UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR STRASBOURG

Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur
Strasbourg I

Discipline : Chimie Physique

par Grégory Francius

Détermination des propriétés viscoélastiques de films multicouches de polyélectrolytes par sonde colloïdale au microscope de force atomique

Soutenue publiquement le 05 octobre 2006

Membres du Jury

Pr Michel Nardin, Université de Haute Alsace, Mulhouse	Rapporteur externe
Pr Jean-François Stoltz, Université Henri Poincaré, Nancy	Rapporteur externe
Pr Gero Decher, Université Louis Pasteur, Strasbourg	Rapporteur interne
Pr Catherine Picart, Université de Montpellier II, Montpellier	Examinateur
Dr Pierre Nassoy, Institut Pierre & Marie Curie, Paris	Examinateur
Dr Joseph Hemmerlé, INSERM U595, Strasbourg	Directeur de Thèse
Dr Bernard Senger, INSERM U595, Strasbourg	Membre invité

A mon Père,

A ma Mère,

A ma Sœur : Nathalie,

A mes Frères : Rony, Mickaël et Cédric,

A ma Tante : Maryse

A mes cousins : Cynthia, Yohan, Arnold…

A toute ma famille au sens Antillais du terme

A mes collègues et à mes amis

TABLE DES MATIERES

Remerciements VIII

Index X

Liste des figures XI
Liste des tableaux XV

Introduction générale 1

Chapitre 1 : Rappels et support théorique 8
1.1 Les films multicouches de polyélectrolytes 11
1.1.1 Historique des films multicouches 11
1.1.2 Propriétés physico-chimiques 14
1.1.3 Mode de croissance des films multicouches 17
1.1.4 Applications dans le domaine des biomatériaux 21

1.2 Principes de la microscopie à force atomique 23
1.2.1 Description de la microscopie à force atomique 23
1.2.2 Les différents modes d'utilisation de la microscopie à force atomique 25
1.2.3 La spectroscopie de force 28
1.2.4 Application dans le domaine des biomatériaux 29

1.3 Théories élastiques et viscoélastiques 34
1.3.1 Théories des matériaux élastiques 34
1.3.2 Théories des matériaux viscoélastiques 40

Chapitre 2 : Matériels et méthodes 48
2.1 Matériels et préparations 51
2.1.1 Les polyélectrolytes utilisés 51
2.1.2 Construction des films 53

2.2 Spectroscopie de force 56
2.2.1 Description de la technique de nanoindentation 56
2.2.2 Protocole expérimental 61
2.2.3 Acquisition et traitement des données 69
2.2.4 Imageries par AFM 73

2.3 Spectroscopie infrarouge 76
2.3.1 Principes de base 76
2.3.2 Description de la technique 78
2.3.3 Traitement du signal et protocole expérimental 80

2.4 Microbalance à cristal de quartz 91
2.4.1 Principe de la mesure 91
2.4.2 Protocole expérimental 101

2.5 Ellipsométrie 105
2.5.1 Description de l'appareil 105
2.5.2 Principe de la mesure et protocole expérimental 107

2.6 Analyses biologiques 110
2.6.1 Culture cellulaire des chondrosarcomes 110
2.6.2 Observations au microscope 110
2.6.3 Comptage au bleu de trypan 111

Chapitre 3 : Caractérisation de films multicouches mono-domaines 113
3.1 Etude de films natifs mono-domaines 117
3.1.1 Elasticité de films à croissance linéaire 117
3.1.2 Elasticité de films à croissance exponentielle 120
3.2 Effet de la réticulation sur l'élasticité 125
3.2.1 Réticulation des films (PLL/HA) 125
3.2.2 Effet de la réticulation sur le système (PLL/HA) 127
3.2.3 Applications biologiques 132

3.3 Conclusion 137
3.3.1 Contrôle des propriétés mécaniques 137
3.3.2 Modulation de l'adhésion cellulaire 137

Chapitre 4 : Caractérisation de films bi-domaines 140
4.1 Etude de l'architecture $(PLL/HA)_{24}$–$(PSS/PAH)_n$–PSS 144
4.1.1 Construction du système et étude par spectroscopie infrarouge 144
4.1.2 Détermination du module de Young 146
4.1.3 Evolution de l'élasticité en fonction du nombre de couches déposées 147
4.1.4 Applications biologiques 150

4.2 Etude de la construction $(PLL/HA)_{24}$–$(PLL/PGA^{sucre})_6$ 155
4.2.1 Construction du système 155
4.2.2 Evolution du module de Young en fonction de la nature du sucre 156
4.2.3 Applications biologiques 158

4.3 Conclusion 163
4.3.1 Propriétés physico-chimiques et mécaniques 163
4.3.2 Contrôle de la réponse cellulaire 164

Chapitre 5 : Modélisation viscoélastique 167
5.1 Rappels sur le formalisme 171

5.2 Exemples de modélisations pour $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_8$-PSS 172
5.2.1 Modélisation par un ressort et une unité de Kelvin en série 172
5.2.2 Modélisation par un ressort et deux unités de Kelvin en série 174
5.2.3 Modélisation par un ressort, une unité de Kelvin et un piston en série 176
5.2.4 Modélisation par un ressort, deux unités de Kelvin et un piston en série 178
5.3 Modélisation viscoélastique des films $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$-PSS 181
5.3.1 Représentation des films par le modèle (RK_2P) 181
5.3.2 Analyse des courbes de force mesurées sur le film $(PSS/PAH)_{210}$-PSS 182

5.4 Conclusion 183

Chapitre 6 : Caractérisation de films à base de mélanges de polyanions 187

6.1 Etude des films par QCM-D et analyse morphologique 192

6.1.1 Construction des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$ 192

6.1.2 Evolution de l'épaisseur des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$ 194

6.2 Etude de la composition chimique et des propriétés mécaniques 197

6.2.1 Etude de la composition des films par spectroscopie infrarouge 197

6.2.2 Etude des propriétés mécaniques 202

6.3 Conclusion 204

6.3.1 Compétition entre HA et PSS 204

6.3.2 Propriétés mécaniques 205

Conclusion générale 210

Perspectives 215

Références Bibliographiques 216

Liste des publications 240

Article 1 241

Article 2 250

Article 3 258

Article 4 266

Annexe 1 (chapitre 3) 273

Annexe 2 (chapitre 4) 285

Annexe 3 (chapitre 6) 288

Remerciements

Mes travaux ont été effectués au sein de l'Unité 595 de l'INSERM à Strasbourg, spécialisée dans le domaine des processus biophysiques et biologiques aux interfaces. Je tiens avant tout à remercier très sincèrement Monsieur le Docteur Jean-Claude Voegel, Directeur du laboratoire, de m'avoir accueilli dans sa structure de recherches.

D'autre part, je tiens à témoigner toute ma gratitude à la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg pour m'avoir rémunéré durant les trois années de préparation de ma thèse, et en particulier à Monsieur le Professeur Youssef Haïkel, Doyen de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg, pour sa confiance.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à Madame Catherine Picart, Professeur à l'Université de Montpellier, pour m'avoir accueilli et m'avoir mis le pied à l'étrier du monde de la recherche. Je remercie très vivement Monsieur Joseph Hemmerlé, Ingénieur de recherche à l'INSERM, pour m'avoir formé aux techniques de l'AFM et pour m'avoir guidé avec une grande disponibilité et étroitement encadré durant ces trois années. J'adresse ma profonde gratitude à Monsieur le Docteur Bernard Senger, Directeur de recherche à l'INSERM, pour ses compétences qu'il partage avec une patience remarquable et sa direction avisée. Je les remercie tous de leur confiance ainsi que pour leurs encouragements qui ont été un très bon stimulant durant les moments difficiles.

Je suis également très sensible à l'honneur que me font les membres du Jury en acceptant de juger ma thèse. Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Monsieur Michel Nardin, Professeur à l'Université de Haute Alsace (Mulhouse), Monsieur Jean-François Stoltz, Professeur à l'Université Henri Poincaré (Nancy), et Monsieur Gero Decher, Professeur à l'Université Louis Pasteur (Strasbourg), d'avoir accepté d'intervenir en tant que rapporteurs de ce travail. J'adresse toute ma reconnaissance à Madame Catherine Picart, Professeur à l'Université de Montpellier, et Monsieur Pierre Nassoy, Chargé de recherche à l'Institut Pierre et Marie Curie (Université Paris VI), qui se sont joints à ce jury en tant qu'examinateurs.

Cette étude est l'aboutissement d'un travail d'équipe. Aussi, je souhaite remercier tous les intervenants et notamment ceux qui m'ont encouragé et soutenu durant la réalisation de ce travail. Je voudrais citer en particulier Messieurs Pierre Schaaf, Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg et chercheur à l'Institut Charles Sadron, et Vincent Ball, Professeur à l'Université Louis Pasteur, pour les discussions scientifiques critiques et

constructives qui ont beaucoup apporté à l'approfondissement de mon sujet et leurs encouragements amicaux. Je tiens à nouveau à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur Joseph Hemmerlé pour m'avoir formé à l'AFM, pour sa disponibilité, son soutien indéfectible et ses encouragements. Mes pensées et mes remerciements vont aussi à Madame Aurore Schneider pour nos collaborations fructueuses et pour m'avoir initié à la biologie, et à Messieurs Dominique Vautier, Philippe Lavalle et Constant Vodouhê pour leur collaboration à mon travail, leur aide précieuse, leurs conseils, les corrections apportées lors de la rédaction de ce manuscrit et avant tout pour m'avoir formé à diverses techniques. Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur Jacques Ohayon, Professeur à l'Université de Grenoble, pour son aide précieuse dans le domaine de la mécanique et de la modélisation des systèmes viscoélastiques ainsi que pour sa collaboration à mon travail.

Un grand Merci à tous mes collègues et amis, en particulier Eric Hübsch pour m'avoir initié à la spectroscopie infrarouge et pour nos longues discussions, Laurent Jourdainne pour son savoir faire en informatique, ses bons conseils et ses encouragements, Youri Arntz pour son aide, ses conseils techniques précieux en AFM, Erell Le Guen pour sa gentillesse et nos discussions, ainsi que Adnane Nait Lechguer pour ses conseils et nos délires…

Je remercie enfin l'ensemble du personnel de l'Unité 595, et en particulier Damien Mertz, Nadia Ladhari, Nicolas Laugel, Christine Affolter, Cosette Betscha, Géraldine Koenig, Maria Dimitrova, Sandra Werner, Juan Mendez, Florent Meyer, Dmitri Volodkin, Joëlle Ogier, Stéphanie Mathé, René Elkaïm, Claudine Porcel, Sabine Muller, Christiane Bouthier, François Clauss, Eric Mathieu, Hervé Lesot, Sabine Kuchler-Bopp, Yves Cam, Jean-Jacques Fluck et Armelle Chassepot pour l'ambiance exceptionnelle qui règne au laboratoire ainsi que pour les moments sympathiques partagés à l'intérieur comme en dehors de l'Unité.

Index

AFM	Microscope à Force Atomique	ATR	Atténuation totale de Réflexion
a	Rayon de contact	CHI	Chitosan
C_P	Constante de la céramique piézoélectrique	HA	Hyaluronate de sodium
C_d	Constante du photodétecteur	PAH	Poly hydrochlorure d'allylamine
f_D	Fonction de Dimitriadis	PGA	Poly acide glutamique
E_0	Module de Young	PLL	Poly-L-lysine
E	Module élastique	PSS	Poly-4-styrène sulfonate
η	Viscosité	NHS	N-hydroxysuccinimide
d	Déplacement du microlevier	sulfo-NHS	N-hydroxysulfosuccinimide
δ	Indentation	EDC	Hydrochlorure de N, N-(3-diméthylaminopropyl)-N-carbodimide
F	Force appliquée	TRIS	Tris (hydroxyaminométhane)
$g(\delta)$	Fonction de correction	NaCl	Chlorure de Sodium
h	Epaisseur de l'échantillon	HCl	Acide Chlorhydrique
K	Constante de raideur	NaOH	Hydroxyde de Sodium
k_B	Constante de Boltzmann	SDS	Dodecyle Sulfate de Sodium
k_C	Constante de raideur du cantilever	QCM-D	Microbalance à Cristal de Quartz en mode Dissipation
ν	Coefficient de Poisson	IRTF	Infrarouge à Transformée de Fourier
R	Rayon de la sonde	z	Déplacement de l'actuateur piézoélectrique
T	Température de Kelvin	PDADMAC	Chlorure d'ammonium de polydiallyldiméthyle
w	Distance caractéristique	PAA	Poly acide acrylique
$\langle z^2 \rangle$	Fluctuations moyenne au carré	CLSM	Microscopie Confocale à guidage Laser

Liste des figures

Figure 1.1.1-1 Méthode de Langmuir-Blodgett. 11
Figure 1.1.1-2 Principe du dépôt LBL. 12
Figure 1.1.1-3 Méthode de dépôt par "Spin-coating". 13
Figure 1.1.2-1 Interactions susceptibles d'influencer les propriétés des films multicouches. . 16
Figure 1.1.3-1 Modes de croissance des films multicouches. 17
Figure 1.1.3-2 Modèle à trois zones. 18
Figure 1.1.3-3 Modèle de diffusion des films à croissance exponentielle. 20
Figure 1.2.1-1 Principe de fonctionnement de l'AFM. 24
Figure 1.2.2-1 Courbe d'interaction pointe-surface. 25
Figure 1.2.2-2 Mode contact : Topographie de surface en 2 et 3 dimensions. 26
Figure 1.2.2-3 Mode contact (image par FFM). 27
Figure 1.2.2-4 Mode contact et contact intermittent. 27
Figure 1.2.3-1 Exemples de courbes de force durant un cycle approche/retrait. 28
Figure 1.2.4-1 Forces de rupture de molécules adsorbées sur une pointe d'AFM. 30
Figure 1.2.4-2 Immunocytochimie par AFM. 31
Figure 1.2.4-3 Fibres de collagène II marquées par immunogold[121]. 32
Figure 1.2.4-4 Schéma de principe d'un IT-AFM. 32
Figure 1.3.1-1 Déformation d'un matériau sous l'action d'une distribution de pression. 35
Figure 1.3.1-2 Contact mécanique entre un film d'épaisseur finie et une sphère dure. 39
Figure 1.3.2-1 Modèle viscoélastique (élément de Zener). 43
Figure 1.3.2-2 Modèle viscoélastique (unité de Kelvin). 44
Figure 1.3.2-3 Système viscoélastique représenté par un train de *N* unités de Kelvin. 45
Figure 2.1.2-1 Construction d'un film multicouche par trempage. 54
Figure 2.1.2-2 Automatisation de la construction des films (Dipping Robot DR3). 55
Figure 2.1.2-3 Construction des films par nébulisation. 55
Figure 2.2.1-1 Schéma de principe de la technique de nanoindentation. 57
Figure 2.2.1-2 Mouvements possibles de la céramique piézoélectrique. 58
Figure 2.2.1-3 Traitement d'une courbe de force 59
Figure 2.2.2-1 Observation microscopique d'une bille collée à l'extrémité d'un cantilever... 62
Figure 2.2.2-2 Spectre thermique d'un cantilever avant et après collage d'une bille de SiO_2. 62
Figure 2.2.2-3 Spectre fréquentiel des fluctuations thermiques d'un cantilever dans l'air..... 65

Figure 2.2.2-4 Détermination de la constante caractéristique des cantilevers. 66
Figure 2.2.2-5 Variation de la constante de conversion de la céramique piézoélectrique. 67
Figure 2.2.2-6 Reproductibilité de l'équation de la céramique piézoélectrique. 68
Figure 2.2.3-1 Photographie montrant les éléments constitutifs de l'IT-AFM. 70
Figure 2.2.3-2 Visualisation sous « Windaq » d'une expérience d'AFM mode « force ». 71
Figure 2.2.3-3 Copie d'écran soulignant les éléments de gestion du programme de traitement des courbes de force. 72
Figure 2.2.3-4 Copie d'écran montrant le réglage des paramètres du traitement. 72
Figure 2.2.4-1 Schéma d'une microplaquette ("chip") comportant 6 cantilevers 74
Figure 2.2.4-2 AFM commercial 75
Figure 2.3.2-1 Schéma de principe d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier. . 78
Figure 2.3.3-1 Spectres infrarouge d'un film multicouche de polyélectrolytes. 82
Figure 2.3.3-2 Trajet optique (en rouge) à travers le cristal de ZnSe et représentation du profil de l'onde évanescente (en bleu). 83
Figure 2.3.3-3 Photographie du spectromètre FTIR (IFS 55 Bruker). 88
Figure 2.3.3-4 Exemple de décomposition spectrale réalisée avec le logiciel OPUS 5.5 89
Figure 2.3.3-5 Résultat final d'une analyse des spectres d'un film multicouche $(PLL/HA)_n$ .. 90
Figure 2.4.1-1 Cristal de QCM-D phographié de face et représenté en coupe. 91
Figure 2.4.1-2 Schéma de principe de la mesure. 92
Figure 2.4.2-1 Photographie d'une QCM-D. 102
Figure 2.4.2-2 Capture d'écran de l'acquisition d'une expérience de QCM-D. 102
Figure 2.4.2-3 Evolution des paramètres $-\Delta f_v$ et ΔD_v au cours de la construction d'un film . 103
Figure 2.4.2-4 Capture d'écran montrant le programme de traitement des données 103
Figure 2.4.2-5 Résultats issus du traitement des données. 104
Figure 2.4.2-1 Schéma de principe de la technique d'ellipsométrie. 105
Figure 2.5.1-1 Schéma de principe de l'ellipsomètre utilisé dans cette étude. 106
Figure 2.5.2-1 Schéma de montage de l'ellipsomètre à extinction. 109
Figure 3.1.1-1 Coupe transversale d'un film $(PSS/PAH)_{210}$-PSS imagé par AFM 118
Figure 3.1.1-2 Courbe de force enregistrée à 10 nm/s. 118
Figure 3.1.1-3 Courbes de force obtenues en fonction de la vitesse d'approche. 119
Figure 3.1.1-4 Modules de Young obtenus en fonction de la vitesse d'approche. 119
Figure 3.1.2-1 Croissances de (PLL/PSS) et (PLL/HA) mesurées par QCM-D. 120
Figure 3.1.2-2 Films multicouches observés par microscopie confocale. 121
Figure 3.1.2-3 Courbes de force des films à croissance exponentielle. 121

Figure 3.1.2-4 Evolution du module de Young en fonction de la vitesse d'approche. 122
Figure 3.1.2-5 Correction de la courbe modélisée par la fonction $g(\delta)$. 123
Figure 3.2.1-1 Réactions au cours de la réticulation chimique d'un film (PLL/HA). 126
Figure 3.2.1-2 Consommation de l'EDC durant le processus de réticulation. 127
Figure 3.2.2-1 Amélioration de la modélisation par la fonction $g(\delta)$..... 129
Figure 3.2.2-2 Domaine de validité des modèles utilisés..... 130
Figure 3.2.2-3 Evolution de l'élasticité en fonction de la vitesse d'approche pour six taux de réticulation..... 131
Figure 3.2.2-4 Variation de l'élasticité en fonction du taux de réticulation..... 132
Figure 3.2.3-1 Observation par microscopie photonique de l'étalement des cellules..... 134
Figure 3.2.3-2 Viabilité cellulaire des HCS 2/8 à 1 et 5 jours. 135
Figure 3.2.3-3 Corrélation entre le module de Young et l'étalement des cellules HCS 2/8.. 135
Figure 3.3.2-1 Evolution de la rugosité et de l'angle de contact des films réticulés en fonction de la concentration en EDC de la solution de réticulation. 138
Figure 4.1.1-1 Observation par microscopie confocale des films bi-domaines. 144
Figure 4.1.1-2 Spectre infrarouge de $(PLL/HA)_{24}$ - $(PSS/PAH)_n$- PSS. 145
Figure 4.1.1-3 Proportion de PSS dans le film..... 145
Figure 4.1.2-1 Variations du module de Young des films bi-domaines. 146
Figure 4.1.3-1 Evolution du module de Young en fonction du nombre de dépôts. 147
Figure 4.1.3-2 Modélisation de Chen & Engel pour un système élastique à trois couches. .. 148
Figure 4.1.4-1 Mesure de viabilité des cellules HT29 sans paclitaxel. 152
Figure 4.1.4-2 Module de Young des films $(PLL/HA)_n$-$(PSS/PAH)_i$-PSS. 152
Figure 4.1.4-3 Mesure de viabilité des cellules HT29 avec paclitaxel (Taxol™)..... 153
Figure 4.2.1-1 Greffage du mannose sur le PGA par glycosylation. 155
Figure 4.2.2-1 Module de Young des films $(PLL/HA)_{24}$- $(PLL/X)_6$..... 157
Figure 4.2.2-2 Evolution du module de Young en fonction de la $2^{ème}$ strate. 158
Figure 4.2.3-1 Observation par microscopie photonique de chondrosarcomes et de chondrocytes..... 160
Figure 4.2.3-2 Facteurs de forme à 4h et 48h des chondrosarcomes et chondrocytes. 161
Figure 4.2.3-3 Viabilité cellulaire à 4h et 48h des chondrosarcomes et chondrocytes 161
Figure 4.3.1-1 Variations du module de Young pour $(PLL/HA)_{24}$-$(X/Y)_6$. 163
Figure 5.2.1-1 Représentation des modules et du temps de retard en fonction de la vitesse d'approche pour le modèle RK_1. 173

Figure 5.2.2-1 Représentation des modules et des temps de retard en fonction de la vitesse d'approche pour le modèle RK_2. 175
Figure 5.2.3-1 Représentation des modules et du temps de retard en fonction de la vitesse d'approche pour le modèle RK_1P. 177
Figure 5.2.4-1 Représentation des modules et des temps de retard en fonction de la vitesse d'approche pour le modèle RK_2P. 179
Figure 5.2.4-2 Evolution du module de Young équivalent E_{eq} suivant le modèle 180
Figure 5.4 -1 Représentation du module de Young en fonction de *n* 183
Figure 5.4 -2 Représentation du module de Young en échelle logarithmique. 184
Figure 6.1.1-1 Evolution des épaisseurs des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$. 193
Figure 6.1.2-1 Images topographiques (AFM) des régions des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{12}$ rainurées. 194
Figure 6.1.2-2 Variations de l'épaisseur des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{12}$. 195
Figure 6.1.2-3 Variations de l'épaisseur des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{12}$ et du film (PLL/PSS) à concentration en PSS variable. 196
Figure 6.2.1-1 Spectres infrarouge de solutions de PSS à différentes concentrations massiques. 197
Figure 6.2.1-2 Courbe d'étalonnage pour le HA (1600 cm^{-1}) et pour le PSS (1035 cm^{-1}). ... 198
Figure 6.2.1-3 Spectre infrarouge d'un film $(PLL/[HA_{0,95}/PSS_{0,05}])_{18}$ au cours de sa construction. 199
Figure 6.2.1-4 Evolution de l'absorbance des différents polyélectrolytes en fonction du nombre de dépôts pendant la construction du film $(PLL/[HA_{0,95}/PSS_{0,05}])_{18}$. 200
Figure 6.2.1-5 Diagramme de phase des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{12}$. 201
Figure 6.2.2-1 Modules élastiques des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{24}$ 202
Figure 6.2.2-2 Variation du module de Young des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{24}$ en fonction de la fraction massique du HA en solution. 203
Figure 6.3.1-1 Zones de prédominance des polyanions et relation avec la variation de l'épaisseur des films pour des films comprenant 12 paires de couches. 204
Figure 6.3.2-1 Corrélation entre le module de Young et la composition des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{24}$ 205

