intestinale (enzymes, bactéries, levures, ...). Le choix des enzymes ou des micro-organismes permettra de viser diverses pathologies. Par exemple, disaccharidases et glucose oxydase permettront d'éliminer des glucides. D'autres combinaisons d'enzymes pourraient permettre de s'affranchir de la nécessité d'oxygène. Ainsi, la consommation de l'oxygène, mais aussi la production de protons, vont amener le microbiote à évoluer d'une manière qui pourra être personnalisée selon les patients (par le choix d'enzymes ou de bactéries adaptées à chaque pathologie).

Notons que les maladies chroniques comme le diabète sont un véritable problème de santé public de par leur prévalence dans la population mondiale (plus de 600 millions de patients sont atteints d'un diabète de type 2 à travers le monde), et par le coût des soins et traitements de la maladie, comme de ses complications. Le dispositif décrit précédemment, par ailleurs considérablement moins agressif que des thérapeutiques classiques comme la chirurgie baryatrique très mutilante, serait une approche thérapeutique radicalement nouvelle.

Bibliographie

- [1] H. Lamraoui, Conception d'un système d'occlusion urétrale actif implantable pour le traitement de l'incontinence urinaire sévère, 2010.
- [2] H. Lamraoui, A. Bonvilain, G. Robain, H. Combrisson, S. Basrour, A. Moreau-Gaudry et P. Cinquin, «Development of a Novel Artificial Urinary Sphincter: A Versatile Automated Device,» *IEEE-ASME Transactions on Mechatronics*, vol. 15, n° 6, pp. 916-924, Décembre 2010.
- [3] M. P. L. H. B. A. R. G. Cinquin P, «Dispositif de prévention des fuites urinaires». France Brevet FR0757159, 2007.
- [4] C.-H. M. Y.-T. N. Kil-Wan Jan, «Pompe a insuline». Brevet WO2004084976 A1, 2004.
- [5] G. Forlenza, B. Buckingham et D. Maahs, «Progress in Diabetes Technology: Developments in Insulin Pumps, Continuous Glucose Monitors, and Progress towards the Artificial Pancreas,» *Journal of Pediatrics*, vol. 169, pp. 13-20, Février 2016.
- [6] Y. Joung, « Development of Implantable Medical Devices: From an Engineering Perspective,» *International Neurology Journal*, vol. 17, n° 3, pp. 98-106, Septembre 2013.
- [7] P. Cinquin, C. Gondran, F. Giroud, S. Mazabrard, A. Pellissier, F. Boucher, J. Alcaraz, K. Gorgy, F. Lenouvel, S. Mathe, P. Porcu et S. Cosnier, « A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats,» *Plos One*, vol. 5, n° 5, Mai 2010.
- [8] A. Zebda, C. Gondran, A. Le Goff, M. Holzinger, P. Cinquin et S. Cosnier, «Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes,» *Nature Communications*, vol. 2, n° 370, Juin 2011.
- [9] A. Zebda, S. Cosnier, J. Alcaraz, M. Holzinger, A. Le Goff, C. Gondran, F. Boucher, F. Giroud, K. Gorgy, H. Lamraoui et P. Cinquin, «Single Glucose Biofuel Cells Implanted in Rats Power Electronic Devices,» *Scientific Reports*, vol. 3, n° 1516, Mars 2013.
- [10] D. Hayes et S. Furman, «Cardiac pacing: How it started, where we are, where we are going,» *PACE - Pacing and Clinical Electrophysiology*, vol. 27, n° 5, pp. 693-704, Mai 2004.
- [11] R. Elmgvist, J. Landegren, S. Petterson, A. Senning et G. William-Olsson, «Artificial pacemaker for treatment of Adams-Stokes syndrome and slow heart rate,» *American Heart Journal*, vol. 65, n° 6, pp. 731-748, Juin 1963.

- [12] J. Sperzel, H. Burri, D. Gras, F. Tjong, R. Knops, G. Hindricks, C. Steinwender et P. Defaye, «State of the art of leadless pacing,» *Europace*, vol. 17, n° 10, pp. 1508-1513, Octobre 2015.