Liste des tableaux

Tableau 2.1.1-1 Polyélectrolytes commerciaux dégradables 51
Tableau 2.1.1-2 Polyélectrolytes synthétisés par la faculté de pharmacologie ou fournis par Sigma 52
Tableau 2.1.1-3 Polyélectrolytes commerciaux non dégradables 53
Tableau 2.2.2-1 Matériels utilisés pour le collage des billes 63
Tableau 2.2.2-2 Liste des cantilevers utilisés 64
Tableau 2.2.2-3 Constantes de raideur mesurées 66
Tableau 2.2.4-1 Caractéristiques techniques des cantilevers utilisés 75
Tableau 2.3.1-1 Modes d'élongation et de déformation des molécules 77
Tableau 2.3.3-1 : Représentation semi développée de la structure des acides aminés, de la lysine et de son homopolypeptide, la poly-L-lysine. 86
Tableau 2.3.3-2. Position du maximum des bandes de vibration des polyélectrolytes utilisés pour la construction des films (PLL/[HA_x/PSS $_{1-x}$])$_n$. 87
Tableau 3.1.2-1 Tableau récapitulatif des caractéristiques des films étudiés 124
Tableau 3.2.2-1 Modules de Young calculés à partir des deux modélisations 128
Tableau 5.3.1-1 Evolution du module E_{eq} en fonction du nombre n de dépôt (PSS/PAH) ... 182
Tableau 6.1.1-1 Concentrations des polyélectrolytes en solution 192
Tableau 6.2.1-1 Valeurs des coefficients d'extinction moléculaire des polyanions utilisés dans cette étude 199

Introduction générale

Introduction générale

Il est connu depuis une dizaine d'années que les cellules biologiques sont sensibles à la dureté du matériau sur lequel elles ont été déposées[1-4]. Les premiers travaux incitaient à penser que l'adhésion cellulaire était d'autant meilleure que la rigidité du support était plus grande. Cependant, même si cette règle n'est pas aussi générale que l'on ne l'escomptait[5], la caractérisation mécanique d'un substrat est un élément à prendre en compte dans l'interprétation du comportement d'une cellule au contact d'un matériau, au même titre que sa nature chimique ou sa rugosité[6]. Pour illustrer le rôle de la rigidité du substrat, on peut rappeler la migration spontanée de cellules de type myoblastes d'une région molle vers une région plus dure du substrat (gel de polyacrylamide), dénommée "mécanotaxie" ou "durotaxie", mais aussi que la différenciation des myoblastes est favorisée par une valeur optimale et non maximale de la dureté du support[7].≤

Dans le cadre du développement de prothèses, il est primordial de proposer un matériau biocompatible. Il est donc nécessaire de contrôler à la fois leurs fonctions chimiques de surface et leur dureté qui conditionneront leur intégration dans le milieu biologique vivant où elles seront implantées. Un moyen *a priori* commode de satisfaire ces deux conditions est de recouvrir le substrat d'un film non toxique pour les cellules, voire fonctionnalisé par insertion de molécules actives dans ce film. De plus, il est souhaitable de conférer au couple matériau-film les propriétés mécaniques optimales pour favoriser le contact tissu biologique-prothèse.

Depuis leur apparition au cours des années 1990[8-10], les films multicouches de polyélectrolytes se sont révélés des revêtements particulièrement simples d'utilisation pour recouvrir les matériaux les plus divers quelle que soit leur forme. Ces films sont obtenus par dépôt alterné d'un polycation et d'un polyanion sur la surface à recouvrir. Bien que le présent mémoire de thèse ne porte pas sur la construction des films multicouches de polyélectrolytes mais y fera largement référence, il peut être utile de rappeler que deux types de films ont été identifiés: les films dits "linéaires" et les films dits "supralinéaires" ou "exponentiels". Dans le premier cas, l'épaisseur du film formé par alternance du polycation et du polyanion croît linéairement avec le nombre de paires de couches déposées. Les films construits à partir d'hydrochlorure de polyallylamine (PAH) et du poly-4-styrène sulfonate de sodium (PSS) présentent cette caractéristique pour un taux de sel modéré des solutions de polyélectrolytes[11]. Dans le deuxième cas, l'épaisseur du film formé par exposition alternée au polycation et au

polyanion croît exponentiellement avec le nombre de paires de couches déposées[12-15], du moins jusqu'à un certain stade de la construction où se produit la transition du régime de croissance exponentielle au régime de croissance linéaire[16-18]. La croissance exponentielle de l'épaisseur peut s'expliquer par la diffusion d'au moins l'un des deux polyélectrolytes dans le film et hors du film[19]. Un film à croissance initiale exponentielle est obtenu par exemple en exposant le substrat à recouvrir alternativement à une solution de poly-L-lysine (PLL) et à une solution d'acide hyaluronique (HA). La technique de dépôt "couche par couche" ou "LBL" ("layer by layer") permet de fabriquer des films de compositions et d'épaisseurs variées. Ils présentent un large éventail de propriétés physico-chimiques et mécaniques, donc d'applications potentielles en particulier dans le domaine biomédical (recouvrement de prothèses déjà évoqué, recouvrement antimicrobien de cathéters). L'Unité 595 de l'INSERM travaille depuis de nombreuses années sur l'élaboration de films multicouches à partir de polyélectrolytes synthétiques, mais aussi de polysaccharides et de polypeptides, des composants dégradables qui peuvent servir de substrats « biomimétiques »[20-30]. D'autres applications ont été envisagées dans les domaines de la filtration[31], de la production de papier[32] ou la conservation des végétaux[33].

Le but général des travaux exposés dans ce mémoire était de contribuer à la mise au point de films fonctionnalisés aux propriétés contrôlées en termes de biocompatibilité et de viscoélasticité. L'évolution de mes recherches au cours des trois années consacrées à la préparation de ma thèse m'a conduit à m'intéresser principalement à la caractérisation mécanique de films multicouches de polyélectrolytes en environnement aqueux[34, 35]. Ce dernier point est important car le séchage des films modifie très sensiblement leur dureté[36, 37]. A cette fin, nous avons utilisé la méthode de la sonde colloïdale portée par le cantilever d'un microscope de force atomique construit dans l'Unité avec le soutien financier de l'INSERM (contrat APEX 99-13)[38-40]. L'enregistrement de la position de la sonde (sphérique dans cette étude) en fonction de la position de l'échantillon analysé et de sa vitesse d'approche, commandée par une céramique piézoélectrique, permet en principe de déterminer les caractéristiques viscoélastiques quantitatives (module de Young et temps de retard) de films micrométriques en vue de les relier au comportement de cellules déposées sur ces mêmes films. Toutefois, l'obtention de ces paramètres requiert un traitement très attentif des données expérimentales "brutes" qui sera détaillé plus loin. Mentionnons cependant quelques points clés de la démarche. L'indentation est déduite des positions de l'échantillon et de la sonde, ce qui nécessite le repérage aussi précis que possible de l'instant où la sonde entre en contact

avec l'échantillon. Pour obtenir la force appliquée à l'échantillon par l'ensemble sonde-cantilever, il faut calibrer le cantilever, c'est-à-dire mesurer sa constante de raideur. De la relation force-indentation expérimentale on ne peut déduire un paramètre caractérisant le matériau sondé qu'à la condition d'adopter un modèle décrivant cette relation à partir de la forme géométrique de l'indenteur et d'hypothèses sur les propriétés viscoélastiques du matériau examiné[41-44]. Le cas le plus simple est celui d'un matériau purement élastique. La loi théorique la plus connue lui correspondant est celle issue des travaux de Hertz[45]. D'autres descriptions de l'indentation d'un milieu élastique seront présentées[46-48] permettant de traiter différentes géométries de l'indenteur ainsi que de tenir compte de l'effet du substrat dur (verre par exemple)[49] sur lequel sont construits les films[23]. Le passage de la solution du problème élastique à la solution du problème viscoélastique sera décrit[50-54]en vue de l'exploitation plus approfondie des données expérimentales. On n'envisagera ici que des modèles linéaires composés d'éléments élastiques et d'éléments visqueux dont les caractéristiques ne varient pas avec la déformation du matériau sondé. On traitera plus précisément l'association en série de plusieurs unités de Kelvin, chacune formée d'un ressort (branche élastique) et d'un piston (branche visqueuse) en parallèle.

Sur le travail réalisé principalement par AFM opérant en mode force se sont greffées diverses autres méthodes de caractérisation des propriétés physico-chimiques des films. Dans le cadre de mes travaux, j'ai eu recours à la spectroscopie infrarouge, à la microscopie confocale ainsi qu'à la microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation. La spectroscopie infrarouge nous a permis la caractérisation quantitative des constituants chimiques des films. Nous avons fait appel à la microscopie confocale afin d'imager nos échantillons par plans longitudinaux et par coupes transversales. La microbalance à cristal de quartz a été mise en œuvre pour suivre la cinétique de construction des films et pour déterminer le type de croissance en épaisseur (linéaire ou exponentielle). La microscopie à force atomique en mode image a été également utilisée pour visualiser la topographie de la surface des films avec une précision de l'ordre du nanomètre.

En ce qui concerne le travail à l'AFM (mode force) proprement dit, nous avons mis l'accent sur la détermination des propriétés viscoélastiques de différents types de films que nous convenons d'appeler "mono-domaines" ou "bi-domaines". Le cas des films mono-domaines sera illustré par un film (PLL/HA), d'abord examiné dans son état natif, puis réticulé pour en augmenter la dureté. Il est important de souligner que les mesures d'indentation ont été effectuées à des vitesses d'approche s'étendant sur deux à trois ordres de grandeur. Cette façon de procéder permet de mettre en évidence que le module de Young

(apparent) est sensible à la vitesse d'approche, d'autant plus que celle-ci est élevée[55]. Il ressort de cette étude que le module croît à mesure que la concentration en agent réticulant augmente pour atteindre un plateau qui correspond à la saturation de tous les sites de réticulation disponibles sur les chaînes de HA et de PLL[34]. Cette étude généralise donc une étude précédente[56] à la fois du point de vue de la gamme de concentration de l'agent réticulant et surtout du point de vue dynamique du système qui ne peut pas être assimilé, en général, à un matériau élastique, quelle que soit la vitesse de sondage. Elle a également étayé une étude du comportement de cellules de type chondrosarcome HCS-2/8 déposées sur les mêmes films que ceux que nous avons examiné par AFM et d'établir une corrélation entre le facteur de forme, la viabilité cellulaire et le module de Young[35].

Une étude comparable a été entreprise sur les films bi-domaines obtenus en déposant n bicouches (PSS/PAH) ($n \geq 0$) sur une fondation de 24 bicouches (PLL/HA) et en terminant la deuxième partie de la construction toujours par le dépôt d'une couche de PSS supplémentaire pour former en superficie du film une couche de charge électrostatique négative comme celle de la sonde. Ce travail a été entrepris en vue d'élaborer une voie de construction de films à rigidité modulable sans l'intervention d'un agent réticulant qui pourrait se révéler délétère pour les cellules biologiques. Dans la même perspective, nous avons testé des films construits par exposition alternée à une solution de PLL et une solution polyanionique contenant HA et PSS en proportions variables. Toutefois, cette alternative n'a pas été approfondie du point de vue de la mesure des courbes de force par faute de temps. L'analyse des courbes de force correspondant aux films $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$-PSS, pour n croissant de 0 à 24, montre sans ambiguïté une augmentation de la rigidité du film à vitesse d'approche fixée. Cependant, comme dans le cas du film mono-domaine évoqué ci-dessus, le module de Young dépend de la vitesse d'approche et ne constitue donc qu'une caractérisation partielle du matériau. Par conséquent, nous avons élaboré un modèle basé sur une représentation du matériau sous la forme d'un ensemble d'unités de Kelvin en série pour lequel la fonction de fluage est aisée à formuler[52, 57]. Cette approche permet de rendre compte pour un film donné des courbes de force, correspondant à un domaine de vitesse d'approche couvrant environ trois ordres de grandeur et d'en extraire le module de Young statique ainsi qu'un spectre des temps de retard (temps caractéristiques de déformation du matériau soumis à une contrainte). Dans le cas de films où l'adhésion entre la sonde et le matériau joue un rôle important (films de poly(diméthyle siloxane)), l'influence de la masse moléculaire des chaînes de polymères sur le module de relaxation (ou de façon équivalente sur la fonction de fluage) et sur les temps de retard a pu être mise en évidence et s'apparente à l'effet d'une réticulation[58]. Notons encore

que si la déformation est imposée au lieu de la contrainte, l'analyse de la relaxation du matériau donne accès au spectre des temps de relaxation[59].

Le mémoire est organisé de la manière suivante : A la suite des rappels bibliographiques relatifs aux biomatériaux ainsi qu'à une introduction à la spectroscopie de force par microscopie de force atomique et ses applications dans le domaine des biomatériaux, l'accent sera mis sur la technique de nanoindentation. On présentera également des approches théoriques de l'élasticité et de la viscoélasticité (chapitre 1). On trouvera au chapitre 2 les protocoles de préparation des solutions de polyélectrolytes et de construction des films. Ce chapitre passera également en revue les éléments essentiels des différentes techniques de caractérisation mises en œuvre dans ce travail de recherche (AFM en modes force et image, spectroscopie infrarouge, microbalance à cristal de quartz et ellipsométrie). Enfin, on y décrira succinctement la culture des cellules, les observations au microscope optique et le test de viabilité des cellules déposées sur les films. Au chapitre 3, on s'intéressera à l'élasticité de films multicouches de polyélectrolytes construits à partir d'une seule espèce de polycation et d'une seule espèce de polyanion (films "mono-domaines"). On examinera d'abord le cas de films natifs à croissance linéaire et à croissance exponentielle. On abordera ensuite l'effet de la réticulation chimique à différentes concentrations de l'agent réticulant sur le module de Young d'un film (PLL/HA). Egalement, dans le but de transformer un film mou en un film plus rigide, nous y exposerons l'étude de l'effet du dépôt en quantité croissante de PSS et PAH sur le module de Young d'un film (PLL/HA) natif (films "bi-domaines"). Une étude similaire a été menée sur l'effet du dépôt d'une couche d'acide polyglutamique, sur lequel a été greffé soit du mannose soit du lactose (chapitre 4). Par ailleurs, un modèle viscoélastique basé sur un montage en série de N éléments de Kelvin (un ressort E_i, monté en parallèle avec un piston η_i) a été développé afin mieux modéliser les propriétés mécaniques des films bi-domaines. Cette modélisation a permis d'établir le spectre des temps caractéristiques des films et a mis en évidence que ceux-ci présentent un comportement viscoélastique caractéristique d'au moins 2 éléments de kelvin montés en série (chapitre 5). Enfin, une autre voie avait été envisagée, consistant à associer un polycation (PLL) à un mélange de polyanions (HA et PSS) pour moduler l'élasticité du film. Les films construits suivant cette méthode n'ont pas fait l'objet d'une analyse approfondie de leurs propriétés viscoélastiques. Par contre, nous avons mis en évidence par ellipsométrie une évolution non monotone de leur épaisseur en fonction de la teneur relative en HA (ou en PSS) dans le mélange polyanionique. Cette observation a été complétée par une analyse de la composition du film par spectrométrie infrarouge (chapitre 6). Une conclusion générale et des

perspectives de poursuite du travail entrepris dans le cadre de cette thèse seront proposées pour clore le corps du mémoire. Nous donnerons les équations et algorithmes de calculs utilisés pour le traitement des données dans un appendice et les courbes de forces recueillies à l'AFM, les spectres infrarouges et les données obtenues à l'aide de la microbalance à cristal de quartz dans les annexes.

Chapitre 1 : Rappels et support théorique

Rappels et support théorique

1.1 Les films multicouches de polyélectrolytes 11

1.1.1 Historique des films multicouches..... 11

1.1.2 Propriétés physico-chimiques 14

1.1.3 Mode de croissance des films multicouches..... 17

1.1.4 Applications dans le domaine des biomatériaux..... 21

1.2 Principes de la microscopie à force atomique..... 23

1.2.1 Description de la microscopie à force atomique 23

1.2.2 Les différents modes de la microscopie à force atomique 25

1.2.3 La spectroscopie de force..... 28

1.2.4 Application dans le domaine des biomatériaux 29

1.3 Théories élastiques et viscoélastiques 34

1.3.1 Théories des matériaux élastiques 34

1.3.2 Théories des matériaux viscoélastiques 40

L'intérêt grandissant porté aux multicouches de polyélectrolyte est à l'origine de la multiplication rapide des connaissances sur le sujet. L'étendue des connaissances actuelles, ne nous permet pas dréssé ici un catalogue exhaustif de tous les travaux menés dans ce domaine. Cependant, à travers de chapitre bibliographique, nous avons dans une première partie, mis en valeur les études importantes puis souligné les principales propriétés et applications effectives ou potentielles dans le domaine des biomatériaux.

Dans la seconde partie de ce chapitre, nous avons présenté d'un point de vue théorique puis expérimental le microscope à force atomique (AFM). Nous avons passé en revue les différentes capacités de cette technique, en insistant sur la caractérisation des propriétés mécaniques des surfaces. Différentes applications possibles de l'AFM au domaine des biomatériaux ont été détaillées et illustrées par de récents travaux à travers cette partie.

Enfin, cette revue bibliographique est complétée par une présentation des différentes théories élastique et viscoélastique qui ont été utilisées pour exploiter les courbes de force et déterminer les propriétés mécaniques, notamment le module de Young des matériaux.

1.1 Les films multicouches de polyélectrolytes

Depuis de nombreuses années, les films minces de type multicouches de polyélectrolytes suscitent l'intérêt de diverses équipes de recherches. En effet, les films multicouches offrent une très grande diversité de constructions et de propriétés chimiques et physiques. A travers ce chapitre, nous mettrons en avant l'état actuel des connaissances sur les films multicouches de polyélectrolytes, après une brève introduction historique.

1.1.1 Historique des films multicouches

Les premiers films minces nanostructurés ont été élaborés au début du siècle dernier selon la technique de « Langmuir-Blodgett », qui consiste à construire un film monocouche par le dépôt de molécules tensioactives ou amphiphiles, à une interface air/eau. Cette monocouche est récupérée par adsorption sur un substrat solide[60, 61](figure 1.1.1-1).

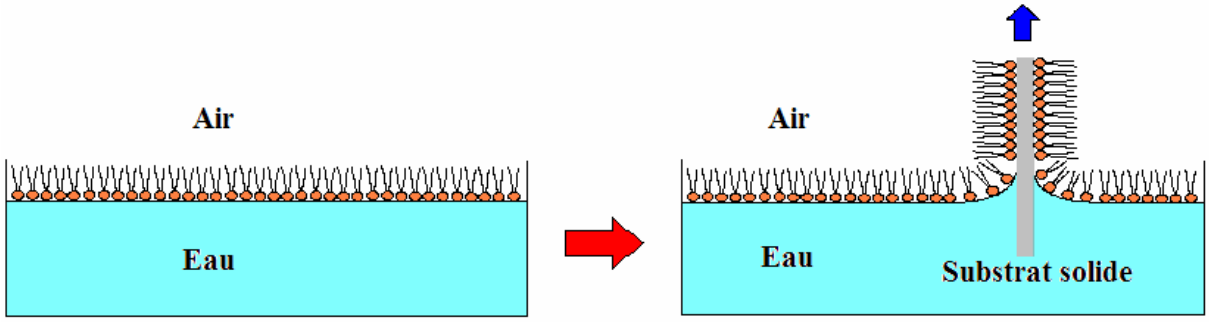


Figure 1.1.1-1 Méthode de Langmuir-Blodgett.

Cette méthode présente de nombreux inconvénients, notamment l'instabilité des films, les restrictions de topographie liées au substrat, ainsi que des réactions parasites non contrôlées entre les solvants et les molécules contenues dans le film.

Dans les années 1980, d'autres méthodes d'auto-assemblage vont suppléer la technique de « Langmuir-Blodgett ». Ainsi, la chimie de coordination[62] et la chimie covalente[63] constitueront de premières alternatives dans la construction de films minces organiques. Bien que très efficaces, ces deux techniques sont contraignantes, car elles font appel à la chimie covalente ou de coordination qui restreint la conception de films multicouches à un petit nombre de molécules. De plus, la présence de liaisons covalentes dans

la structure du film (entre groupes fonctionnels des différentes couches) limite les possibilités de fonctionnalisation de ces films. Le recours à une méthode basée sur des interactions faibles de type électrostatique se révèle être la solution pour obtenir des films multicouches comportant une densité de groupements fonctionnels actifs élevée.

Dans les années 1960, des recherches menées dans ce domaine ont démontré qu'il était possible de construire des films multicouches à partir d'un assemblage alterné de molécules colloïdales anioniques et cationiques[64]. Cette idée fut reprise dans les années 1980, dans l'élaboration de films multicouches à base de protéines et de polyélectrolytes[65]. Cependant, la construction de ces films multicouches ne permet pas l'élaboration de films plus épais, puisque au-delà de 6 paires de couches, un phénomène de floculation est observé en surface[66].

Il faudra attendre les années 1990, avec les travaux de Decher *et al.*[8], pour que la méthode d'assemblage couche par couche, notamment des polyélectrolytes, révolutionne le domaine des films multicouches[9, 67]. La méthode d'assemblage couche par couche ou LBL (pour « Layer by Layer ») repose sur un phénomène physicochimique : la physisorption, phénomène caractérisé par des interactions électrostatiques.

Cette méthode de dépôt est décrite dans la figure 1.1.1-2. Le substrat chargé positivement (ou négativement) est plongé pendant quelques minutes (5 ou 10) dans une solution de polyélectrolytes de charges opposées[68, 69].

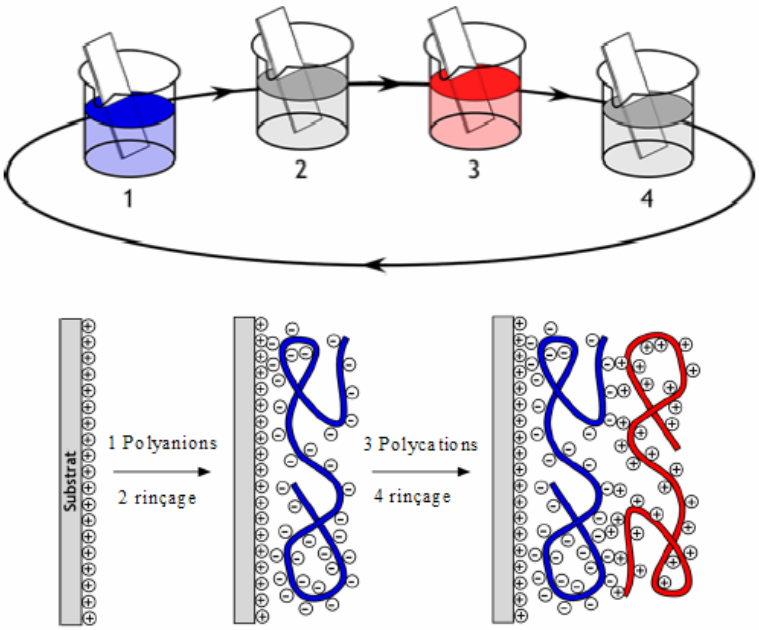


Figure 1.1.1-2 Principe du dépôt LBL.

Les polyélectrolytes présents dans la solution s'adsorbent à la surface du substrat. L'excédent de polyélectrolytes est éliminé à l'aide d'un rinçage. La surcompensation des charges durant cette première adsorption entraîne une inversion de la charge totale de la surface, comme cela a été mis en évidence par des mesures du potentiel Zêta[11, 70].

Il existe plusieurs techniques de dépôt pour construire des films multicouches par la méthode LBL. La plus répandue et la plus simple des techniques, appelée « dip-coating » ou « dipping » (immersion en solution), consiste à tremper un substrat alternativement dans un bain de polyanions puis de polycations, chaque passage dans un bain de polyélectrolytes étant suivi d'un rinçage. Les polyélectrolytes peuvent être déposés à l'aide d'un aérosol, c'est la méthode dite par « spray »[71]. Cette méthode permet de déposer très rapidement de manière alternée les polyélectrolytes sur un substrat. Ainsi on peut construire des films épais en peu de temps. Des mesures par spectroscopie infrarouge, par AFM et par ellipsométrie ont montré que les films réalisés par nébulisation ou « spray » sont quasiment identiques aux films construits par trempage ou « dipping », par exemple les films (PSS/PDADMAC)[71]. Plus récemment, on a montré qu'il était possible de réaliser certains films par « spray » simultané et non plus par « spray » alterné[72], ce qui permet de réduire au maximum la durée de construction du film. La méthode de « spin-coating » consiste à déposer une gouttelette de polyélectrolyte à la surface d'un substrat en rotation. Les polyélectrolytes sont dissous dans un solvant très volatile et sont étalés sur le substrat par la force centrifuge (figure 1.1.1-3).

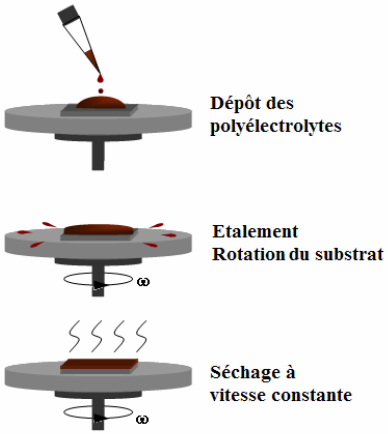


Figure 1.1.1-3 Méthode de dépôt par "Spin-coating".

Cette méthode réduit également le temps de construction de manière importante (quelques secondes par dépôt), et permet de réaliser sans rinçage, un film ayant une stratification très régulière[73]. Enfin, on peut citer une autre technique de dépôt dite par « jet d'encre », les polyélectrolytes sont alors déposés à l'aide d'un jet très mince qui permet de

contrôler le débit et la taille de la surface de dépôt. Cette technique permet de réaliser des réseaux microgravés de films multicouches[74]. Des films à base de (PAH/PAA) peuvent ainsi être déposés sur un substrat en polyéthylène téréphtalate.

A partir de ces différentes méthodes, il est possible de concevoir le dépôt aisé de films multicouches sur divers supports. De manière générale, la construction de films multicouches LBL n'impose aux supports aucune restriction de taille ou de forme. Elle permet de concevoir également des structures bi- et tridimensionnelles.[10] Il est devenu possible, par exemple, de diriger la formation de films selon des motifs imposés par le substrat en vue de construire des microstructures complexes régulières[75, 76]. D'autre part, on peut également se servir de cette technique pour réaliser des sphères creuses en assemblant des multicouches sur des particules de latex. Le substrat est ensuite calciné ou dissous sélectivement avec un acide ou un solvant organique adéquat[70, 77].

1.1.2 Propriétés physico-chimiques

Depuis de nombreuses années, plusieurs équipes de recherche s'emploient à comprendre le comportement et les phénomènes physiques au sein des films multicouches. Elles se sont spécialisées dans la caractérisation physicochimique et morphologique des multicouches de polyélectrolytes. La méthode de dépôt LBL est basée essentiellement sur les interactions électrostatiques qui existent entre des espèces anioniques et cationiques. Hormis les interactions électrostatiques, des forces secondaires à courte distance ont également une influence sur l'épaisseur et la morphologie finales. Des études récentes ont permis d'approfondir la compréhension du rôle des interactions électrostatiques et de leurs combinaisons avec d'autres types d'interaction, comme les interactions hydrogènes et hydrophobes. D'autres études ont mis en évidence l'influence de paramètres tels que la nature du solvant, le pH, la force ionique ou la température sur les propriétés physicochimiques et morphologiques des films multicouches.

Effet du pH et de la force ionique

Plusieurs études ont porté sur le comportement de polyélectrolytes fortement chargés dont on peut écranter les charges en augmentant la force ionique, par augmentation de la

concentration en sel (NaCl) des solutions de polyélectrolytes. Récemment, des polyélectrolytes faibles, dont la densité de charge change avec le pH, ont été étudiés. Par exemple, la densité de charges d'un polyanion augmente avec le pH, car les groupements acides se déprotonent. Ceci a été mis en évidence pour le système (PAA/PAH) composé de deux polyélectrolytes faibles[78, 79]. Ces polyélectrolytes ont respectivement un pKa de 5 et 9 en solution. L'étude de l'épaisseur de ces films en fonction du pH[79] a montré qu'à pH 7, ces polyélectrolytes s'assemblent en couches très interpénétrées où les chaînes adoptent une conformation allongée. L'épaisseur est de 0,3 à 0,5 nm par paire de couches. Si le pH des solutions est proche de l'un des pKa, l'épaisseur des couches augmente de manière importante. Ainsi, à pH 5, l'augmentation d'épaisseur est de 8 nm par dépôt pour le PAH et de 4,5 nm par dépôt pour le PAA, ce qui peut être expliqué par la présence de boucles et de repliements des polymères.

Le changement de pH a également pour effet de moduler la tension de surface[80] et la microporosité après construction du film[78]. Pour plusieurs systèmes de multicouches, il a été montré que les films présentent un rapport stœchiométrique de 1:1 entre les groupes anioniques et cationiques. Cependant, il semblerait que le rôle des contre-ions soit primordial et puisse modifier la stœchiométrie entre les charges des polyélectrolytes. Ainsi, il a été montré que des films (PSS/PDADMAC)[81] formés en présence d'ions chaotropiques (Br^-, NO_3^-) sont environ trois fois plus épais que des films construits en présence de F^- et d'acide acétique. Cette augmentation d'épaisseur serait attribuée à la désorganisation des polyélectrolytes par les ions chaotropiques qui favoriseraient une structure désordonnée dans le film, les polyélectrolytes adoptant une conformation en boucle.

Les multicouches de polyélectrolytes présentent généralement une rugosité de surface qui dépend de la force ionique et qui diminue avec le nombre de couches déposées[82]. Cependant, la rugosité des films multicouches de polyélectrolytes reste très faible dans le cas de films séchés ($\rho \sim 2$ nm). Par ailleurs, elle peut être diminuée en augmentant le nombre de rinçages successifs dans des solutions salines et d'eau ultrapure[83].

La force ionique est responsable des variations d'épaisseur des films multicouches lors de l'édification du film[8, 82, 84]. Les films deviennent plus épais quand la force ionique augmente. Ceci s'explique par le fait que la conformation en solution des polymères dépend fortement de la force ionique : à faible concentration saline, la chaîne polymérique tend à adopter une conformation allongée en raison des répulsions entre ses propres charges, alors qu'à forte concentration saline, l'écrantage de ses charges lui confère une conformation plus

repliée (en pelote). On peut donc moduler l'épaisseur des films en modifiant la concentration saline lors de leur construction.

Effet des interactions électrostatiques et de la température

Les liaisons hydrogènes peuvent être impliquées dans l'assemblage des polyélectrolytes[85, 86]. Ainsi, la cohésion des films multicouches à base de polyacrylamide et d'acide poly(acrylique) construits à pH 3 reposerait essentiellement sur les liaisons hydrogènes, car la plupart des groupements acides du polyacrylamide sont non ionisés. Le problème de ces films provient du fait qu'ils sont très instables lorsque le pH de construction est élevé. Une des solutions à ce problème consiste à réticuler ces films par voie thermique (90°C pendant 8 h). En effet, la réticulation permet d'augmenter la stabilité et la cohésion du film. Plusieurs études ont examiné le rôle des interactions hydrophobes dans l'élaboration des films multicouches (figure 1.2.1-1). Il est également possible de construire des films multicouches sur des surfaces polymériques très hydrophobes et non chargées[87].

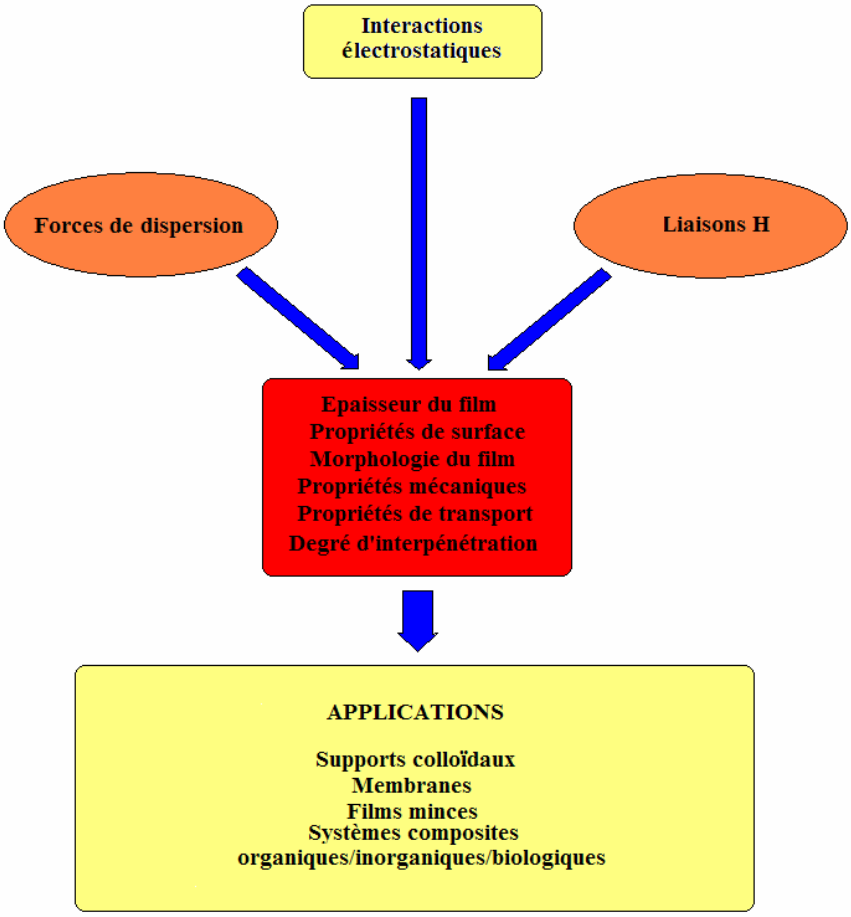


Figure 1.1.2-1 Interactions susceptibles d'influencer les propriétés des films multicouches.

L'influence de la température sur la croissance en épaisseur des films multicouches de polyélectrolytes a également été étudiée. Par exemple, les films (poly-4-styrène sulfonate/ poly hydrochlorure d'allylamine) noté (PSS/PAH) et (poly-4-styrène/ chlorure d'ammonium de polydiallyldiméthyle) noté (PSS/PDADMA) présentent, pour un même nombre de bicouches déposées, une épaisseur qui augmente avec la température imposée durant la construction[17]. Ceci met en évidence l'effet de la température sur le mode de croissance du film.

1.1.3 Mode de croissance des films multicouches

L'étude de la cinétique de croissance des films multicouches de polyélectrolytes a permis d'identifier deux modes de croissance des films. Ainsi, on distingue des films caractérisés par une croissance linéaire et d'autres par une croissance exponentielle (figure 1.1.3-1).

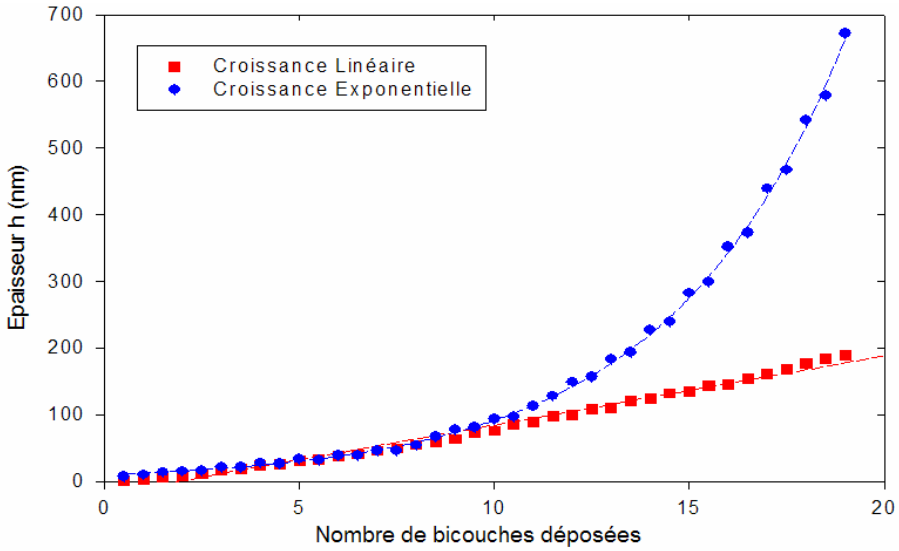


Figure 1.1.3-1 Modes de croissance des films multicouches.

Croissance exponentielle d'un film (PLL/PSS) et croissance linéaire d'un film (PSS/PAH) suivies par microbalance à cristal de quartz (QCM-D).

Les films multicouches à croissance linéaire

Les films à croissance linéaire sont caractérisés par une épaisseur constante pour chaque paire de couches déposée. Dans ces films, les polyélectrolytes interagissent avec les polyélectrolytes de charge opposée constituant la surface externe du film[9]. Le système (PAH/PSS) en est sans doute l'exemple le plus largement étudié. Des analyses réalisées par

réflexion de neutrons ont montré que ces films sont pseudo-stratifiés, en raison de la présence de pics de Bragg observables lorsque les polyélectrolytes sont deutérés[9, 88]. Cependant, on a démontré la présence d'une interpénétration entre couches adjacentes au niveau de l'interface, qui permet à chaque strate de la structure d'être solidaire de ses voisines[89]. Plusieurs paramètres caractérisant ces films à croissance linéaire peuvent être contrôlés, tels que l'épaisseur, la densité (masse volumique) et la structure. Par exemple, le choix de différents polycations et polyanions, faibles ou forts, permet de moduler l'épaisseur des films, de même que l'augmentation de la force ionique en solution. L'étude de l'évolution de l'épaisseur des films à croissance linéaire montre que les premières couches déposées ont une structure différente de celle observée pour les couches présentes « au cœur » du film. Cela est dû en grande partie à l'influence du substrat sur lequel les couches ont été déposées. Pour expliquer cette croissance linéaire et les différentes structures observées, un modèle de multicouches à trois zones[11] représenté dans la figure 1.1.3-2 a été proposé.

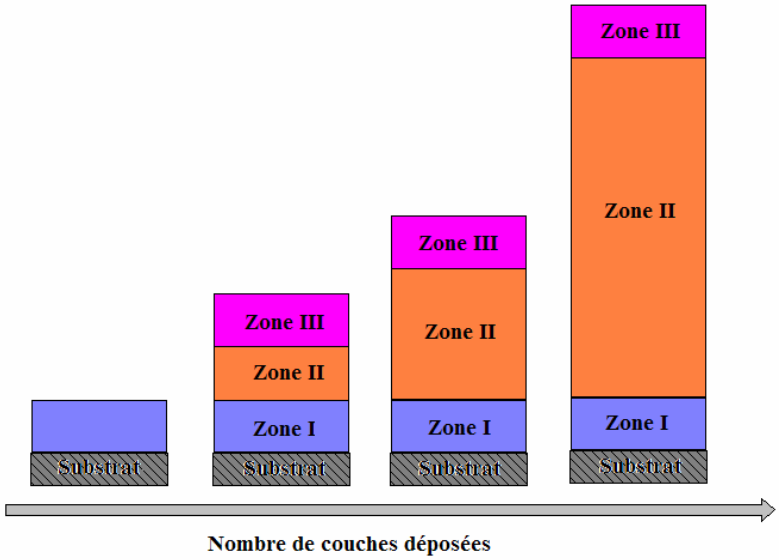


Figure 1.1.3-2 Modèle à trois zones.

La zone I dite « zone précurseur » et la zone III dite « zone externe » sont composées d'une ou plusieurs couches de polyélectrolytes. Elles sont fortement influencées, respectivement par le substrat pour la zone I et par la solution ou l'air pour la zone III. Cependant les frontières entre les zones I et II et les zones II et III sont diffuses. Le nombre de couches composant les zones I et III n'est pas connu, mais il dépend vraisemblablement du substrat, de la structure chimique des polyélectrolytes utilisés, ainsi que des conditions d'adsorption. Le modèle des trois zones n'est valable qu'à partir d'un nombre suffisant de couches déposées sur le substrat. On peut supposer qu'au cours de la construction, après une

situation transitoire où la zone II n'existe pas encore, les zones I et III conservent leurs épaisseurs et structures respectives, tandis que la zone II augmente en épaisseur. La zone intermédiaire ou zone II représente la majeure partie du film et n'est pas influencée par la solution. En effet, lorsqu'une nouvelle couche est adsorbée à la surface de la zone III, la couche la plus proche de l'interface entre les zones II et III s'éloigne de l'interface film/solution et n'est plus influencée par la solution : cette couche passe alors de la zone III à la zone II.

Les films à croissance exponentielle

Quelques études ont démontré que l'augmentation du taux de sel des solutions de polyélectrolytes était responsable d'une croissance plus rapide que la croissance linéaire et qui a été appelée croissance « super linéaire »[90, 91]. Dans un premier temps, cette augmentation d'épaisseur a été reliée à une augmentation de la rugosité du film. En effet, l'augmentation de la rugosité entraîne une augmentation de la surface d'adsorption et, par conséquent, de la quantité de matière déposée. Par la suite, d'autres études portant sur des polypeptides et polysaccharides ont mis en évidence une croissance dite « exponentielle » de l'épaisseur[92]. Cette croissance exponentielle a également été mise en évidence pour des films construits à base de polypeptides comme le système (PLL/PGA)[13] et à base d'un polypeptide, la poly-L-lysine et d'un polysaccharide, le hyaluronane (PLL/HA)[12]. De tels films possèdent des caractéristiques physicochimiques proches de celles d'un hydrogel, notamment en raison de leur forte teneur en eau. L'épaisseur de ces films peut atteindre un à plusieurs micromètres après dépôt d'une vingtaine de paires de couches. Ces épaisseurs permettent d'utiliser la microscopie confocale pour visualiser la structuration en *z* du film après marquage fluorescent de l'un des polyélectrolytes. Ainsi, il a été mis en évidence que la croissance exponentielle est liée à la diffusion d'au moins l'un des deux polyélectrolytes constituant le film, à chaque étape de dépôt[14]. Dans le cas du film (PLL/HA), cette croissance exponentielle est décrite en détail par le modèle[19] schématisé dans la figure 1.1.3-3.

Dans le cas d'un film (PLL/HA) se terminant par HA (a), on a observé que le polycation (PLL) est l'espèce diffusante. Dans un premier temps, les molécules de PLL diffusent dans le film au moment du dépôt de la solution de PLL (b, c). Lors du rinçage, ces molécules de PLL « libres » ne sont que partiellement éliminées car une partie seulement diffuse vers la surface du film et sort du film (d). En effet, toutes les molécules ne sortent pas en raison de l'existence d'une barrière de potentiel à la surface du film. Lors de l'addition de

HA, ces molécules de PLL peuvent diffuser hors du film mais, au contact de la solution de HA, elles se complexent avec les chaînes de HA et s'adsorbent à la surface du film pour en constituer la nouvelle couche supérieure (e).