- [13] P. Mitcheson, E. Yeatman, G. Rao, A. Holmes et T. Green, «Energy harvesting from human and machine motion for wireless electronic devices,» *Proceedings of the IEEE*, vol. 96, n° 9, pp. 1457-1486, Septembre 2008.
- [14] V. Leonov, T. Torfs, P. Fiorini et C. Van Hoof, «Thermoelectric converters of human warmth for self-powered wireless sensor nodes,» *IEEE Sensors Journal*, vol. 7, n° 5, pp. 650-656, Mai 2007.
- [15] C. Watkins, B. Shen et R. Venkatasubramanian, «Low-grade-heat energy harvesting using superlattice thermoelectrics for applications in implantable medical devices and sensors,» chez *Proceedings of the 24th International Conference on Thermoelectronics (ICT 2005)*, Clemson, SC, USA, 2005.
- [16] R. Sarpeshkar, C. Salthouse, J.-J. Sit, M. Baker, S. Zhak, T.-T. Lu, L. Turicchia et S. Balster, «An ultra-low-power programmable analog bionic ear processor,» *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 52, n° 4, pp. 711-727, Avril 2005.
- [17] M. Baker et R. Sarpeshkar, «Feedback analysis and design of RF power links for low-power bionic systems,» *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, vol. 1, n° 1, pp. 28-38, Mars 2007.
- [18] S. Barton, J. Gallaway et P. Atanassov, «Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices,» *Chemical Reviews*, vol. 104, n° 10, pp. 4867-4886, Octobre 2004.
- [19] S. Minteer, P. Atanassov, H. Luckarift et G. Johnson, «New materials for biological fuel cells,» *Materialstoday*, vol. 15, n° 4, pp. 166-173, Avril 2012.
- [20] M. Moehlenbrock et S. Minteer, «Extended lifetime biofuel cells,» *Chemical Society Reviews*, vol. 37, n° 6, pp. 1188-1196, Février 2008.
- [21] J. Kim, J. Parkey, C. Rhodes et A. Gonzalez-Martin, «Development of a biofuel cell using glucose-oxidase- and bilirubin-oxidase-based electrodes,» *Journal of Solid State Electrochemistry*, vol. 13, n° 7, pp. 1043-1050, Juillet 2009.
- [22] M. Scherer et R. Fischer, «Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*,» *FEMS Microbiology Letters*, vol. 199, n° 2, pp. 207-213, Mai 2001.
- [23] M. D. C. P. Z. A. El Ichi S, «Réacteurs implantables biocompatibles». Brevet 14/52534, 2014.
- [24] S. El Ichi, A. Zebda, A. Laaroussi, N. Reverdy-Bruas, D. Chaussy, M. Belgacem, P. Cinquin et D. Martin, «Chitosan improves stability of carbon nanotube biocathodes for glucose biofuel cells,» *Chemical Communications*, vol. 50, n° 93, pp. 14535-14538, 2014.
- [25] D. Williams et E. S. f. Biomaterials, *Definitions in biomaterials : proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials*, vol. 4, Chester: Elsevier, 1986.

- [26] H. Johnson, S. Northup, P. Seagraves, M. Atallah, P. Garvin, L. Lin et T. Darby, «Biocompatibility test procedures for Materials evaluation in vitro - 2. Objective methods of toxicity assessment,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 19, n° 5, pp. 489-508, 1985.
- [27] M. Spector, C. Cease et T. XIA, «The local tissue-response to Biomaterials,» *Critical Reviews in Biocompatibility*, vol. 5, n° 3, pp. 269-295, 1989.
- [28] D. Coleman, R. King et J. Andrade, «Foreign-body reaction. Chronic Inflammatory Response,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 8, n° 5, pp. 199-211, 1974.
- [29] J. Anderson et K. Miller, «Biomaterial biocompatibility and the macrophage,» *Biomaterials*, vol. 5, n° 1, pp. 5-10, 1984.
- [30] S. Kizilel, M. Garfinkel et E. Opara, «The bioartificial pancreas: progress and challenges.,» *Diabetes technology & therapeutics*, vol. 7, n° 6, pp. 968-85, Décembre 2005.
- [31] T. Young, N. Yao, R. Chang et L. Chen, « Evaluation of asymmetric poly(vinyl alcohol) membranes for use in artificial islets,» *Biomaterials*, vol. 17, n° 22, pp. 2139-2145, Novembre 1996.