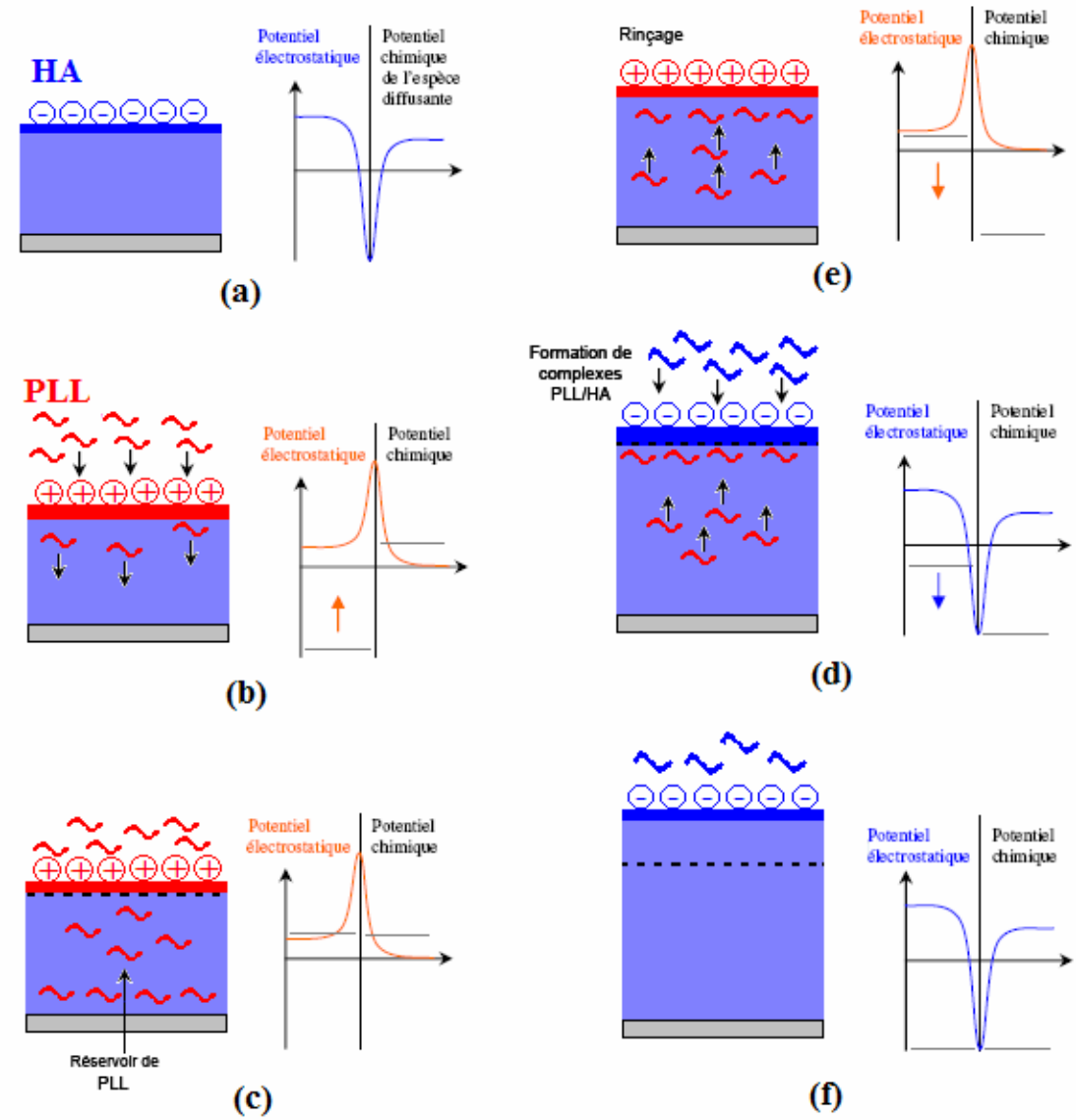


Figure 1.1.3-3 Modèle de diffusion des films à croissance exponentielle.

Le nombre de molécules de PLL piégées dans le film est en première approximation proportionnel à l'épaisseur du film. L'épaisseur de chaque nouvelle couche déposée est proportionnelle au nombre de molécules de PLL stockées dans le film. Après chaque dépôt, le stock de PLL augmente et entraîne une augmentation en épaisseur de chaque nouvelle couche déposée. C'est ce mécanisme qui conduit au régime de croissance exponentielle du film. En fin de cycle (e), la surface est de nouveau chargée négativement et une grande partie des

molécules de PLL libres a été utilisée pour complexer le HA. Le cycle d'adsorption peut alors recommencer.

1.1.4 Applications dans le domaine des biomatériaux

L'étude des propriétés physicochimiques et la compréhension du comportement des films multicouches de polyélectrolytes sont susceptibles d'ouvrir de nombreuses perspectives d'application, notamment dans le domaine des biomatériaux. En effet, la grande variété de choix des polyélectrolytes permet l'élaboration de films dont les propriétés physicochimiques et les possibilités de fonctionnalisation sont multiples et modulables. Fonctionnaliser consiste à conférer au film une ou des propriété(s) spécifique(s) en le modifiant chimiquement ou physiquement, par réticulation ou insertion de protéines et peptides actifs.

Les films multicouches peuvent être fonctionnalisés par adsorption de protéines en superficie d'un film ou par insertion d'une ou plusieurs protéines (identiques ou différentes) à plusieurs niveaux de la construction. Ces protéines doivent cependant conserver une structure proche de celle de leur forme native afin de préserver leurs activités biologiques. Une fois les protéines enfouies, les cellules déposées sur le film doivent pouvoir interagir avec elles. Des études d'adsorption de différentes protéines sur des films de type (PAH/PSS) ont montré que les quantités adsorbées sont plus importantes quand la charge globale de la protéine est opposée à celle de la multicouche. Ainsi, les protéines chargées positivement s'adsorbent préférentiellement sur un film terminé par PSS alors que celles chargées négativement s'adsorbent préférentiellement sur un film terminé par PAH[93, 94]. Certains films multicouches présentent des propriétés de très faible adsorption vis-à-vis des protéines[95]. Les influences liées au type de polymère, à la force ionique et au pH des solutions ont été étudiées. Il apparaît que les films terminés par les polyanions faibles ont des propriétés anti-adsorbantes à pH 7,4 alors que ceux terminés par le polyanion fort présentent une adsorption protéique.

Dans la perspective d'applications biomédicales des films multicouches de polyélectrolytes, de nombreuses études ont porté ces dernières années sur le comportement de cellules sur les films multicouches. La première étude[92] a consisté à déposer des multicouches de type (poly-L-lysine/ alginate), noté (PLL/Alg), sur des supports de gélatine et de collagène de type I et d'observer le comportement des fibroblastes. Ces films sont un premier exemple de multicouche à croissance exponentielle possédant des propriétés de bioinertie vis-à-vis des fibroblastes humains. En effet, de tels films construits sur des substrats, initialement favorables à l'adhésion cellulaire, s'avèrent anti-adhésifs pour les fibroblastes. De plus, les

films multicouches de type (poly hydrochlorure d'allylamine/ poly acide acrylique) notés (PAH/PAA) possèdent des propriétés d'adhérence modulable vis-à-vis d'une lignée de fibroblastes (NR6WT)[96]. Le principe de modulation repose sur le changement de pH des solutions de polyélectrolytes lors de la construction du film (en l'absence de sel). Lorsque les films sont construits à pH 6,5, condition dans laquelle les polyélectrolytes sont fortement chargés, les cellules adhèrent normalement. Dans ce ces, les films sont minces et peu hydratés, alors que s'ils sont construits à pH 2, pour lequel le PAA est très peu ionisé, ils sont cinq fois plus épais et totalement résistants à l'adsorption cellulaire pour un nombre équivalent de couches. La corrélation directe entre le caractère non adhérent des films et leur capacité de gonflement en solution aqueuse a également été mise en évidence. L'ensemble de ces résultats suggère fortement que le caractère non adhérent d'un film multicouche est directement relié à son degré d'hydratation. Cependant, la quantité de protéines adsorbées sur les films construits à différents pH ne semble pas être reliée à l'adhésion cellulaire. La couche terminale, c'est-à-dire la plus externe du film, influence fortement la morphologie de certains types cellulaires, tels que les cellules de chondrosarcome HCS-2/8[97]. Sur des films terminés par PSS, PLL, PAH et PGA, les cellules adoptent une forme étalée et, présentent des points focaux d'adhésion préférentielle sur les films terminés par PSS et PGA. Les polyélectrolytes synthétiques de type PEI, PSS, et PAH sont souvent utilisés pour élaborer des films minces et favoriser l'adhésion cellulaire[98]. L'élaboration de films multicouches non adhérents s'inscrit dans une démarche visant à rendre certaines surfaces sélectivement non adhérentes à certains types cellulaires.

L'activité catalytique des enzymes n'est pas affectée par la présence des multicouches. Elle pourrait être mise à profit dans le domaine de la séparation par des interactions bio-spécifiques[99]. En outre, l'incorporation d'enzymes dans les multicouches permet de construire de véritables réacteurs enzymatiques spécifiques. Des détecteurs spécifiques bio-optiques et bio-électroniques d'hydropéroxyde, de glucose, d'amidon, de maltose, de fructose et de méthanol ont déjà été conçus à partir de films contenant des couches de peroxydase[100], de glucose oxydase[101], de glucoamylase[102], de fructose déshydrogénase et d'alcool oxydase [101].

1.2 Principes de la microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique AFM (Atomic Force Microscopy) a été développée en 1986[103]. Elle dérive des principes du microscope à effet tunnel STM[104-106] (Scanning Tunneling Microscope). Cet outil d'investigation permet l'étude de surface de matériaux à l'échelle atomique. Cette technique de microscopie est à l'origine d'une nouvelle famille de microscopes qui a apporté des progrès notables de nos connaissances de la matière : la microscopie à sonde locale qui repose sur la détection d'une interaction entre une pointe de dimension nanométrique et une surface. Elle est devenue la technique d'analyse de référence pour caractériser les propriétés physicochimiques et mécaniques de surfaces et de matériaux dans de nombreux domaines.

1.2.1 Description de la microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique, fait partie des microscopies à champ proche ou microscopies à sonde locale. La microscopie à force atomique repose sur l'interaction entre une sonde de taille nanométrique et une surface. Cette interaction dépend d'une part de la distance entre la sonde et la surface, et d'autre part de la nature physicochimique des deux protagonistes. La distance sonde-surface est contrôlée par un actuateur piézoélectrique dont le déplacement est contrôlé avec une précision de l'ordre du dixième de nanomètre. Généralement, la sonde utilisée est une pointe pyramidale très fine ou une sphère, fixée à l'extrémité d'une lame-ressort ou microlevier (cantilever) de constante de raideur k_C. Lors du balayage de la surface, des forces d'interactions provoquent la déflexion du cantilever (la sonde).

La figure 1.2.1-1 schématise le fonctionnement de l'AFM. Une céramique piézoélectrique permet de contrôler le déplacement de la surface dans les trois directions de l'espace (x, y, z). La déflexion du cantilever est enregistrée par un photodétecteur. Un faisceau laser est focalisé sur le cantilever et les variations de position du faisceau réfléchi sont détectées par un photodétecteur à quatre quadrants.

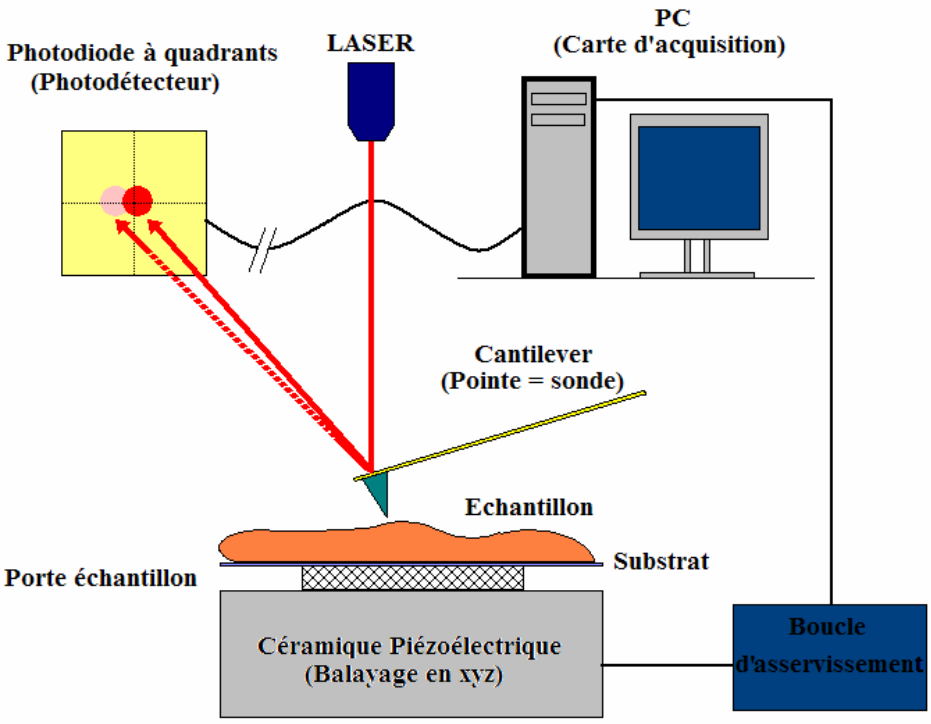


Figure 1.2.1-1 Principe de fonctionnement de l'AFM.

Lorsque le faisceau réfléchi est dévié, l'intensité du signal reçue par chacun des quadrants du détecteur change. Pour de faibles déflexions, il existe une relation linéaire entre le déplacement du cantilever et la différence entre les intensités reçues par les différents quadrants. L'intensité lumineuse, convertie en signal électrique et la tension appliquée à l'actuateur piézoélectrique sont enregistrées par une carte d'acquisition et transmises via un ordinateur à un logiciel de traitement des données. La conversion des signaux électriques (en volts) en déplacements (nm) est réalisée directement par le logiciel. Ce prétraitement des données nécessite la détermination des constantes de calibration du cantilever et de la céramique piézoélectrique par l'expérimentateur.

Depuis son invention, parallèlement à l'utilisation pour l'imagerie de la topographie des surfaces à l'échelle nanométrique, l'AFM s'est imposé comme un instrument de mesure de forces entre deux éléments. On peut ainsi envisager de quantifier les propriétés viscoélastiques d'un matériau ou ses propriétés adhésives.

1.2.2 Les différents modes d'utilisation de la microscopie à force atomique

On distingue trois modes d'opération de l'AFM : le mode contact, le mode non contact et enfin le mode contact intermittent. Ces modes de fonctionnement exploitent différents types d'interactions présentes entre la pointe et la surface (figure 1.2.2-1) :

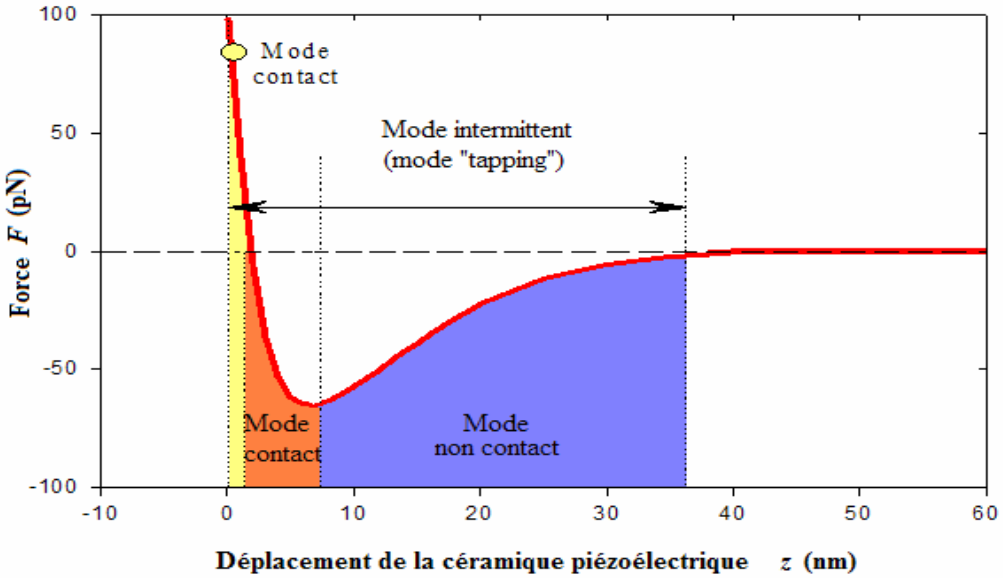


Figure 1.2.2-1 Courbe d'interaction pointe-surface.

- Le mode contact consiste à utiliser les forces répulsives : la pointe appuie sur la surface, elle est donc repoussée par des interactions à courte distance (forces répulsives), et le cantilever dévié. Une boucle rétroactive maintient la force d'interaction (déflexion du cantilever) constante.
- Le mode contact (le plus utilisé) consiste à faire osciller le cantilever à sa fréquence propre (souvent de l'ordre de 100 kHz), avec une certaine amplitude. La pointe interagit périodiquement avec la surface. Lorsque la pointe « touche » la surface, l'amplitude décroît parce que la fréquence de résonnance change. La boucle d'asservissement s'exerce alors sur l'amplitude d'oscillation du cantilever.
- Le mode non contact exploite les forces attractives présentes entre la pointe et la surface à étudier. Il est très peu utilisé, parce que ces forces sont faibles, et nécessitent un environnement à faible bruit. Par ailleurs, la surface des échantillons est toujours recouverte d'une fine couche (de l'ordre du nanomètre), constituée principalement de vapeur d'eau et de divers polluants. Ces adsorbats affectent forcément les mesures. Celles-ci doivent généralement être effectuées dans le vide pour obtenir une résolution

suffisante. La rétroaction s'exerce soit sur la déviation (attraction) du cantilever, soit sur l'amplitude des oscillations.

L'AFM en mode contact, permet de mesurer l'interaction entre un échantillon et une sonde (pointe). Pour cela, on peut effectuer des cycles approche/retrait de l'échantillon et mesurer la déflexion du cantilever en fonction du déplacement de l'actuateur piézoélectrique. La déflexion du cantilever conduit à un déplacement du faisceau laser réfléchi sur un système de photodétection. Le signal résulte des intensités lumineuses respectives reçues par les différents quadrants d'un photodétecteur. Ce déplacement correspond à une force égale au produit de la constante de raideur du cantilever k_C et du déplacement Δd du cantilever (loi de Hooke).

Les déplacements de la céramique piézoélectrique permettent aussi d'obtenir une image topographique de la surface de l'échantillon en deux ou trois dimensions (figure 1.2.2-2) : il s'agit du mode « image ». Les grandeurs mesurées présentent une très grande précision puisque le déplacement de la céramique piézoélectrique est contrôlé à l'échelle du dixième de nanomètre.

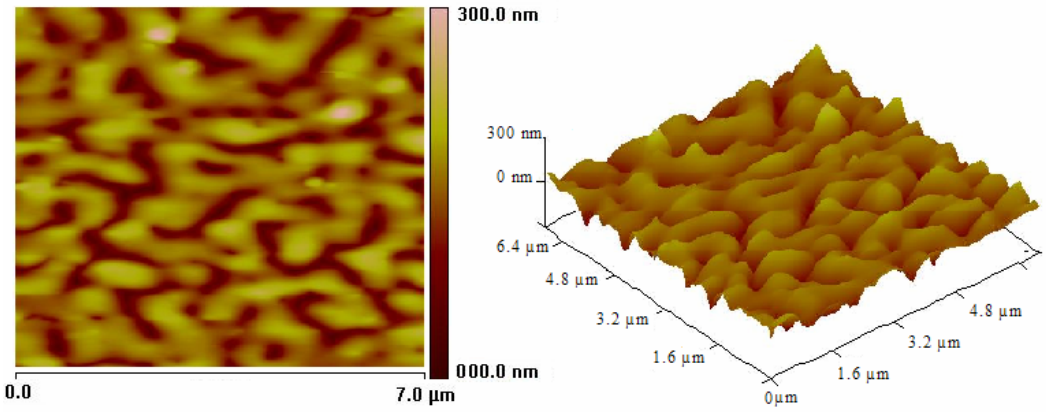


Figure 1.2.2-2 Mode contact : Topographie de surface en 2 et 3 dimensions.

Surface d'un film $(PLL/[HA_{0,90}/PSS_{0,10}])_{12}$ en 2 et 3 dimensions obtenue par AFM.

Le mode contact permet d'effectuer deux types de mesures de frottements : le mode force de friction ou FFM pour « Friction Force Microscopy » et le mode force latérale noté LFM pour « Lateral Force Microscopy ». Contrairement au mode « image » qui permet d'obtenir une cartographie de surface, les balayages de l'échantillon sont effectués perpendiculairement à l'axe longitudinal du cantilever. Dans ce cas, les forces de frottement induisent une torsion et un déplacement dans le plan horizontal de l'extrémité du cantilever. Ce déplacement est une mesure des forces de frottement. On peut alors obtenir des images topographiques différentes

qui mettent en évidence des détails dans la structure et la morphologie des surfaces qui ne sont pas visibles avec le mode contact classique (figure 1.2.2-3).

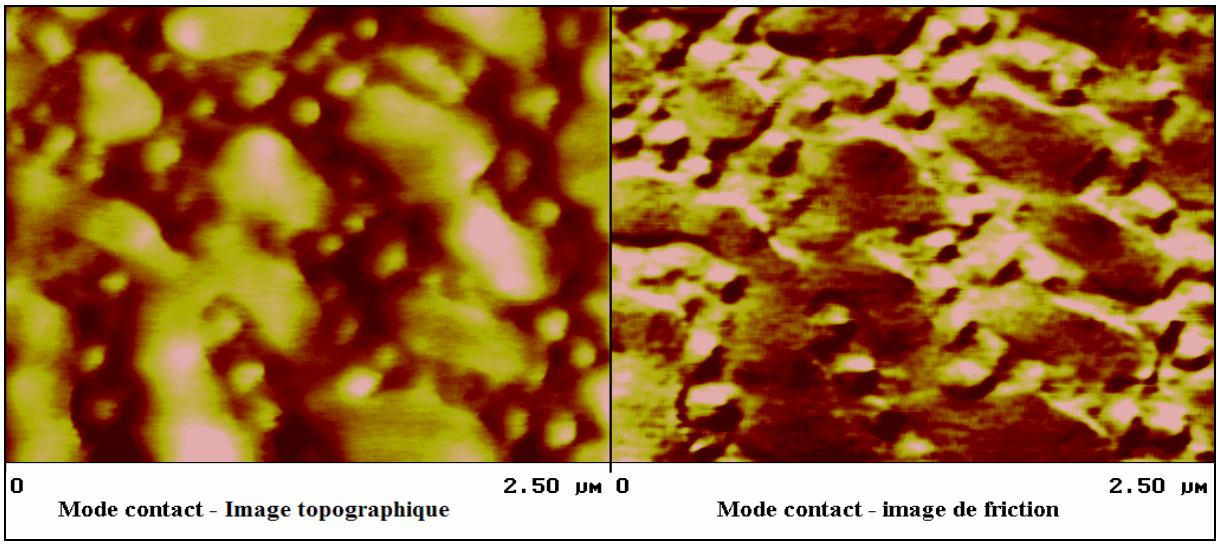


Figure 1.2.2-3 Mode contact (image par FFM).
Surface d'un film poly-4-styrène-polyméthylméthacrylate (PS-PMMA) - Gallerie NIST (National Institute of Standard and Technology)[107].

Le mode intermittent (mode « tapping ») comporte un mode contact intermittent et un mode non contact intermittent (figure 1.2.2-1). Dans les deux cas, il s'agit d'un mode résonant dans lequel le cantilever vibre à sa fréquence de résonance au voisinage de l'échantillon. Ce mode est très utilisé et permet de connaître la topographie des échantillons et d'obtenir des images de phase (figure 1.2.2-4).

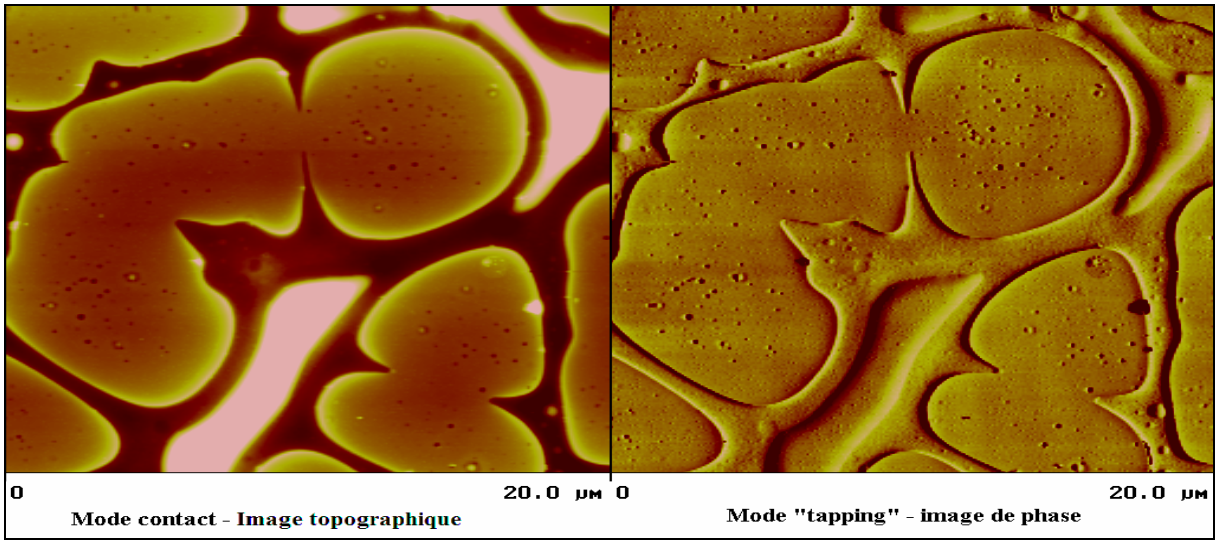


Figure 1.2.2-4 Mode contact et contact intermittent.
Surface d'un film polybutadiène-polyméthylméthacrylate (PB-PMMA)[108] *– Gallerie NIST (National Institute of Standard and Technology)*[107].

Les images de phase sont généralement très différentes des images topographiques. Elles ont l'avantage de révéler les hétérogénéités de surfaces liées aux propriétés viscoélastiques et de mouillage de l'échantillon.

1.2.3 La spectroscopie de force

Obtenir une courbe de force expérimentale consiste à appliquer une tension variablee à la céramique piézoélectrique et à enregistrer une tension proportionnelle à la déflexion. Pour connaître le déplacement de la surface correspondant à la tension appliquée, on utilise la constante de calibration de la céramique piézoélectrique, notée C_P.

La figure 1.2.3-1 montre deux exemples de courbes de force. La déflexion est tracée en fonction du déplacement de la céramique piézoélectrique. La phase d'approche (en rouge) suivie de la phase de retrait (en bleu) constitue un cycle complet approche/retrait de la sonde.

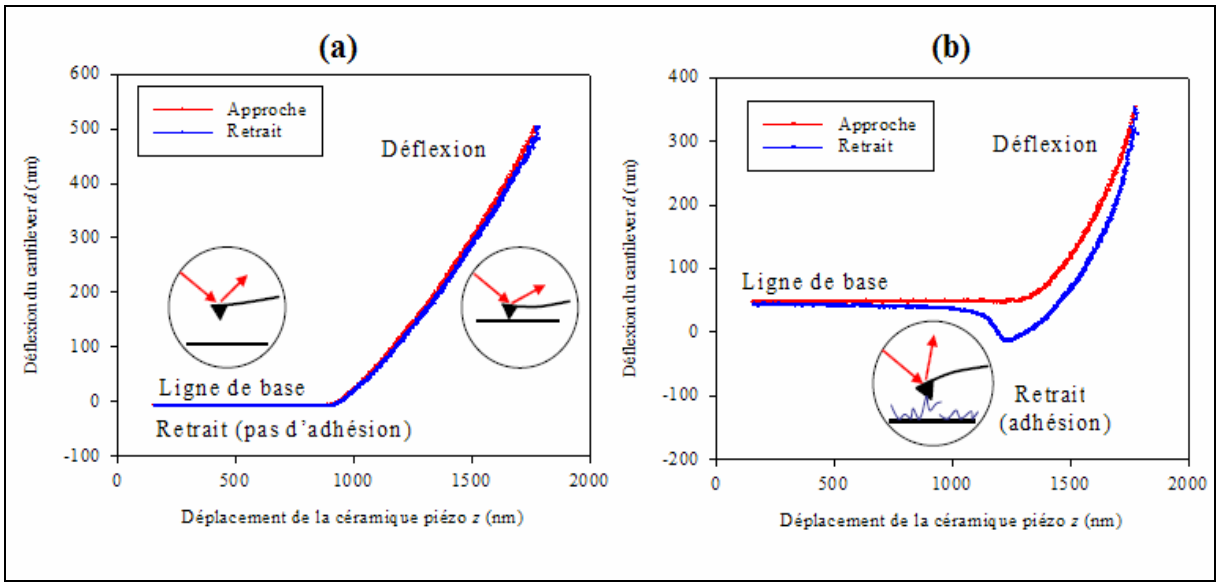


Figure 1.2.3-1 Exemples de courbes de force durant un cycle approche/retrait.

Exemple de courbe de force sur un film rigide et non adhérent (a) et exemple de courbe de force sur un film mou et adhésif (b).

Durant la phase d'approche, on distingue deux zones communes aux figures a et b :

- Pour un déplacement de la surface en z inférieur à 750 nm (figure a), on n'enregistre aucune déflexion du cantilever : la pointe et la surface sont très éloignées l'une de l'autre et la force d'interaction est nulle. Cette zone définit la ligne de base ($F = 0$).
- Pour un déplacement en z supérieur à 800 nm (figure a), la déflexion augmente avec le déplacement : la pointe et la surface sont en contact, le déplacement de la pointe est imposé par celui de la céramique piézoélectrique. Le traitement de cette partie de la

courbe avec un modèle élastique ou viscoélastique permet de déterminer l'élasticité de l'échantillon. La force exercée par la pointe sur l'échantillon s'écrit : $F = k_C \cdot (d - d_0)$ et $F > 0$ avec d la déflexion du cantilever et d_0 la position initiale de ce dernier.

Durant la phase de retrait de la sonde, deux cas sont possibles :

- La déflexion diminue de manière continue avec le déplacement (figure a), jusqu'à ce que la pointe ne se retrouve plus en contact avec l'échantillon. S'il n'y a aucune interaction entre les deux surfaces, les courbes d'approche et de retrait se superposent (figure a).
- Dans le second cas (figure b), on observe d'abord la même diminution de la déflexion, mais celle-ci se prolonge au-delà du point de contact en raison des interactions exercées entre la pointe et la surface (forces d'adhésion). Par conséquent, le point de détachement est déplacé à une position $z < z_0$. Les courbes d'approche et de retrait ne se superposent plus. Il apparaît alors un minimum et un ou plusieurs points de rupture avant que la pointe ne se retrouve hors contact.

Les courbes de force obtenues donnent accès à plusieurs paramètres propres à l'échantillon. En effet, la zone d'approche ou de complaisance permet de déterminer les propriétés mécaniques (élasticité) alors que la zone de rétraction permet de déterminer les forces dissipatives (viscosité), ou d'adhésion (détachements).

1.2.4 Application dans le domaine des biomatériaux

L'AFM est très utilisé dans le domaine des sciences des surfaces, par exemple en lithographie de nanodispositifs sur des surfaces métalliques[109], ou dans les mesures électriques telles que l'analyse de propriétés électriques locales de nanostructures de semi-conducteurs[110]. L'AFM est également une technique en pleine émergence dans la biologie[111, 112], pour l'étude de protéines membranaires[113], l'étude des interactions sonde-molécules (peptide, polymères, ADN…)[114, 115], l'étude d'interactions ADN-protéine[116] et plus récemment la caractérisation des propriétés mécaniques[41, 117, 118 42, 119, 120] de surfaces de biomatériaux[13, 115].

L'AFM permet d'observer la cinétique d'adsorption de molécules (protéines, ADN, polymères,…) sur une surface de silice. Cette méthode fait appel à des cycles approche/retrait de la pointe sur le substrat. Les molécules sont soit adsorbées sur un substrat, soit adsorbées sur la sonde (pointe ou sphère colloïdale) de l'AFM. On peut ensuite mettre en contact la

sonde avec la surface pendant un temps d'interaction Δt. Lors du retrait de la sonde, on peut observer un ou plusieurs évènements de ruptures consécutifs (figure 1.2.4-1) caractéristiques des sites d'adhésion entre la pointe et la molécule.

Dans le cas du fibrinogène, molécule jouant un rôle important dans la coagulation du plasma sanguin, il a été démontré que le nombre moyen de ruptures n_r par cycle augmentait avec le temps d'interaction[38]. Il a aussi été montré que le temps d'interaction minimum pour lier fortement la molécule de fibrinogène à une surface de silice, était compris entre 50 et 200 ms et que la distance minimale entre deux ruptures au cours d'un cycle était de l'ordre de 20 à 25 nm. Deux modes d'interactions peuvent être à l'origine des trains de ruptures enregistrés lors de la séparation molécule – surface adsorbante.

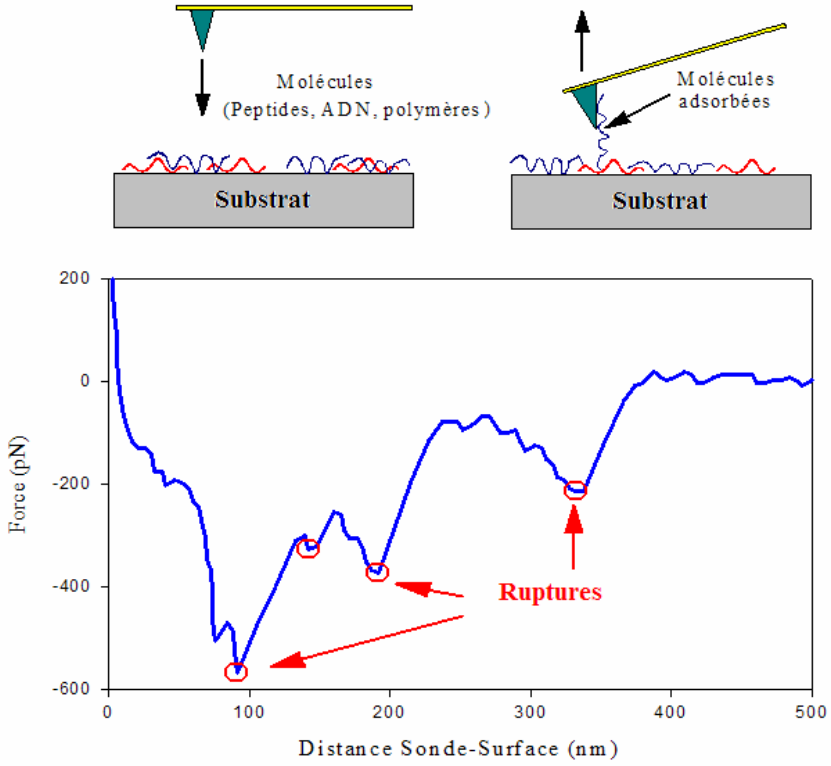


Figure 1.2.4-1 Forces de rupture de molécules adsorbées sur une pointe d'AFM.

En effet, les détachements peuvent se produir soit en parallèle et soit en série à la fois[115]. Le modèle de rupture en série doit être envisagé si durant un cycle, la distance totale, parcourue par la surface déplacée, au cours des évènements de rupture est supérieure à la longueur de la molécule étudiée. L'adsorption de protéines joue un rôle majeur dans la cascade des évènements se produisant à la surface d'un biomatériau. On a noté, par exemple, que les protéines s'adsorbent généralement plus fortement à des surfaces hydrophobes. De nombreux travaux portent sur la reconnaissance moléculaire. Dans ce cas, la sonde de l'AFM est

fonctionnalisée avec des molécules (protéines, nanotubes, anticorps, récepteurs moléculaires) ou groupements chimiques spécifiques (− COOH, − NH_2, …) pour étudier des interactions spécifiques de type ligand-récepteur ou plus généralement entre deux ou plusieurs molécules. De plus, il est possible de travailler à l'échelle de « la » molécule, si celle-ci est immobilisée sur un substrat.

Il est également possible d'étudier certains aspects et phénomènes cellulaires par l'approche immunocytochimique. Cette adaptation est basée sur le même principe que l'immunocytochimie par microscopie de fluorescence, c'est-à-dire la reconnaissance biomoléculaire, à l'aide d'un marqueur fluorescent spécifique. Avec un AFM configuré en mode « tapping »[121], il est possible d'exploiter cette technique sans les inconvénients liés à la focalisation d'un microscope optique ou encore à l'instabilité (photoblanchiment) de l'intensité de fluorescence.

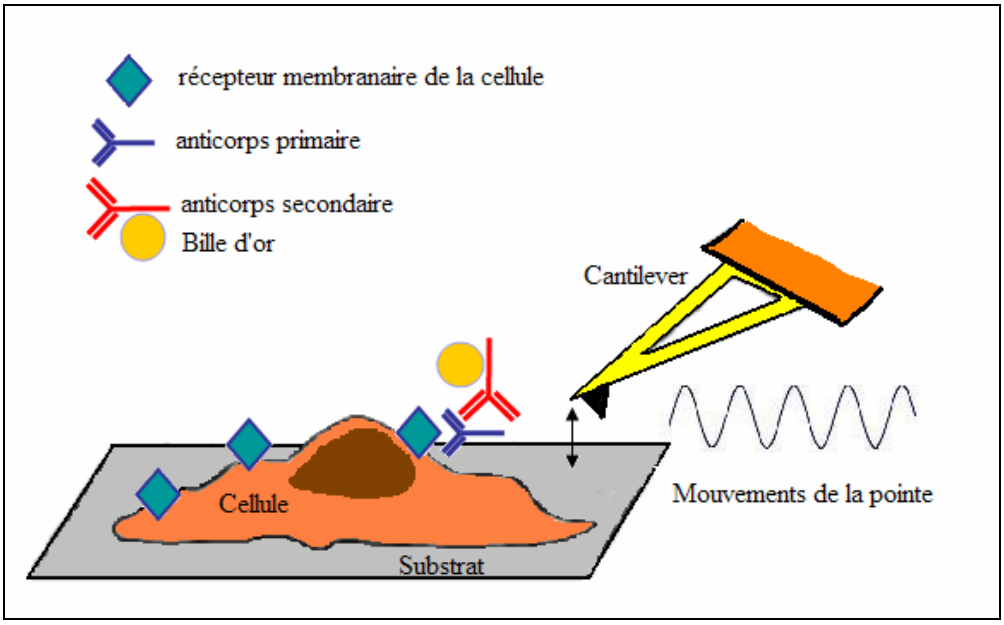


Figure 1.2.4-2 Immunocytochimie par AFM.

L'étude du collagène de type II et de type I exprimé par des chondrocytes, des chondrosarcomes et des fibroblastes, par la technique d'immunogold (figure 1.2.4-2), donne des résultats concordant avec les observations faites par immunofluorescence[121]. Cette utilisation particulière de l'AFM permet en outre de discriminer les fibres de collagène de type I des fibres de collagène de type II. En effet, selon le marqueur utilisé, les billes d'or seront localisées spécifiquement sur l'un ou l'autre des types de collagène synthétisé par la cellule (figure 1.2.4-3).

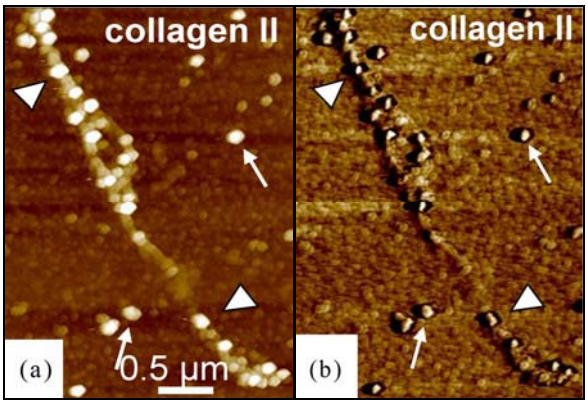


Figure 1.2.4-3 Fibres de collagène II marquées par immunogold[121].

L'organisation spatiale des domaines cytoplasmiques et compartiments nucléaires au cours de différentes phases de l'adhésion cellulaire peuvent également être observées simultanément en appliquant cette même technique.

L'AFM en mode indenteur (IT-AFM) peut être utilisé comme un piézo-rhéomètre[122], afin de tester les propriétés mécaniques des surfaces, notamment les biomatériaux[123, 124] ou les cellules[125, 126]. L'avantage de l'IT-AFM ou nanorhéomètre[127] est de pouvoir tester des objets de taille millimétrique à des objets de taille nanométrique. Cette technique repose sur le mode contact, la sonde étant très souvent une particule colloïdale dont le diamètre est choisi en fonction de la taille de l'objet à tester.

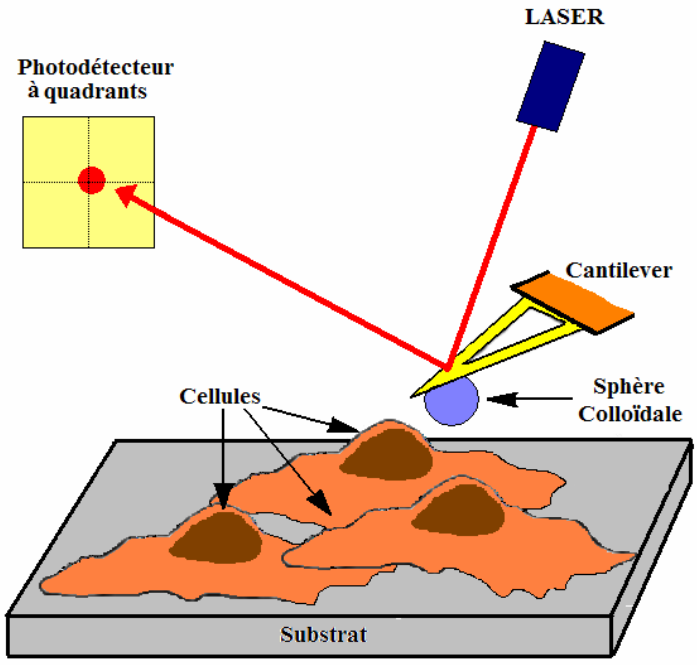


Figure 1.2.4-4 Schéma de principe d'un IT-AFM.

Les premières études[49, 128] ont été étendues aux polymères[129, 130], aux gels[43, 131] puis aux films

multicouches [56, 132] et aux tissus biologiques[133]. D'ailleurs de récents travaux dans le domaine de la biologie ont montré que le module élastique (module de Young) de cellules de type macrophage variait en fonction de la zone indentée. Le cytosquelette, le noyau et les organelles sont plus rigides que le reste de la cellule (cytoplasme). Globalement, ces cellules sont caractérisées par un module de Young relativement faible, inférieur à 1 kPa[126]. Dans le cas de cellules issues de la couche cornée de l'épiderme (*stratum corneum*), le module de Young varie de 50 MPa en milieu hydraté à 200 MPa en milieu déshydraté[125]. L'étude de cellules musculaires de porc de type SMC (smooth muscle cell) ont montré que celles-ci avaient un module de Young inférieur à 10 kPa[118]. D'autres travaux, menés sur des structures plus complexes à base de multicouches de polyélectrolytes, telles que les microcapsules[124], ont montré que ces structures ont un module de Young de l'ordre de 100-200 MPa dans le cas du système (PSS/PAH).

1.3 Théories élastiques et viscoélastiques

Lorsque deux surfaces sont en contact, les paramètres tels que l'indentation, l'aire et le rayon du cercle de contact sont fonctions de la force appliquée et des propriétés mécaniques des deux surfaces. Différentes théories ont été développées afin de décrire les contacts mécaniques ; elles contribuent pour beaucoup à l'essor de la spectroscopie de force comme outil d'étude quantitative des propriétés viscoélastiques des matériaux et des nanocontacts. Nous nous placerons dans le cadre défini par les règles suivantes :

- la modélisation se limite au cas où la déformation, δ, de l'un des matériaux est petite par rapport au rayon de courbure de la sonde supposée infiniment dure, pour satisfaire à l'hypothèse de l'élasticité linéaire,
- le matériau étudié est homogène et isotrope,
- les forces mises en jeu lors du contact sont normales à la surface (contact sans cisaillement, ni frottements),
- la sonde est un objet axisymétrique.

Nous développerons dans ce chapitre quelques notions de base en mécanique des surfaces et des contacts, ainsi que les différentes théories viscoélastiques sur lesquelles nous nous sommes appuyés au cours de l'étude des propriétés mécaniques des films multicouches de polyélectrolytes.

1.3.1 Théories des matériaux élastiques

La nature élastique d'un matériau est caractérisée par le fait que les déformations subies par ce matériau sont réversibles, c'est-à-dire que le milieu retourne à son état initial quand on supprime la perturbation (il n'y a pas de mémoire de forme du matériau). Généralement, l'élasticité des matériaux est linéaire, dans la limite de faibles déformations, c'est-à-dire que les déformations sont proportionnelles aux contraintes. Cette linéarité est traduite par la loi de Hooke :

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \qquad (1.3\text{-}1)$$

où σ représente la contrainte, E le module de Young et ε la déformation. Le plus souvent, $[\sigma]$ et $[\varepsilon]$ sont des tenseurs (tenseur des contraintes et tenseurs des déformations, respectivement) et [E] la matrice des constantes d'élasticité.

Le problème du contact mécanique de deux corps élastiques a été étudié par Boussinesq à la fin du XIX^{ème} siècle[134, 135]. L'action d'une force sur un domaine d'aire finie[136], S, du plan délimitant la surface d'un matériau, engendre un déplacement vertical dépendant de la distance radiale, r, noté $u(r)$.

Quand une force, F, est appliquée perpendiculairement en un point de la surface plane d'un matériau, pris comme origine des coordonnées, la déformation est donnée par[137]:

$$u(r) = \frac{1-\nu^2}{\pi E}\frac{F}{r} \tag{1.3-2}$$

où E représente le module de Young et ν le coefficient de Poisson[137].