- [32] Y. Teramura, Y. Kaneda et H. Iwata, «Islet-encapsulation in ultra-thin layer-by-layer membranes of poly(vinyl alcohol) anchored to poly(ethylene glycol)-lipids in the cell membrane,» *Biomaterials*, vol. 28, n° 32, pp. 4818-4825, Novembre 2007.
- [33] H. Miyashita, S. Shimmura, H. Kobayashi, T. Taguchi, N. Asano-Kato, Y. Uchino, M. Kato, J. Shimazaki, J. Tanaka et K. Tsubota, «Collagen-immobilized poly(vinyl alcohol) as an artificial cornea scaffold that supports a stratified corneal epithelium,» *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, vol. 76B, n° 1, pp. 56-63, Janvier 2006.
- [34] Y. Uchino, S. Shimmura, H. Miyashita, T. Taguchi, H. Kobayashi, J. Shimazaki, J. Tanaka et K. Tsubota, «Amniotic membrane immobilized poly(vinyl alcohol) hybrid polymer as an artificial cornea scaffold that supports a stratified and differentiated corneal epithelium,» *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, vol. 81B, n° 1, pp. 201-206, Avril 2007.
- [35] F. Xu, Y. Li, Y. Deng et J. Xiong, «Porous nano-hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol) composite hydrogel as artificial cornea fringe: characterization and evaluation in vitro,» *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, vol. 19, n° 4, pp. 431-439, 2008.
- [36] F. Xu, Y. Li, X. Wang, J. Wei et A. Yang, «Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol) hydrogel biocomposite,» *Journal of Materials Science*, vol. 39, n° 18, pp. 5669-5672, Septembre 2004.
- [37] M. Schuettler, C. Henle, J. Ordonez, G. Suaning, N. Lovell et T. Stieglitz, «Patterning of silicone rubber for micro-electrode array fabrication,» chez *3rd International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering*, 2007.

- [38] T. Stieglitz, W. Huang, S. Chen, J. Morley, N. Lovell et G. Suaning, «A Transparent Electrode Array for Simultaneous Cortical Potential Recording and Intrinsic Signal Optical Imaging,» chez *International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, 2010.
- [39] J. Cordeiro, C. Henle, M. Raab, W. Meier, T. Stieglitz, A. Schulze-Bonhage et J. Rickert, «Micromanufactured electrodes for cortical field potential recording: in vivo study,» chez *4th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering*, 2009.
- [40] S. Rebscher, M. Heilmann, W. Bruszewski, N. Talbot, R. Snyder et M. Merzenich, «Strategies to improve electrode positioning and safety in cochlear implants,» *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 46, n° 3, pp. 340-352, Mars 1999.
- [41] J. Anderson, N. Ziats, A. Azeez, M. Brunstedt, S. Stack et T. Bonfield, «Protein adsorption and macrophage activation on polydimethylsiloxane and silicone rubber,» *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, vol. 7, n° 2, pp. 159-169, 1995.
- [42] B. Slaughter, S. Khurshid, O. Fisher, A. Khademhosseini et N. Peppas, «Hydrogels in regenerative medicine,» *Advanced materials*, vol. 21, n° 32-33, pp. 3307-3329, Septembre 2009.
- [43] D. Kim, J. Wiler, D. Anderson, D. Kipke et D. Martin, «Conducting polymers on hydrogel-coated neural electrode provide sensitive neural recordings in auditory cortex,» *Acta Biomaterialia*, vol. 6, n° 1, pp. 57-62, Janvier 2010.
- [44] R. Zdrahala et I. Zdrahala, «Biomedical applications of polyurethanes: A review of past promises, present realities, and a vibrant future,» *Journal of biomaterials applications*, vol. 14, n° 1, pp. 67-90, Juillet 1999.
- [45] N. Peppas, J. Hilt, A. Khademhosseini et R. Langer, «Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology,» *Advanced materials*, vol. 18, n° 11, pp. 1345-1360, Juin 2006.