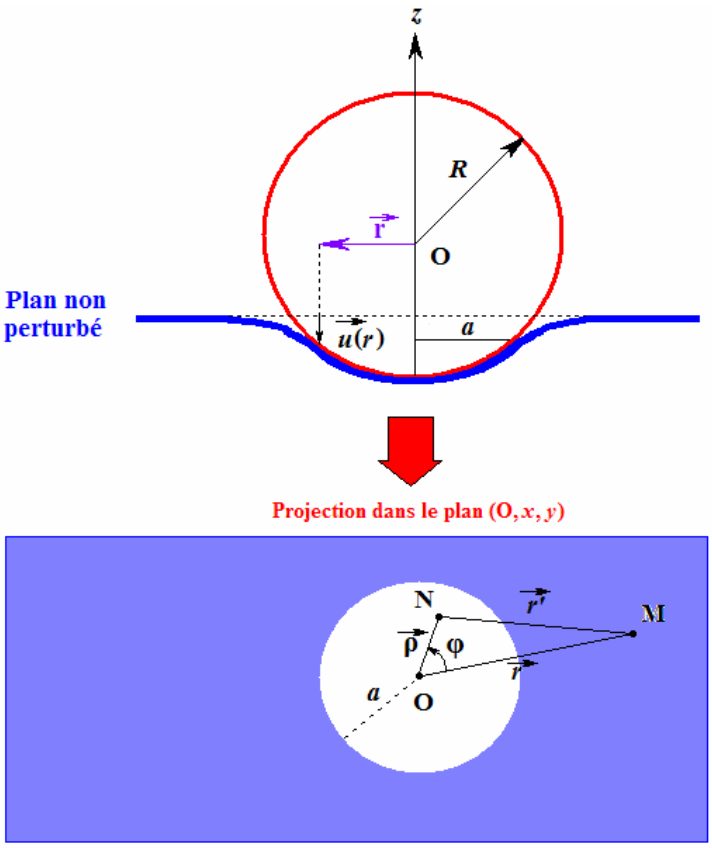


Figure 1.3.1-1 Déformation d'un matériau sous l'action d'une distribution de pression.
La distribution de pression correspond ici à l'indentation par une sphère de rayon R. La force résultante est orthogonale au plan non perturbé. a désigne le rayon du cercle de contact.

Si la force ponctuelle est remplacée par une distribution de pression que nous supposerons à symétrie centrale, $p(\rho)$, étendue à un disque de rayon a ($0 \le \rho \le a$), centré à l'origine des coordonnées (cf. figure 1.3.1-1), la déformation du matériau à la distance radiale r ($0 \le r < \infty$) résulte de la contribution élémentaire de tous les points intérieurs au disque :

$$u(r) = \frac{1-\nu^2}{\pi E}\int_0^a \left[\int_0^{2\pi} \frac{p(\rho)}{r'} d\varphi\right] \rho d\rho \qquad (1.3\text{-}3)$$

où $r' = (r^2 + \rho^2 - 2r\rho\cos\varphi)^{1/2}$ est le module du vecteur $\mathbf{r}' = \mathbf{r} - \boldsymbol{\rho}$. L'intégration sur l'angle polaire, φ, conduit à :

$$u(r) = \frac{4(1-\nu^2)}{\pi E}\int_0^a \frac{\mathrm{K}\left(\frac{2\sqrt{r\rho}}{r+\rho}\right)}{r+\rho} p(\rho)\rho d\rho \qquad (1.3\text{-}4)$$

où **K** représente l'intégrale elliptique complète de première espèce[138].

Théorie de Hertz

La théorie de Hertz (1881)[45] sur les contacts mécaniques est l'une des plus anciennes dans ce domaine. Dans ce modèle, on suppose que le contact a lieu en l'absence d'adhésion. Sous l'effet d'une force normale, *F*, le rayon *a* du cercle de contact entre un paraboloïde de rayon de courbure *R* et un échantillon plan d'épaisseur infini est donné par[48] :

$$a = \left(\frac{RF}{K}\right)^{1/3} \text{ avec } \frac{1}{K} = \frac{3}{4}\left(\frac{1-\nu_S^2}{E_S} + \frac{1-\nu^2}{E}\right) \qquad (1.3\text{-}5)$$

où ν_S, ν, E_S et *E* sont respectivement les coefficients de Poisson et les modules de Young de la sonde S et du matériau. La déformation élastique ou indentation créée par le contact de la sphère avec le plan est définie par :

$$\delta = \frac{a^2}{R} \qquad (1.3\text{-}6)$$

Pour une sonde très rigide par rapport au matériau, la relation entre la force *F* et la déformation δ s'écrit :

$$F = \frac{4ER^{1/2}}{3(1-\nu^2)}\delta^{3/2} \qquad (1.3\text{-}7)$$

La distribution de pression établie par Hertz est de type ellipsoïdal, et s'écrit[48] :

$$p(r) = p_0\sqrt{1-\frac{r^2}{a^2}} \text{ avec } p_0 = \frac{2Ea}{\pi R(1-\nu^2)} \qquad (1.3\text{-}8)$$

La loi 1.3-7 peut être retrouvée en introduisant cette distribution de pression et la relation 1.3-6 dans l'expression générale 1.3-4, appliquée en $r = 0$ puisque l'indentation δ est donnée par la déformation le long de l'axe de révolution de l'indenteur ($\delta \equiv u(0)$).

Approche de Sneddon

Les relations 1.3-6 et 1.3-7 ne s'appliquent en toute rigueur qu'à un indenteur en forme de paraboloïde[120]. Le calcul de la relation entre force et indentation a été étendu par Sneddon[46] à différents profils axisymétriques de l'indenteur (cylindre, cône, paraboloïde et sphère) et plus généralement à tout indenteur de révolution dont le profil peut s'exprimer par un développement en série de la distance radiale. Pour quelques formes géométriques simples, les relations entre la force F et l'indentation δ s'écrivent :

1) Pour un cylindre de rayon R appuyant sur le matériau par sa base :

$$F = \frac{2ER}{1-\nu^2}\delta \tag{1.3-9}$$

2) Pour un cône de demi-angle α :

$$F = \frac{2E\tan\alpha}{\pi(1-\nu^2)}\delta^2 \tag{1.3-10}$$

3) Pour un paraboloïde d'équation $z(r) = \sqrt{4kr}$ où k est une constante arbitraire :

$$F = \frac{4E\sqrt{2k}}{3(1-\nu^2)}\delta^{3/2} \tag{1.3-11}$$

4) Pour une sphère de rayon R et un rayon du cercle de contact a :

$$\delta = \frac{a}{2}\ln\left(\frac{R+a}{R-a}\right) \tag{1.3-12}$$

$$F = \frac{E}{2(1-\nu^2)}\left[(R^2+a^2)\ln\left(\frac{R+a}{R-a}\right) - 2aR\right] \tag{1.3-13}$$

On remarquera que l'équation 1.3-11 n'est autre que celle de Hertz (avec $2k = R$), comme il se doit puisqu'elle correspond au paraboloïde. Par ailleurs, quand a est très petit par rapport à R, l'équation 1.3-12 se réduit à $\delta = \frac{a^2}{R}$ (cf. équation 1.3-6). Ceci explique pourquoi, en pratique, on utilise fréquemment la relation de Hertz pour un indenteur sphérique. Puisque $a \approx R^{1/2}\delta^{1/2}$, on peut tenter d'exprimer le rayon du cercle de contact par le produit de $R^{1/2}\delta^{1/2}$ et d'un développement en série des puissances entières de δ :

$$a = R^{1/2}\delta^{1/2}\left(1 + b_1\delta + b_2\delta^2 + b_3\delta^3 + b_4\delta^4 + \cdots\right) \tag{1.3-14}$$

En insérant cette équation dans l'équation 1.3-12, on trouve :

$$b_1 = -\frac{1}{6R},\ b_2 = -\frac{1}{360R^2},\ b_3 = \frac{11}{5040R^3},\ b_4 = \frac{1357}{18114400R^4},\ \cdots \tag{1.3-15}$$

En remplaçant *a* par son expression 1.3-14 avec les coefficients donnés par 1.3-15 dans l'équation 1.3-13, on obtient :

$$F = \frac{4E}{3(1-\nu^2)} R^{1/2} \delta^{3/2} \left(1 - \frac{1}{10}\frac{\delta}{R} - \frac{1}{840}\frac{\delta^2}{R^2} + \frac{11}{15120}\frac{\delta^3}{R^3} + \frac{1357}{6652800}\frac{\delta^4}{R^4} + \cdots \right) \qquad (1.3\text{-}16)$$

Quand $\delta/R < 0{,}1$ cette expression montre que l'approximation de la force d'interaction par le modèle de Hertz diffère de moins de 1% de la solution exacte de Sneddon. Cela signifie qu'en utilisant la théorie de Hertz au lieu de l'approche de Sneddon, pour un indenteur sphérique, l'erreur induite dans les équations a un impact négligeable sur l'estimation du module de Young. Ainsi, pourvu que l'indentation reste petite par rapport au rayon de la sonde sphérique, on peut, sans commettre d'erreur notable, substituer la relation de Hertz, plus simple, à celle de Sneddon, avec l'hypothèse conservée que le matériau ne se rigidifie pas au cours de la déformation.

L'obtention des coefficients données en 1.3-15 et de l'expression 1.3-16 est grandement facilitée par l'usage d'un logiciel de calcul formel tel que « Maple » (Maple V release 5.1, Waterloo Maple Inc., Waterloo, Ontario, Canada).

Correction d'épaisseur finie de l'échantillon

Le modèle de Dimitriadis *et al*.[49] est une variante récente du modèle hertzien basée sur les mêmes hypothèses que la théorie de Hertz, à savoir que le modèle n'est valable que pour des petites déformations.

Les matériaux sont toujours supposés isotropes et élastiques linéaires. Ils sont caractérisés par deux paramètres intrinsèques, le module de Young, *E*, et le coefficient de Poisson, ν, ainsi que par leur épaisseur finie, *h*, et reposent sur un support plan infiniment rigide (figure 1.3.1.-2).

Pour un échantillon d'épaisseur *h*, la relation entre la force *F* et la déformation δ s'exprime par le produit de la loi de Hertz et d'un polynôme correctif en $\chi = \frac{\sqrt{R\delta}}{h}$:

$$F = \frac{4E}{3(1-\nu^2)} R^{1/2} \delta^{3/2} \left[1 - \frac{2\alpha_0}{\pi}\chi + \frac{4\alpha_0^2}{\pi^2}\chi^2 - \frac{8}{\pi^3}\left(\alpha_0^3 + \frac{4\pi^2}{15}\beta_0 \right)\chi^3 + \frac{16\alpha_0}{\pi^4}\left(\alpha_0^3 + \frac{3\pi^2}{5}\beta_0 \right)\chi^4 \right] \qquad (1.3\text{-}17)$$

où α_0 et β_0 sont des fonctions du coefficient de Poisson du matériau. Quand l'échantillon n'est pas fixé au substrat, on a :

$$\alpha_0 = -0{,}347\frac{3-2\nu}{1-\nu} \tag{1.3-18}$$

$$\beta_0 = 0{,}056\frac{5-2\nu}{1-\nu} \tag{1.3-19}$$

Dans le cas contraire, les expressions de α_0 et β_0 deviennent :

$$\alpha_0 = -\frac{1{,}2876 - 1{,}4678\nu + 1{,}3442\nu^2}{1-\nu} \tag{1.3-20}$$

$$\beta_0 = \frac{0{,}6387 - 1{,}0277\nu + 1{,}5164\nu^2}{1-\nu} \tag{1.3-21}$$

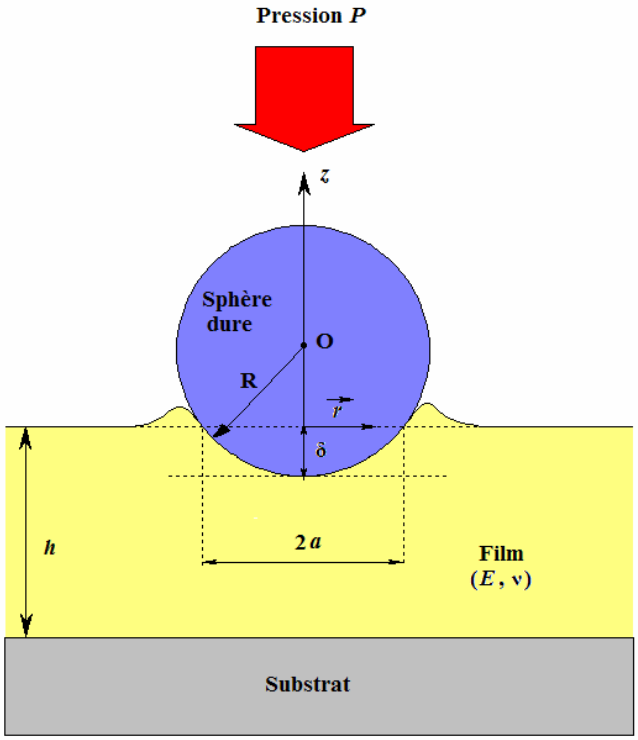


Figure 1.3.1-2 Contact mécanique entre un film d'épaisseur finie et une sphère dure.

Si le matériau testé est incompressible (ν = 0,5), l'expression de la force appliquée en fonction de l'indentation s'écrit :

$$F = \frac{16E}{9}R^{1/2}\delta^{3/2}\left[1 + 0{,}884\chi + 0{,}781\chi^2 + 0{,}386\chi^3 + 0{,}0048\chi^4\right] \tag{1.3-22}$$

dans le cas d'un matériau non fixé à un substrat, et

$$F = \frac{16E}{9}R^{1/2}\delta^{3/2}\left[1 + 1{,}133\chi + 1{,}283\chi^2 + 0{,}769\chi^3 - 0{,}0975\chi^4\right] \tag{1.3-23}$$

dans le cas d'un matériau fixé à un substrat. La loi générale, tenant compte de l'épaisseur de l'échantillon, peut donc s'écrire sous la forme :

$$F = \frac{4ER^{1/2}}{3(1-\nu^2)}\delta^{3/2} f_{\mathrm{D}} \tag{1.3-24}$$

où f_{D} est le polynôme de degré 4 en χ qui apparaît dans les expressions 1.3-17, 22 ou 23. L'équation (1.3-24) peut être réécrite sous la forme équivalente :

$$\delta^{3/2} f_{\mathrm{D}} = \frac{3(1-\nu^2)}{4R^{1/2}}\,\frac{F}{E} \tag{1.3-25}$$

L'utilité de cette formulation, qui semble redondante par rapport à 1.3-24, apparaîtra au paragraphe suivant.

Les équations décrites précédemment sont valides pour des déformations très petites, c'est-à-dire que $\delta_{max} << h$ afin que les mesures soient effectuées dans le domaine de linéarité du matériau. Par ailleurs Dimitriadis *et al*. ont fixé une borne supérieure au paramètre χ telle que : $\chi \leq 1$[49]. Si on considère que la linéarité est préservée tant $\delta_{max} \leq 0{,}1\ h$, on aboutit à la condition suivante : $h \geq 0{,}1\ R$.

1.3.2 Théories des matériaux viscoélastiques

La description formelle de l'indentation d'un matériau viscoélastique pose le problème de la dépendance temporelle de la déformation en raison de la dissipation d'énergie due à la viscosité du milieu, que la force appliquée par la sonde à l'échantillon soit constante ou elle-même fonction du temps. Les équations déterminées pour un contact élastique (relation entre force et indentation décrite par les modèles de Hertz, Sneddon ou Dimitriadis) peuvent être transposées à un contact viscoélastique comme le rappelle Johnson au chapitre 6 (page 188) de son ouvrage *Contact mechanics*[50]. Cette transposition fait appel aux notions de module de relaxation, $E_{\mathrm{R}}(t)$, qui est une fonction du temps, t, et de fonction de fluage (parfois appelée « complaisance » de l'anglais « compliance ») $J(t)$, qui est également une fonction du temps. Les fonctions $E_{\mathrm{R}}(t)$ et $J(t)$ vérifient les relations[137, 139] :

$$\int_0^t E_{\mathrm{R}}(t-t')\ J(t')dt' = \int_0^t J(t-t')\ E_{\mathrm{R}}(t')dt' = t \tag{1.3-26}$$

Comme ces relations impliquent une intégrale de convolution, il peut être commode d'appliquer la transformation de Laplace, notée **L**, aux deux membres de l'équation[52] :

$$\mathbf{L}[E_{\mathrm{R}}(t)]\ \mathbf{L}[J(t)] = \mathbf{L}(t) \tag{1.3-27}$$

Il s'ensuit que :

$$\overline{E_{\mathrm{R}}}(s)\overline{J}(s)=\frac{1}{s^2} \tag{1.3-28}$$

où les barres indiquent les transformées de Laplace et s représente la variable de Laplace. On peut donc, en principe, obtenir la fonction de fluage si l'on connaît le module de relaxation et *vice versa* en faisant appel à la transformation de Laplace inverse :

$$J(t)=\mathbf{L}^{-1}\left(\frac{1}{\overline{E_{\mathrm{R}}}(s)s^2}\right) \tag{1.3-29a}$$

$$E_{\mathrm{R}}(t)=\mathbf{L}^{-1}\left(\frac{1}{\overline{J}(s)s^2}\right) \tag{1.3-29b}$$

Cependant, même si ces opérations sont réalisables de manière analytique, elles conduisent souvent à des expressions trop lourdes pour être exploitées en pratique, comme nous l'indiquerons ci-dessous.

Dans une expérience de nanoindentation par AFM, il est naturel de considérer que la cause est la force $F(t)$, qui se déduit de la déflexion mesurée, $d(t)$, du cantilever, et que l'effet est la déformation du matériau. En fait, on pourrait *a priori* tout aussi bien appréhender le processus en inversant les rôles de la force et de l'indentation, ce qu'expriment les deux relations équivalentes, (1.3-24) si l'indentation est la cause et, (1.3-25) si la force est la cause. En vérité, comme dans nos expériences à l'AFM, seule la vitesse d'approche de la céramique piézoélectrique est contrôlée, il n'y a pas d'argument expérimental pour privilégier une manière de percevoir la question plutôt que l'autre. Si l'on opte pour le choix plus naturel de prendre la force pour cause, on est amené à s'appuyer sur l'équation (1.3-25). Le rapport $\frac{F}{E}$ doit y être remplacé par l'intégrale de superposition de Boltzmann impliquant la fonction de fluage[50] :

$$\delta^{3/2}(t)f_{\mathrm{D}}[\delta(t)]=\frac{3(1-\nu^2)}{4R^{1/2}}\int_0^t J(t-t')\,\frac{dF(t')}{dt'}\,dt' \tag{1.3-30}$$

Par la suite, nous écrirons $X_{\mathrm{m}}(t)$ au lieu de $\delta^{3/2}(t)f_{\mathrm{D}}[\delta(t)]$ pour alléger la notation, où l'indice "m" indique qu'il s'agit d'une quantité issue du modèle. Si la correction d'épaisseur finie n'était pas prise en compte, on retrouverait le cas plus simple de la transposition de la formule de Hertz, donné à titre d'exemple par Johnson[50]. Il peut être utile de rappeler que l'emploi de l'équation (1.3-30) suppose que :

- les caractéristiques du matériau ne sont pas affectées par la déformation qu'il subit ; *stricto sensu*, la déformation devrait être infiniment petite, mais l'on admet que l'hypothèse de linéarité reste assez bien vérifiée jusqu'à quelques pourcents de l'épaisseur de l'échantillon[51];
- le matériau est incompressible ($\nu = 0{,}5$)[50] ;
- le rayon du cercle de contact doit être une fonction croissante du temps sur l'intervalle de temps où la relation 1.3-30 est appliquée[50] ; un moyen commode, mais restrictif, de s'en assurer consiste à vérifier que la force $F(t)$, qu'exerce la sonde sur le matériau est non décroissante en tout point de cet intervalle (condition suffisante).

Modèle viscoélastique de Zener

En considérant que le matériau viscoélastique se comporte comme une unité de Zener[58, 59] (figure 1.3.2-1), c'est-à-dire une unité constituée d'une branche élastique (module de Young E_0) montée en parallèle avec une branche viscoélastique, correspondant à une unité de Maxwell (ressort de module E_1 monté en série avec un piston de viscosité η_1), le module de relaxation $E_R(t)$ est donné par :

$$E_R(t) = E_0 + E_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_R}\right) \tag{1.3-31}$$

où τ_R est le temps de relaxation défini par le rapport η_1 / E_1 .

La fonction de fluage correspondante s'obtient par la méthode de la transformation de Laplace résumée plus haut :

$$J(t) = \frac{1}{E_0} - \frac{E_1}{E_0(E_0 + E_1)} \exp\left(-\frac{t}{\tau_C}\right) = J_0 - J_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_C}\right) \tag{1.3-32}$$

où J_0 est la complaisance relaxée, égale à l'inverse du module relaxé, et τ_C le temps de retard plus long que le temps de relaxation et définie par[51, 53, 58] :

$$\tau_C = \tau_R\left(1 + \frac{E_1}{E_0}\right) = \eta_1\left(\frac{1}{E_0} + \frac{1}{E_1}\right) \tag{1.3-33}$$

Si l'on introduisait la relation 1.3-32 dans l'équation 1.3-30, on obtiendrait :

$$X_m(t) = \frac{3(1-\nu^2)}{4R^{1/2}}\left[J_0 \int_0^t \frac{dF(t')}{dt'}dt' - J_1 \int_0^t \exp\left(-\frac{t-t'}{\tau_C}\right)\frac{dF(t')}{dt'}dt'\right] \tag{1.3-34}$$

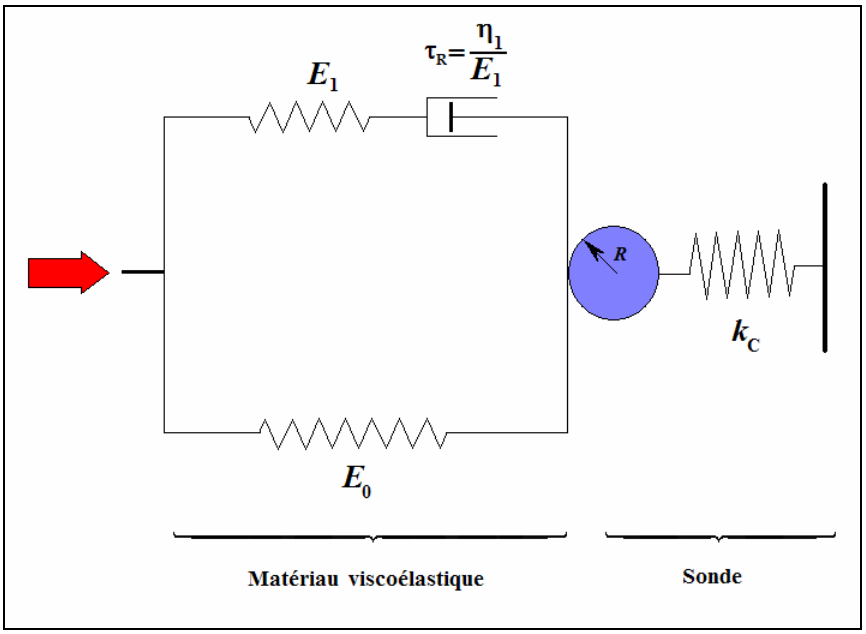


Figure 1.3.2-1 Modèle viscoélastique (élément de Zener).
Le matériau viscoélastique est schématisé par un élément de Maxwell (ressort monté en série avec un piston) monté en parallèle avec un ressort. Le cantilever et la sonde sont représentés par une sphère dure de rayon R fixée à l'extrémité du ressort de raideur k_C.