- [46] M. Jeschke, V. Hermanutz, S. Wolf et G. Koveker, «Polyurethane vascular prostheses decreases neointimal formation compared with expanded polytetrafluoroethylene,» *Journal of Vascular Surgery*, vol. 29, n° 1, pp. 168-176, Janvier 1999.
- [47] S. Guelcher, «Biodegradable polyurethanes: synthesis and applications in regenerative medicine,» *Tissue Engineering*, 2008.
- [48] S. Corneillie, P. Lan, E. Schacht, M. Davies, A. Shard, R. Green, S. Denyer, M. Wassall, H. Whitfield et S. Choong, «Polyethylene glycol-containing polyurethanes for biomedical applications,» *Polymer International*, vol. 46, n° 3, pp. 251-259, Juillet 1998.
- [49] L. Rao, H. Zhou, T. Li, C. Li et Y. Duan, «Polyethylene glycol-containing polyurethane hydrogel coatings for improving the biocompatibility of neural electrodes,» *Acta Biomaterialia*, vol. 8, n° 6, pp. 2233-2242, Juillet 2012.

- [50] C. Lin et K. Anseth, « PEG Hydrogels for the Controlled Release of Biomolecules in Regenerative Medicine,» *Pharmaceutical Research*, vol. 26, n° 3, pp. 631-643, Mars 2009.
- [51] D. Park, W. Wu et Y. Wang, « A functionalizable reverse thermal gel based on a polyurethane/PEG block copolymer,» *Biomaterials*, vol. 32, n° 3, pp. 777-786, Janvier 2011.
- [52] Y. Lu, D. Wang, T. Li, X. Zhao, Y. Cao, H. Yang et Y. Duan, «Poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) hydrogel coatings for improving electrode-neural tissue interface,» *Biomaterials*, vol. 30, n° 25, pp. 4143-4151, Septembre 2009.
- [53] K. Lee et D. Mooney, «Hydrogels for tissue engineering,» *Chemical Reviews*, vol. 101, n° 7, pp. 1869-1879, Juillet 2001.
- [54] D. Mawad, P. Martens, R. Odell et L. Poole-Warren, «The effect of redox polymerisation on degradation and cell responses to poly (vinyl alcohol) hydrogels,» *Biomaterials*, vol. 28, n° 6, pp. 947-955, Février 2007.
- [55] J. Choi, H. Bodugoz-Senturk, H. Kung, A. Malhi et O. Muratoglu, « Effects of solvent dehydration on creep resistance of poly(vinyl alcohol) hydrogel,» *Biomaterials*, vol. 28, n° 5, pp. 772-780, Février 2007.
- [56] Y. Yue, K. Xu, X. Liu, Q. Chen, X. Sheng et P. Wang, « Preparation and characterization of interpenetration polymer network films based on poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) for drug delivery,» *Journal of applied polymer science*, vol. 108, n° 6, pp. 3836-3842, Juin 2008.
- [57] E. De Giglio, S. Cometa, N. Cioffi, L. Torsi et L. Sabbatini, «Analytical investigations of poly(acrylic acid) coatings electrodeposited on titanium-based implants: a versatile approach to biocompatibility enhancement,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 389, n° 7-8, pp. 2055-2063, Décembre 2007.
- [58] J. Dai, Z. Bao, L. Sun, S. Hong, G. Baker et M. Bruening, «High-capacity binding of proteins by poly(acrylic acid) brushes and their derivatives,» *Langmuir*, vol. 22, n° 9, pp. 4274-4281, Avril 2006.
- [59] M. Changez, V. Koul, B. Krishna, A. Dinda et V. Choudhary, « Studies on biodegradation and release of gentamicin sulphate from interpenetrating network hydrogels based on poly(acrylic acid) and gelatin: in vitro and in vivo,» *Biomaterials*, vol. 25, n° 1, pp. 139-146, Janvier 2004.
- [60] W. Mullen, F. Keedy, S. Churchouse et P. Vadgama, «Glucose enzyme electrode with extended linearity; application to undiluted blood measurements,» *Analytica Chimica Acta*, vol. 183, pp. 59-66, Mai 1986.
- [61] L. Tang, Z. Koochaki et P. Vadgama, «Composite liquid membrane for enzyme electrode construction,» *Analytica Chimica Acta*, vol. 232, n° 2, pp. 357-365, Mai 1990.
- [62] S. Higson et P. Vadgama, «Diamond-like carbon coated microporous polycarbonate as a composite barrier for a glucose enzyme electrode,» *Analytica Chimica Acta*, vol. 271, n° 1, pp. 125-133, Janvier 1993.

- [63] I. Christie, P. Treloar et P. Vadgama, «Plasticized poly(vinyl chloride) as a permselective barrier membrane for high-selectivity amperometric sensors and biosensors,» *Analytica Chimica Acta*, vol. 269, n° 1, pp. 65-73, Novembre 1992.
- [64] A. Sharkawy, B. Klitzman, G. Truskey et W. Reichert, «Engineering the tissue which encapsulates subcutaneous implants .1. Diffusion properties,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 37, n° 3, pp. 401-412, Décembre 1997.
- [65] N. Wisniewski et M. Reichert, «Methods for reducing biosensor membrane biofouling,» *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, vol. 18, n° 3-4, pp. 197-219, Octobre 2000.
- [66] M. Gerritsen, J. Jansen et J. Lutterman, «Performance of subcutaneously implanted glucose sensors for continuous monitoring,» *Netherlands Journal of Medicine*, vol. 54, n° 4, pp. 167-179, Avril 1999.
- [67] K. Pal, A. Banthia et D. Majumdar, «Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications,» *Designed Monomers and Polymers*, vol. 12, n° 3, pp. 197-220, 2009.
- [68] S. A.-A. a. G. O. P. Syed K. H. Gulrez, *Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications, Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications.*, P. A. Carpi, Éd., 2011.
- [69] C. Hassan et N. Peppas, Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods - *Advances in Polymer Science*, vol. 153, 2000, pp. 37-65.
- [70] C. Bunn, «Crystal Structure of Polyvinyl Alcohol,» *Nature*, vol. 161, n° 4102, pp. 929-930, Février 1948.
- [71] L. Mandelke, «Effect of molecular weight on crystallization and melting of long-chain molecules,» *Journal of Polymer Science Part C - Polymer Symposium*, n° 18PC, pp. 51-&, 1967.
- [72] N. Peppas, «Turbidimetric studies of aqueous Poly(vinyl alcohol) solutions,» *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 176, n° 11, pp. 3433-3440, 1975.
- [73] F. Yokoyama, I. Masada, K. Shimamura, T. Ikawa et K. Monobe, «Morphology and structure of highly elastic Poly(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting,» *Colloid and Polymer Science*, vol. 264, n° 7, pp. 595-601, Juillet 1986.
- [74] S. Hyon et Y. Ikada, «Porous and transparent Poly(vinyl alcohol) gel and Method of manufacturing the same». Brevet 4,663,358, Mai 1987.
- [75] S. Hyon, W. Cha et Y. Ikada, «Preparation of transparent Poly(vinyl alcohol) hydrogel,» *Polymer Bulletin*, vol. 22, n° 2, pp. 119-122, Août 1989.
- [76] H. Trieu et S. Qutubuddin, «Poly(vinyl alcohol) hydrogels: 2. Effects of processing parameters on structure and properties,» *Polymer*, vol. 36, n° 13, pp. 2531-2539, Juin 1995.

- [77] S. Stauffer et N. Peppas, «Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing,» *Polymer*, vol. 33, n° 18, pp. 3932-3936, 1992.
- [78] N. Peppas et J. Scott, «Controlled release from Poly(vinyl alcohol) gels prepared by freezing-thawing processes,» *Journal of controlled release*, vol. 18, n° 2, pp. 95-100, Février 1992.
- [79] J. Stasko, M. Kalnins, A. Dzene et V. Tupureina, «Poly(vinyl alcohol) hydrogels,» *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, vol. 58, n° 1, pp. 63-66, 2009.
- [80] A. Hickey et N. Peppas, «Mesh size and diffusive characteristics of semicrystalline Poly(vinyl alcohol) membranes prepared by freezing-thawing techniques,» *Journal of Membrane Science*, vol. 107, n° 3, pp. 229-237, Novembre 1995.
- [81] N. Peppas et N. Mongia, «Ultrapure poly(vinyl alcohol) hydrogels with mucoadhesive drug delivery characteristics,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 43, n° 1, pp. 51-58, Janvier 1997.