Cependant, ce modèle est très restrictif puisqu'il ne possède qu'un seul temps caractéristique. Il est aisé de généraliser le modèle de Zener par ajout d'un nombre arbitraire de branches viscoélastiques en parallèle à la première, chacune possédant un temps caractéristique propre. L'ajout d'une branche se traduit par l'ajout d'un terme de la forme $E\exp\left(-\frac{t}{\tau_R}\right)$ dans l'expression du module de relaxation. Toutefois, dès l'ajout d'une deuxième branche viscoélastique, l'expression de la fonction de fluage se complique considérablement si on l'exprime à l'aide des modules et des temps de relaxation à l'instar de l'expression 1.3-32. Toutefois, on peut encore l'écrire sous la forme :

$$J(t) = J_0 - J_1\exp\left(-\frac{t}{\tau_C^{(1)}}\right) - J_2\exp\left(-\frac{t}{\tau_C^{(2)}}\right) - \ldots \qquad (1.3\text{-}35)$$

avec $J_0 = 1/E_0$, mais sans chercher à relier $J_1, J_2, \ldots, \tau_C^{(1)}, \tau_C^{(2)}, \ldots$ à $E_0, E_1, E_2, \ldots, \tau_R^{(1)}, \tau_R^{(2)}, \ldots$ Il est donc recommandé[52] de faire appel à un modèle de matériau qui permette d'écrire la fonction de fluage sans devoir recourir à la méthode de la transformation de Laplace impliquant le module de relaxation.

Modèle viscoélastique de Kelvin

On s'intéresse ici à un modèle viscoélastique appelé unité de Kelvin constituée par définition d'un ressort de module E et d'un piston de viscosité η, montés en parallèle (figure 1.3.2-2). Les temps de relaxation et de retard sont ici tous deux égaux à $\tau = \eta/E$. La fonction de fluage prend la forme[50] :

$$J(t) = \frac{1}{E}\left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)\right] \tag{1.3-36}$$

L'équation 1.3-30 s'écrit alors :

$$X_m(t) = \frac{3(1-\nu^2)}{4R^{1/2}E}\int_0^t \exp\left(-\frac{t-t'}{\tau}\right)\frac{dF(t')}{dt'}dt' \tag{1.3-37}$$

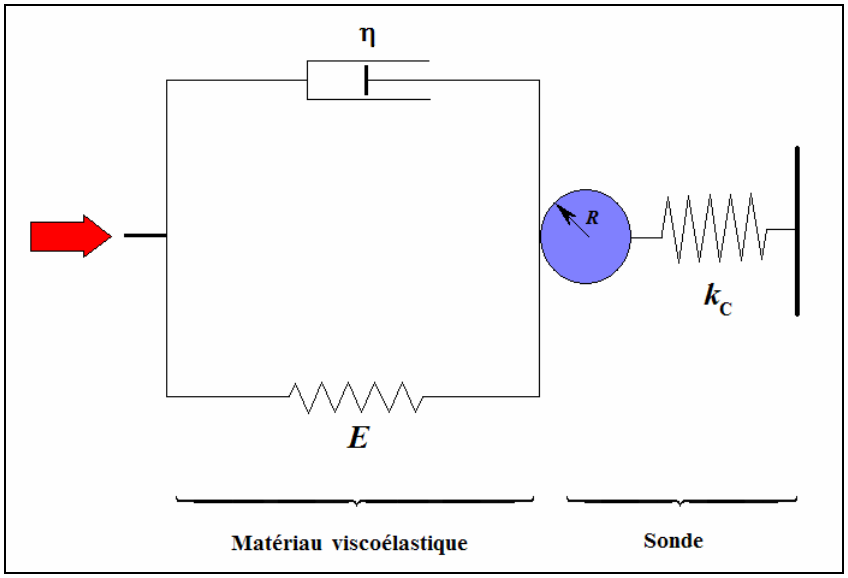


Figure 1.3.2-2 Modèle viscoélastique (unité de Kelvin).
Le matériau viscoélastique est schématisé par un élément de Kelvin (ressort monté en parallèle avec un piston), le cantilever et la sonde sont représentés par une sphère dure de rayon R fixée à l'extrémité du ressort de raideur k_C. La flèche rouge indique le sens de la contrainte appliquée au matériau.

Généralisation à un ensemble d'éléments de Kelvin montés en série

La solution décrite pour un seul élément de Kelvin peut être étendue à un système viscoélastique constitué par un empilement de N unités de Kelvin, c'est-à-dire de N ressorts (E_1, E_2, …, E_N) et N pistons (η_1, η_2, …, η_N) (figure 1.3.2-3). Ce système présente N temps

caractéristiques, appelés temps de retard dans l'expression de la fonction de fluage, notés τ_1, τ_2, …, τ_N et définis par :

$$\tau_1 = \frac{\eta_1}{E_1}, \tau_2 = \frac{\eta_2}{E_2}, \cdots, \tau_N = \frac{\eta_N}{E_N} \tag{1.3-38}$$

Comme dans un montage en série les complaisances sont additives et la fonction de fluage s'écrit :

$$J(t) = \sum_{k=1}^{N} \frac{1}{E_k}\left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_k}\right)\right] = \sum_{k=1}^{N} J_k\left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_k}\right)\right] \tag{1.3-39}$$

où $J_k = 1/E_k$. Cette expression peut aussi s'écrire :

$$J(t) = \sum_{k=1}^{N} \frac{1}{E_k} - \sum_{k=1}^{N} \frac{1}{E_k}\exp\left(-\frac{t}{\tau_k}\right) = \frac{1}{E_{eq}} - \sum_{k=1}^{N} \frac{1}{E_k}\exp\left(-\frac{t}{\tau_k}\right) \tag{1.3-40}$$

pour faire apparaître de façon explicite le module de Young à l'équilibre, E_{eq}. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les expressions 1.3-35 et 1.3-40 sont formellement identiques et donc pareillement valables pour représenter le matériau[53].

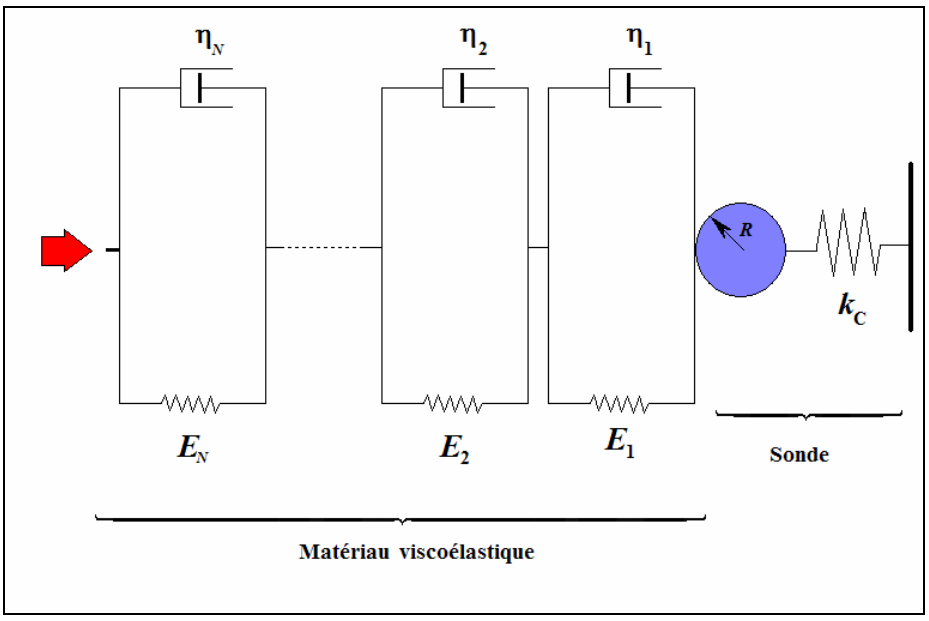


Figure 1.3.2-3 Système viscoélastique représenté par un train de *N* unités de Kelvin.

La fonction $X_m(t)$ se met alors sous la forme :

$$X_m(t) = \frac{3(1-\nu^2)}{4R^{1/2}} \sum_{k=1}^{N} \frac{1}{E_k} \int_0^t \left[1 - \exp\left(-\frac{t-t'}{\tau_k}\right)\right] \frac{dF(t')}{dt'} dt' \tag{1.3-41}$$

L'adjonction d'un ressort et d'un piston, tous deux en série avec le train d'unités de Kelvin (modèle de Burgers[44, 140]), n'est pas indispensable. En effet, si l'une des unités de Kelvin

présente un temps de retard arbitrairement bref tout en conservant un module non nul, elle se comporte comme un ressort. De façon analogue, si une unité de Kelvin présente une viscosité finie et un module arbitrairement petit ($\tau_k \rightarrow \infty$), elle se comporte comme un piston. Le modèle du train d'unités de Kelvin devrait donc permettre de rendre compte des propriétés viscoélastiques de films polymères tant réticulés que non réticulés.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

2.1 Matériels et préparations 51

2.1.1 Les polyélectrolytes utilisés 51

2.1.2 Construction des films 53

2.2 Spectroscopie de force 56

2.2.1 Description de la technique de nanoindentation 56

2.2.2 Protocole expérimental 61

2.2.3 Acquisition et traitement des données 69

2.2.4 Imageries par AFM 73

2.3 Spectroscopie infrarouge 76

2.3.1 Principes de base 76

2.3.2 Description de la technique 78

2.3.3 Traitement du signal et protocole expérimental 80

2.4 Microbalance à quartz 91

2.4.1 Principe de la mesure 91

2.4.2 Protocole expérimental 101

2.5 Ellipsométrie 105

2.5.1 Description de l'appareil 105

2.5.2 Principe de la mesure et protocole expérimental 107

2.6 Analyses biologiques 110

2.6.1 Culture des cellules de chondrosarcomes 110

2.6.2 Observations au microscope 110

2.6.3 Comptage au bleu de trypan 111

Le deuxième chapitre, exposé ci-dessous, présente les différentes techniques de caractérisation que nous avons employées durant nos travaux. En premier lieu, nous avons présenté les différentes techniques (trempage et nébulisation) utilisées dans la construction des films multicouches de polyélectrolytes. Ensuite, nous avons présenté la technique de nanoindentation par AFM et les protocoles expérimentaux (calibrage, étalonnage, …) nécessaires à la caractérisation des propriétés mécaniques des films multicouches. De plus, nous avons détaillé les procédures indispensables au traitement des données (courbes de force). Nous avons aussi montré les protocoles permettant d'obtenir des images topographiques à l'aide d'un AFM. Après, nous avons exposé la technique de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et indiqué la méthodologie ainsi les protocoles permettant l'exploitation et l'interprétation des spectres infrarouge. Dans le paragraphe suivant, nous avons expliqué le principe de la microbalance à cristal de quartz (QCM-D). Par ailleurs, nous avons exposé les protocoles expérimentaux et les procédures nécessaires au traitement des données. Les deux derniers paragraphes présentent respectivement le principe et les protocoles expérimentaux de l'ellipsométrie ainsi que la méthodologie requise pour la culture cellulaire et l'observation des cellules.

2.1 Matériels et préparations

2.1.1 Les polyélectrolytes utilisés

Les polyélectrolytes utilisés sont dissous dans une solution saline à 150 mM NaCl (eau ultrapure Mili-Q de résistivité ρ = 18,2 MΩ) pour une proportion de 1 mg de polyélectrolytes par millilitre de solution, le pH étant généralement contrôlé et ajusté autour de 6-6,5 sauf précision, avec une solution de HCl ou de NaOH à 100 mM. En effet, pour certaines expériences un contrôle rigoureux du pH est nécessaire. Dans ce cas, les polyélectrolytes sont dissous dans une solution tampon de 20 mM TRIS et 150 mM NaCl, pour laquelle le pH a été ajusté à 7,4. Plusieurs types de polyélectrolytes ont été utilisés au cours de nos travaux, leurs caractéristiques sont consignées dans les tableaux ci-dessous.

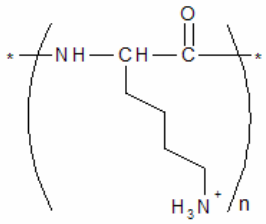
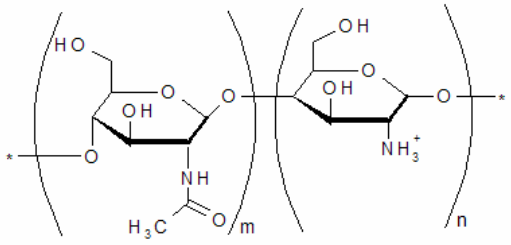
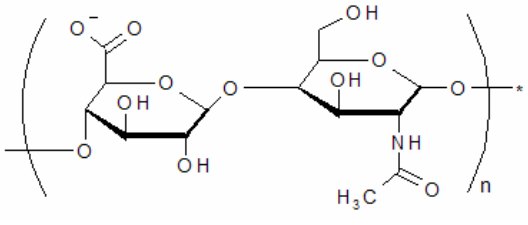
Nom	Notation (charge)	Formule développée	Fournisseur	Masse molaire
Poly-L-lysine	PLL (+)		Sigma Aldrich	27000 g/mol
Chitosan	CHI (+)		Médipol	4500 g/mol
Hyaluronate de sodium	HA (-)		BioIberica	412000 g/mol

Tableau 2.1.1-1 Polyélectrolytes commerciaux dégradables.

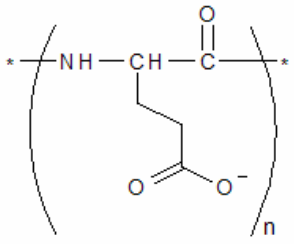
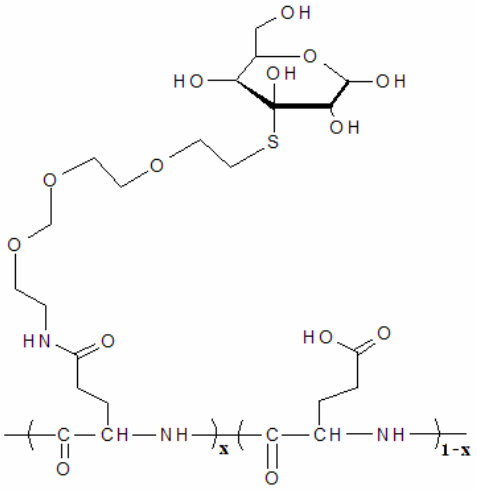
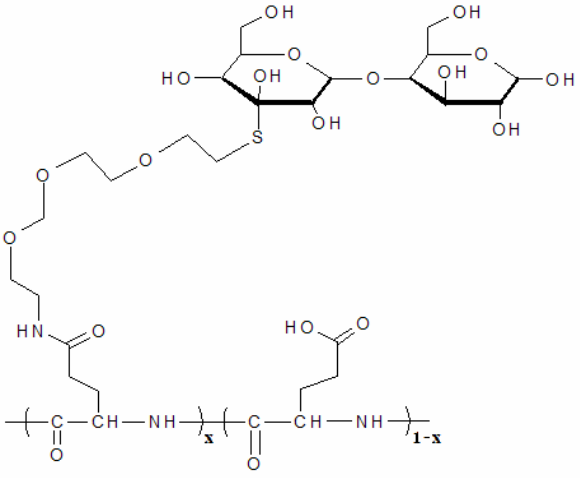
Nom	Notation (charge)	Formule développée	Fournisseur	Masse molaire
Poly acide glutamique	PGA (-)		Sigma Aldrich	70000 g/mol
Poly acide glutamique couplé au mannose	$PGA_{mannose}$ (-)		UMR 7514 CNRS,ULP	Taux de greffage 5-10%
Poly acide glutamique couplé au lactose	$PGA_{lactose}$ (-)		UMR 7514 CNRS,ULP	Taux de greffage 5-10%

Tableau 2.1.1-2 Polyélectrolytes synthétisés par la faculté de pharmacologie ou fournis par Sigma.

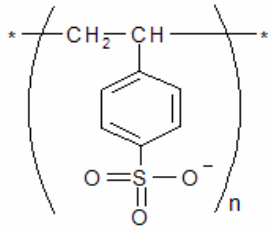
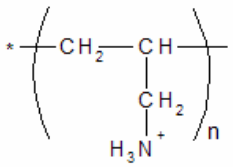
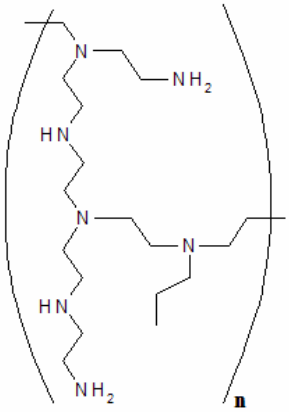
Nom	Notation (charge)	Formule développée	Fournisseur	Masse molaire
Poly (4-styrène sulfonate de sodium)	PSS (-)		Sigma Aldrich	70000 g/mol
Poly hydrochlorure d'allylamine	PAH (+)		Sigma Aldrich	70000 g/mol
Poly (éthylène imine)	PEI (+)		Sigma Aldrich	750000 g/mol

Tableau 2.1.1-3 Polyélectrolytes commerciaux non dégradables.

2.1.2 Construction des films

Lors de nos travaux, nous avons utilisé quatre types de substrats selon les expériences et la technique de caractérisation employée. Pour les expériences de spectroscopie infrarouge, nous avons utilisé un cristal de séléniure de zinc (ZnSe), pour la spectroscopie de force nous avons eu recours à des lamelles de borosilicate de 14 mm de diamètre, pour la microbalance à cristal de quartz nous avons utilisé des substrats en silice conçus spécialement pour la QCM-D et enfin, pour les mesures d'ellipsométrie ce sont des tranches (wafers) de silicium qui ont été employées.

Dans tous les cas, ces substrats ont été soigneusement nettoyés avant leur emploi pour la construction des films multicouches. Trois protocoles différents de nettoyage sont mis en œuvre suivant la nature des substrats utilisés. Ainsi, les cristaux de QCM et le cristal de ZnSe sont lavés pendant 15 minutes dans une solution de hellmanex à 2% chauffée à 70°C, puis rincés à l'eau milli-Q et encore lavés pendant 15 minutes avec une solution de HCl à 100 mM chauffée également à 70°C et enfin rincés à l'eau ultrapure et séchés sous jet d'azote. Les lamelles en borosilicate sont nettoyées pendant 15 minutes dans une solution chauffée à 70°C de SDS à 10 mM, ensuite rincées à l'eau milli-Q, puis de nouveau nettoyées pendant 15 minutes dans une solution de HCl à 100 mM chauffée à 70°C, et enfin rincées à l'eau ultrapure et séchées à l'azote. Les tranches de silicium sont lavées suivant le protocole appliqué au cristal de ZnSe mais pendant 30 minutes au lieu de 15 et à une température proche de l'ébullition.

Les films multicouches ont été élaborés selon deux méthodes de construction : l'une par trempage (« dipping ») et l'autre par nébulisation (« spraying »). Dans le premier cas (figure 2.1.2-1), les lamelles de borosilicate, chargées négativement, sont immergées pendant 10 minutes dans une solution de polycations (étape 1) préparée suivant le protocole décrit précédemment, puis rincées dans une solution saline à 150 mM NaCl (étapes 2 et 4) durant 5 à 10 minutes et ensuite dans une solution de polyanions pendant 10 minutes (étape 3). Ce cycle est répété autant de fois que nécessaire pour obtenir le nombre de bicouches désiré.

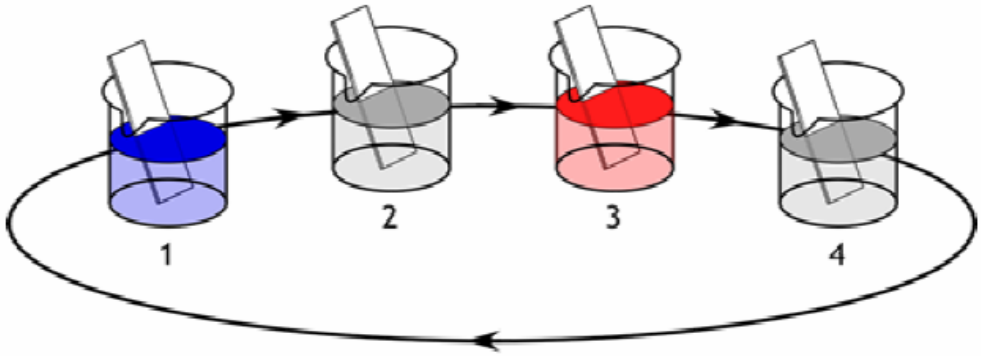


Figure 2.1.2-1 Construction d'un film multicouche par trempage.

La plupart des films étudiés ont été construits par la méthode de trempage. Cette méthode de dépôt a été facilitée par un bras automatisé (Dipping Robot DR3, Kriestein, Allemagne). Celui-ci est programmé pour déplacer de manière séquentielle les lamelles de borosilicate dans les différents bains de polyélectrolytes et de rinçage (figure 2.1.2-2).

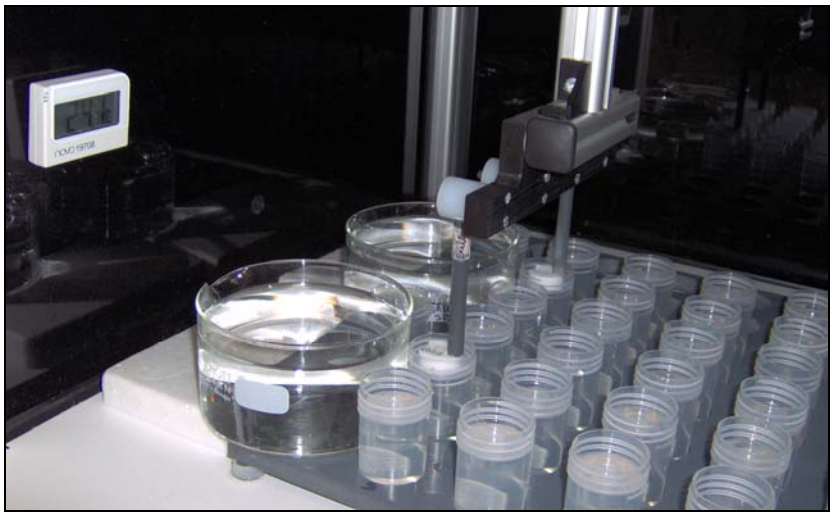


Figure 2.1.2-2 Automatisation de la construction des films (Dipping Robot DR3).