- [82] G. Paradossi, F. Cavalieri, E. Chiessi, C. Spagnoli et M. Cowman, « Poly(vinyl alcohol) as versatile biomaterial for potential biomedical applications,» *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, vol. 14, n° 8, pp. 687-691, Août 2003.
- [83] S. Woerly, G. Plant et A. Harvey, «Neural tissue engineering: From polymer to biohybrid organs,» *Biomaterials*, vol. 17, n° 3, pp. 301-310, Février 1996.
- [84] C. Nuttelman, D. Mortisen, S. Henry et K. Anseth, «Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 57, n° 2, pp. 217-223, Novembre 2001.
- [85] K. Chu et B. Rutt, «Polyvinyl alcohol cryogel: An ideal phantom material for MR studies of arterial flow and elasticity,» *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 37, n° 2, pp. 314-319, Février 1997.
- [86] H. Jiang, G. Campbell, D. Boughner, W. Wan et M. Quantz, « Design and manufacture of a polyvinyl alcohol (PVA) cryogel tri-leaflet heart valve prosthesis,» *Medical Engineering and Physics*, vol. 26, n° 4, pp. 269-277, Mai 2004.
- [87] S. Vijayasekaran, J. Fitton, C. Hicks, T. Chirila, G. Crawford et I. Constable, «Cell viability and inflammatory response in hydrogel sponges implanted in the rabbit cornea,» *Biomaterials*, vol. 19, n° 24, pp. 2255-2267, Décembre 1998.
- [88] J. Stammen, S. Williams, D. Ku et R. Guldberg, « Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconfined compression,» *Biomaterials*, vol. 22, n° 8, pp. 799-806, Avril 2001.
- [89] J. Bray et E. Merrill, «Poly(vinyl alcohol) hydrogels for synthetic articular-cartilage material,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 7, n° 5, pp. 431-443, 1973.
- [90] Y. Teramura, Y. Kaneda et H. Iwata, «Islet-encapsulation in ultra-thin layer-by-layer membranes of poly(vinyl alcohol) anchored to poly(ethylene glycol)-lipids in the cell

- membrane,» *Biomaterials*, vol. 28, n° 32, pp. 4818-4825, Novembre 2007.
- [91] T. Chanthasopeephan, J. Desai et A. Lau, « Modeling soft-tissue deformation prior to cutting for surgical simulation: Finite element analysis and study of cutting parameters,» *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 54, n° 3, pp. 349-359, Mars 2007.
- [92] I. Mano, H. Goshima, M. Nambu et M. Iio, «New Polivinyal-alcohol gel material for MRI Phantoms,» *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 3, n° 6, pp. 921-926, Décembre 1986.
- [93] D. Gobbi et T. Peters, «Generalized 3D nonlinear transformations for medical imaging: an object-oriented implementation in VTK,» *Computerized Medical Imaging and Graphics*, vol. 27, n° 4, pp. 255-265, 2003.
- [94] O. Ebralima et D. Paul, «Hydraulic permeation of liquids through swollen polymeric networks .1.Polyvinyl alcohol water,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 19, n° 5, pp. 1381-1386, 1975.
- [95] A. Stoica-Guzun, M. Stroescu, I. Jipa, L. Dobre et T. Zaharescu, «Effect of gamma irradiation on poly(vinyl alcohol) and bacterial cellulose composites used as packaging materials,» *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 84, pp. 200-204, Mars 2013.
- [96] S. Gupta, T. Webster et A. Sinha, «Evolution of PVA gels prepared without crosslinking agents as a cell adhesive surface,» *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, vol. 22, n° 7, pp. 1763-1772, Juillet 2011.
- [97] J. Wasikiewicz, N. Roohpour, D. Paul, M. Grahn, D. Ateh, I. Rehman et P. Vadgama, «Polymeric barrier membranes for device packaging, diffusive control and biocompatibility,» *Applied Surface Science*, vol. 255, n° 2, pp. 340-343, Novembre 2008.
- [98] S. Praveen, R. Hanumantha, J. Belovich et B. Davis, «Novel hyaluronic acid coating for potential use in glucose sensor design.,» *Diabetes technology & therapeutics*, vol. 5, n° 3, pp. 393-9, 2003.
- [99] O. Ariga, T. Kubo et Y. Sano, «Effective diffusivity of glucose in PVA hydrogel,» *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 78, n° 2, pp. 200-201, 1994.
- [100] D. Axelrod, D. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson et W. Webb, «Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics,» *Biophysical Journal*, vol. 16, n° 9, p. 1055–1069, Septembre 1976.
- [101] D. Soumpasis, «Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments,» *Biophysical Journal*, vol. 41, n° 1, pp. 95-97, Janvier 1983.
- [102] M. Yitzhak, *The Properties of Solvents*, vol. 4, John Wiley & Sons Ltd, 1999, p. 239.
- [103] P. Ramires et E. Milella, «Biocompatibility of poly(vinyl alcohol)-hyaluronic acid and poly(vinyl alcohol)-gellan membranes crosslinked by glutaraldehyde vapors,» *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 13, n° 1, pp. 119-123, Janvier 2002.

- [104] I. Marei, A. Chester, I. Carubelli, T. Prodromakis, T. Trantidou et M. Yacoub, « Assessment of Parylene C Thin Films for Heart Valve Tissue Engineering,» *Tissue Engineering Part A*, vol. 21, n° 19-20, pp. 2504-2514, Octobre 2015.
- [105] P. Zhuang, Y. Li, L. Fan, J. Lin et Q. Hu, « Modification of chitosan membrane with poly(vinyl alcohol) and biocompatibility evaluation,» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 50, n° 3, pp. 658-663, Avril 2012.
- [106] B. Duan et M. Wang, «Customized Ca-P/PHBV nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering: design, fabrication, surface modification and sustained release of growth factor,» *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 7, n° 5, pp. S615-S629, Octobre 2010.
- [107] S. Vanstroebiezen, F. Everaerts, L. Janssen et R. Tacken, «Diffusion coefficients of oxygen, hydrogen peroxide and glucose in a hydrogel,» *Analytica Chimica Acta*, vol. 273, n° 1-2, pp. 553-560, Février 1993.
- [108] J. Cuq, «Biochimie des Protéines,» Polytech'Montpellier-Université Montpellier 2 Sciences et Techniques, 2006.
- [109] M. Kikuchi, Y. Koyama, T. Yamada, Y. Imamura, T. Okada, N. Shirahama, K. Akita, K. Takakuda et J. Tanaka, «Development of guided bone regeneration membrane composed of beta-tricalcium phosphate and poly (L-lactide-co-glycolide-epsilon-caprolactone) composites,» *Biomaterials*, vol. 25, n° 28, pp. 5979-5986, Décembre 2004.
- [110] S. Subramanian, A. Mitchell, W. Yu, S. Snyder, K. Uhrich et J. O'Connor, «Salicylic Acid-Based Polymers for Guided Bone Regeneration Using Bone Morphogenetic Protein-2,» *Tissue Engineering Part A*, vol. 21, n° 13-14, pp. 2013-2024, Juillet 2015.
- [111] Y. Zhang, Z. Yang, X. Guo et P. Xu, «A new method for inducing bone tissue regeneration: Negative pressure membrane technology,» *Medical Hypotheses*, vol. 73, n° 6, pp. 906-909, Décembre 2009.
- [112] V. Guarino, F. Causa, P. Taddei, M. di Foggia, G. Ciapetti, D. Martini, C. Fagnano, N. Baldini et L. Ambrosio, «Polylactic acid fibre-reinforced polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering,» *Biomaterials*, vol. 29, n° 27, pp. 3662-3670, Septembre 2008.
- [113] K. Ochi, G. Chen, T. Ushida et e. al, «Use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified poly-DL-lactic-Co-glycolic acid (PLGA)-collagen sponge,» *Journal of Cellular Physiology*, vol. 194, n° 1, pp. 45-53, Janvier 2003.
- [114] N. Vrana, Y. Liu, G. McGuinness et P. Cahill, « Characterization of poly(vinyl alcohol)/chitosan hydrogels as vascular tissue engineering scaffolds,» *Macromolecular Symposia*, vol. 269, pp. 106-110, 2008.