La seconde méthode de construction de multicouches (figure 2.1.2-3) consiste à déposer successivement par nébulisation, les polycations (étape 1) et les polyanions (étape 3), après un rinçage (étapes 2 et 4) du substrat (wafer de silicium) comme dans la méthode par trempage. La répétition de ce cycle permet de construire des films comportant un grand nombre de bicouches.

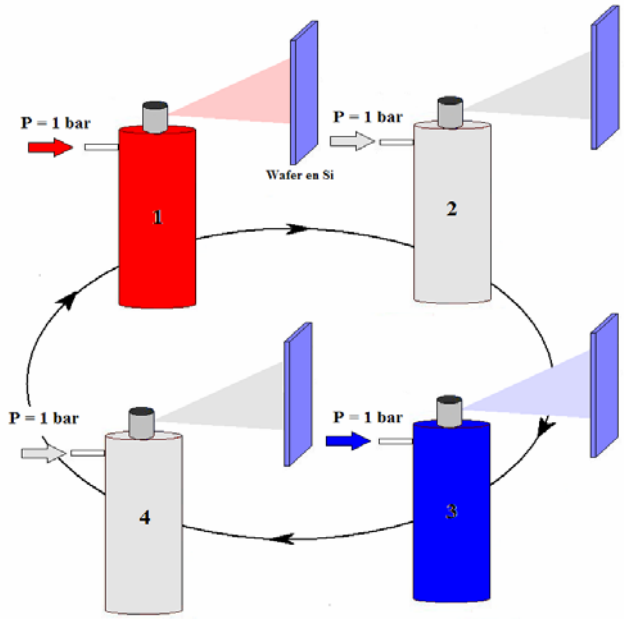


Figure 2.1.2-3 Construction des films par nébulisation.

Les temps d'adsorption et de rinçage étant plus courts que dans la méthode par trempage, la durée de construction d'un film très épais est beaucoup plus courte que dans la permière méthode. Par exemple, pour un film $(PLL/HA)_{24}$ la durée de construction passe d'une dizaine d'heures, par trempage, à quelques minutes par nébulisation[141].

2.2 Spectroscopie de force

L'indentation est une méthode assez ancienne de mesure des propriétés mécaniques des matériaux. De façon synthétique, il s'agit d'appliquer sur la surface d'un matériau, un cycle de charge-décharge localisé et d'observer la réponse élastique du matériau. La transposition de cette technique à l'échelle nanométrique, la nanoindentation, permet, grâce à une méthode développée récemment, la mesure à l'échelle locale du module de Young et de la dureté d'un matériau. Avec l'intérêt grandissant porté aux couches minces déposées sur des substrats divers, des méthodes de cartographie des propriétés mécaniques de plus en plus précises sont devenues nécessaires pour caractériser les revêtements. La nanoindentation se révèle, là encore, une méthode des plus intéressantes, puisqu'elle permet d'obtenir une réponse locale à une sollicitation mécanique donnée. Cependant, appliquée à des systèmes complexes tels que les films multicouches de polyélectrolytes, cette réponse requiert une analyse très fine par le biais de modèles.

2.2.1 Description de la technique de nanoindentation

Description de la technique

Pour la technique de nanoindentation, nous avons utilisé un AFM configuré en mode force et nanoindentation (IT-AFM). La sonde choisie pour la détermination des propriétés mécaniques des échantillons est une sphère colloïdale en borosilicate de plusieurs micromètres de diamètre. Le choix d'une sphère facilite les calculs impliqués dans le traitement des courbes de force. La forme sphérique de la sonde limite également les fortes contraintes locales que peut engendrer une sonde de forme pyramidale ou cônique. Dans la pratique, des billes calibrées sont collées à l'extrémité de cantilevers (microleviers) de constantes de raideur k_C, différentes (entre 10^{-2} et 5×10^{-1} N/m), afin d'obtenir une large gamme de sondes. La méthode utilisée pour faire les tests de nanoindentation a consisté à imposer à un échantillon une série de cycles de charge-décharge (approche-retrait). Pour cela, l'AFM fonctionne en mode non asservi. La course de l'actuateur piézoélectrique est de l'ordre de 2000 nm afin de limiter les mesures à de faibles déformations (~ 10%) du matériau étudié.

A l'aide de la sonde sphérique, on comprime l'échantillon en imposant une force perpendiculaire à la surface (figure 2.2.1-1).

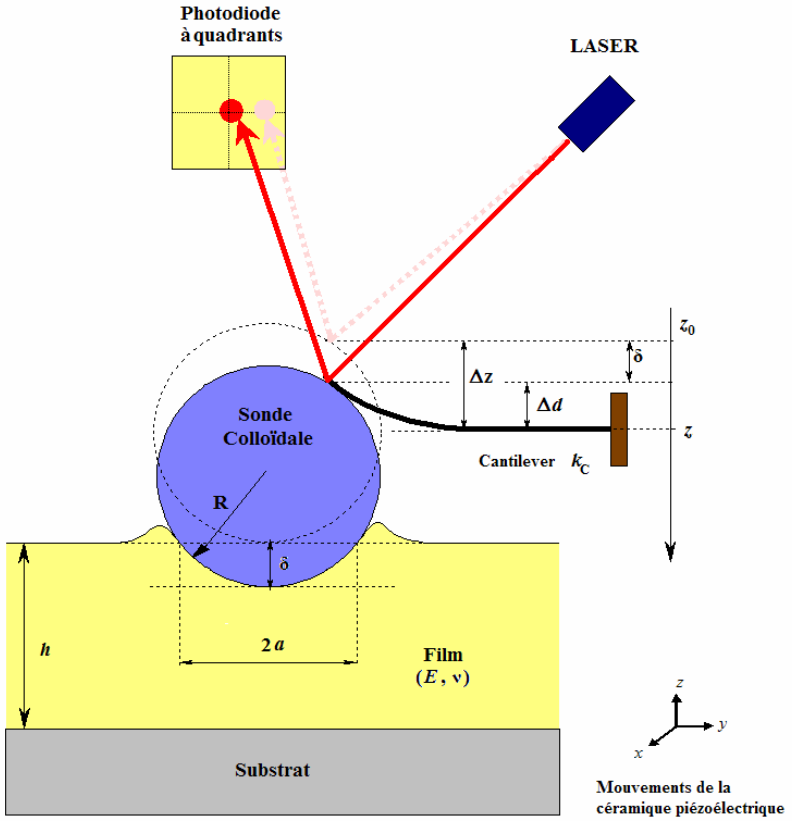


Figure 2.2.1-1 Schéma de principe de la technique de nanoindentation.

On enregistre d'une part la tension appliquée à la céramique, celle-ci conduisant à un déplacement proportionnel de l'actuateur piézoélectrique et d'autre part les déplacements du cantilever. Dans le mode non asservi de l'AFM, le mouvement du dispositif piézoélectrique est déterminé par un générateur de signaux en l'absence d'un contrôle par une boucle de contre-réaction. Dans le cas du mode asservi de l'AFM, les mouvements de l'actuateur sont soumis à un système de régulation.

Quel que soit le mode de fonctionnement choisi (asservi ou non asservi), on peut animer la céramique piézoélectrique soit d'un mouvement en forme de dents de scie (employé pour le calcul du module de Young), soit d'un mouvement en forme de créneaux. Par contre, le mouvement sinusoïdal (utilisé pour la détermination de la viscosité) est propre au mode non asservi. Il est aussi possible de superposer deux formes différentes de mouvements. La trace rouge de la figure 2.2.1-2, par exemple, correspond à la modulation par un mouvement sinusoïdal d'un déplacement en forme de créneaux.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons utilisé essentiellement le mode non asservi avec un signal triangulaire (dents de scie) pour la commande des déplacements de l'actuateur piézoélectrique. La phase dite de « charge » correspond à la phase d'approche de la sonde. Sur l'oscillogramme, la charge correspond donc à la rampe montante du signal triangulaire. La décharge, quant à elle, correspond à la phase de rétraction de la sonde, et est matérialisée par la partie descendante du signal. Comme la course totale de la céramique piézoélectrique est fixe, toute variation de la fréquence du signal triangulaire entraîne une modification de la vitesse de la sonde.

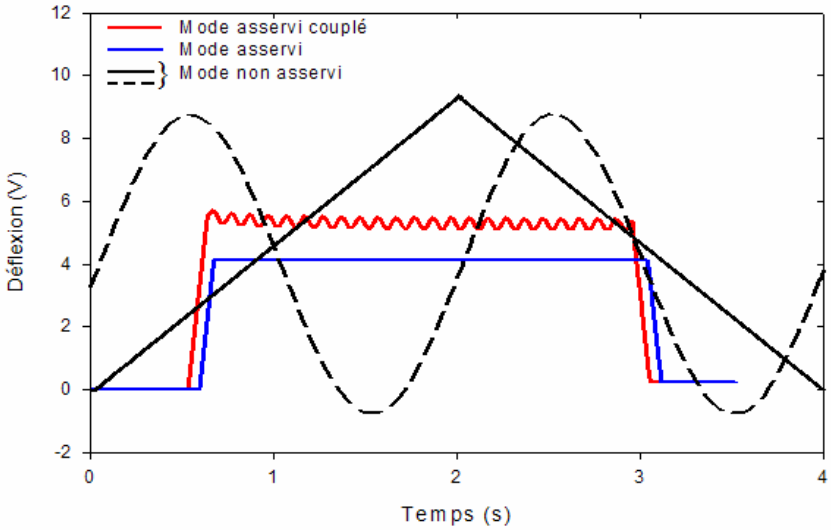


Figure 2.2.1-2 Mouvements possibles de la céramique piézoélectrique.

Principe de la technique

Grâce aux différentes théories de l'élasticité, exposées au chapitre 1, on peut traiter le régime élastique de l'indentation d'un échantillon d'épaisseur finie par un indenteur axisymétrique, le plus souvent un cône ou une sphère. Le traitement des données présenté dans ce mémoire repose sur les hypothèses suivantes :

- les frottements et l'adhésion nuls,
- les matériaux sont homogènes et isotropes,
- l'élasticité est linéaire.

Cependant, cette restriction peut être levée si l'on se réfère au modèle « des trois couches élastiques superposées »[142, 143]. Il est alors possible de traiter le cas d'un matériau qui n'est pas globalement homogène.

Les propriétés des matériaux isotropes élastiques linéaires sont entièrement décrites par deux paramètres intrinsèques :

- le module de Young, noté E (qui a la dimension d'une pression),
- le coefficient de Poisson, noté ν (qui est un nombre sans dimension).

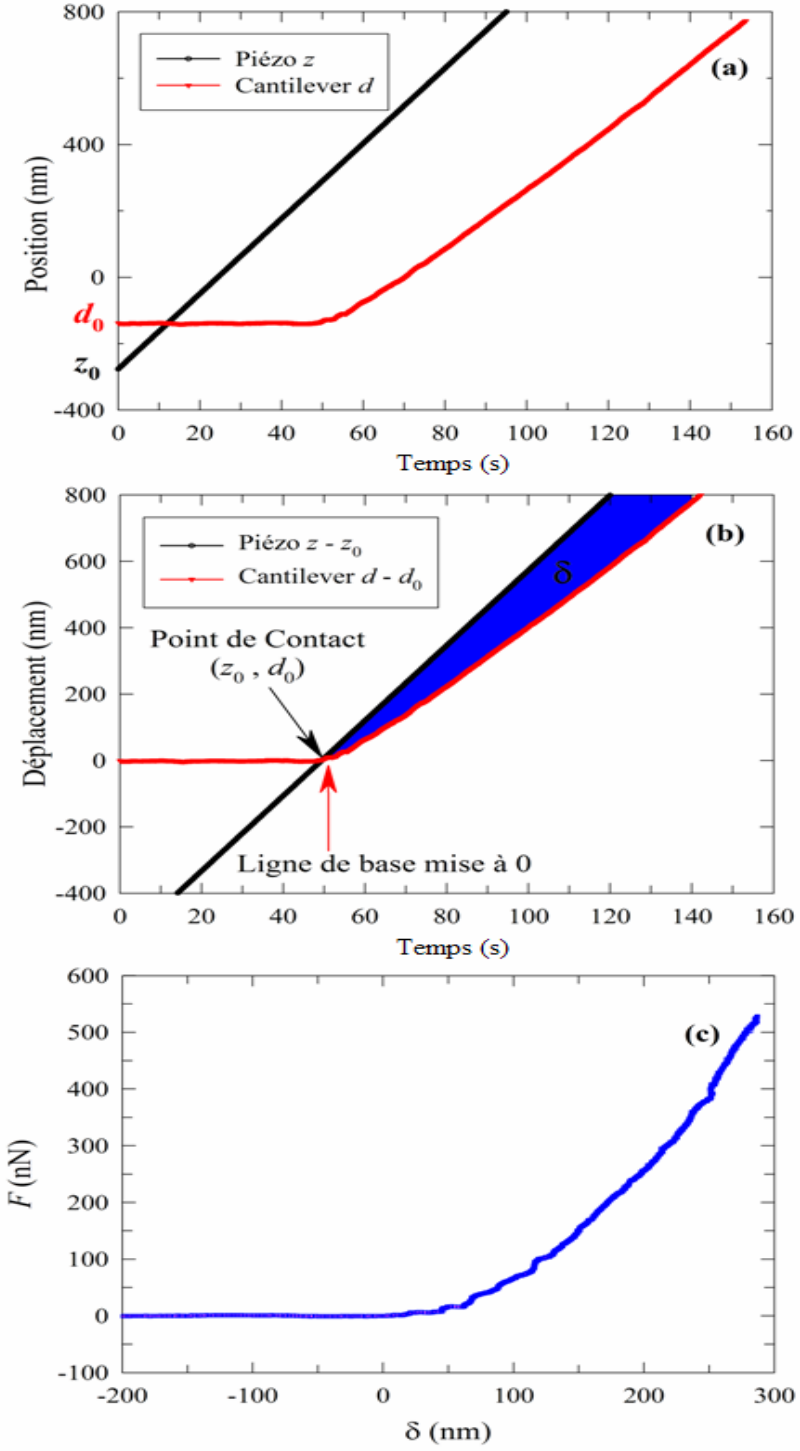


Figure 2.2.1-3 Traitement d'une courbe de force.
Positions du cantilever et de la céramique piézoélectrique en fonction du temps (a), déplacements du cantilever et de la céramique en fonction du temps (b) et force en fonction de l'indentation (c). Dans la figure c, le début du contact sonde-échantillon se situe à l'abscisse $\delta = 0$. Les valeurs négatives de l'indentation correspondent à la phase d'approche qui précède le contact.

L'étude du contact élastique entre une sonde sphérique et une surface plane a été effectuée avec un AFM configuré en mode contact. La courbe de force résultante est l'expression directe du contact mécanique et de la déformation qui en résulte. Les données recueillies sont, après conversion des tensions électriques en distances, la position du cantilever d, et la position de l'échantillon porté par la céramique piézoélectrique z, en fonction du temps t (figure 2.2.1-3a). La partie rectiligne horizontale constitue la ligne de base du mouvement du cantilever et correspond à la période précédant l'interaction entre la sonde et l'échantillon.

Le repérage du point de contact sur la courbe $d = f(t)$ (figure 2.2.1-3a) constitue une étape importante de l'exploitation des enregistrements. La localisation approximative de ce point, qui ne demande pas l'intervention de l'expérimentateur, est obtenue de la manière suivante, en partant de l'hypothèse que la ligne de base ne présente pas de dérive systématique. On construit tout d'abord l'histogramme des positions du cantilever. Cette distribution présente un pic intense correspondant aux nombreuses répétitions de la position d'équilibre du cantilever avant que la sonde n'entre en contact avec l'échantillon. Ce pic se réduirait à un pic de Dirac en l'absence des fluctuations thermiques (bruit). La position du maximum de ce pic fournit une première estimation d_1, de la valeur de la hauteur de la ligne de base à l'équilibre. Sur l'intervalle de temps s'étendant de $t = 0$ au temps correspondant à la dernière occurrence de la valeur $d = d_1$, on calcule la moyenne et l'écart type σ, des positions du cantilever. Cette moyenne constitue une estimation affinée de la position d'équilibre d_0. La déflexion (ou déplacement) du cantilever est alors donnée par $\Delta d = d - d_0$ sur l'ensemble du domaine temporel d'observation (figure 2.2.1-3b). Le point de contact est le premier point de la courbe $\Delta d = f(t)$ qui suit le dernier point de cette courbe qui vérifie $\Delta d \leq 3\sigma$. La partie « utile » de la courbe de déflexion est ainsi définie par l'ensemble ininterrompu de points de mesure pour lesquels le rapport signal à bruit est supérieur à 3.

L'indentation, nulle au point de contact, est définie par la différence entre le déplacement de la céramique et le déplacement (déflexion) du cantilever :

$$\delta = \Delta z - \Delta d = (z - z_0) - (d - d_0) \qquad (2.2\text{-}1)$$

La définition du point de contact et cette relation permettent d'affecter à z_0 sa valeur en vue de déduire des mesures les indentations sur tout le domaine temporel où la sonde interagit avec l'échantillon. Enfin, la force F, qu'exerce la sonde sur le film se déduit de la déflexion, connaissant la constante de raideur k_C, du cantilever :

$$F = k_C \Delta d \qquad (2.2\text{-}2)$$

On peut réécrire cette expression en utilisant l'équation 2.2-1 :

$$F = k_C\left[(z - z_0) - \delta\right] \tag{2.2-3}$$

en vue de représenter la force en fonction de l'indentation (figure 2.2.1-3c).

Toute loi théorique reliant F à δ peut donc à présent être ajustée à l'ensemble des points expérimentaux ($\delta \geq 0$, F) par optimisation de ses paramètres libres. Si l'on se réfère à l'expression donnée plus haut :

$$F = \frac{4E}{3(1-\nu^2)} R^{1/2}\, \delta^{3/2} f_D \tag{2.2-4}$$

on constate qu'en principe on devrait être en mesure de déterminer le module E, le coefficient de Poisson ν et l'épaisseur h, du film. Supposons d'abord que le film est infiniment épais et que par conséquent le facteur correcteur f_D, est égal à l'unité. Il est alors évident que seul le rapport, appelé module de Young relatif,

$$E_r = \frac{E}{1-\nu^2} \tag{2.2-5}$$

est un paramètre pertinent. Envisageons ensuite le cas d'un film d'épaisseur finie mais assez grand,e pour respecter l'hypothèse des déformations qui conservent la linéarité du matériau. A titre d'illustration considérons un film dont l'épaisseur vaut 5000 nm, sondé par une sphère de 2500 nm de rayon. Si l'indentation est limitée à 10% de l'épaisseur (voir sous-chapitre 1.3.1), la variable χ ne dépasse pas 0,22. Ainsi, bien que h et ν soient impliqués dans la définition de f_D, il est illusoire de vouloir extraire ces deux paramètres de l'analyse des courbes de force expérimentales. Il est prudent, sinon nécessaire, d'estimer l'épaisseur du film de façon indépendante, de fixer la valeur de ν à 0,5 par exemple, et de considérer E comme seul paramètre physique libre.

2.2.2 Protocole expérimental

Collage des billes de silice sur les cantilevers (microleviers)

La mesure des propriétés viscoélastiques des films multicouches de polyélectrolytes par IT-AFM nécessite l'emploi de sondes colloïdales adaptées au type de film analysé. En effet, en fonction de la nature du film étudié, il est très intéressant d'avoir une gamme de cantilevers plus ou moins rigides, et des sondes de tailles différentes. Nous avons utilisé aussi bien des cantilevers commerciaux équipés d'une sphère colloïdale (5 µm de diamètre) que des cantilevers conventionnels sur lesquels nous avons collé des billes de silice calibrées (20-60

µm). Le collage de ces billes est réalisé par micromanipulation sous microscope optique. Les billes sont préalablement nettoyées deux fois dans un bain d'éthanol aux ultrasons pendant 15 minutes. Ensuite, elles sont déposées sur une extrémité d'une lame de microscope. A l'autre extrémité, on dépose, à l'aide d'une micropipette, plusieurs gouttelettes de colle. Le cantilever, fixé à un « bras » automatisé, est placé au-dessus d'un point de colle qu'il doit toucher avec son extrémité seulement. Enfin, la pointe du cantilever, qui a effleuré un point de colle, est mise en contact avec une bille de silice, qui s'y colle. Ces micromanipulations sont conduites avec la plus grande minutie pour éviter de contaminer, avec de la colle, la surface réfléchissante du cantilever comme la surface « non collée » de la bille. Seules les sondes dont le collage est irréprochable seront employées pour réaliser des mesures (figure 2.2.2-1).

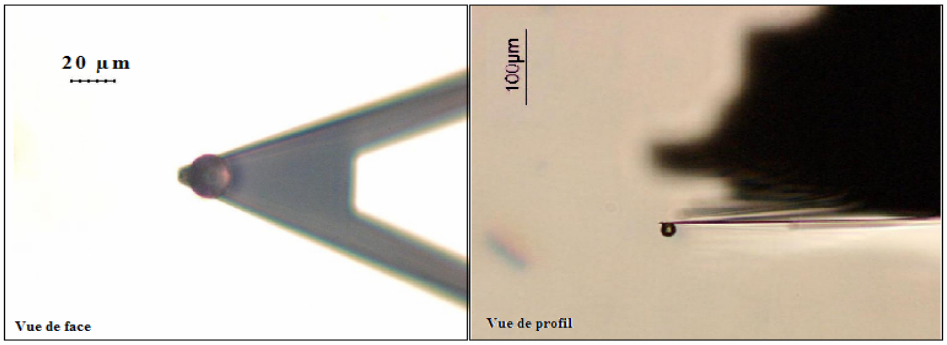


Figure 2.2.2-1 Observation microscopique d'une bille collée à l'extrémité d'un cantilever.

Les spectres thermiques des cantilevers, avant et après collage des billes, sont comparés (figure 2.2.2-2) pour vérifier que le collage de la sphère de silice n'a pas entraîné d'effet notable sur la constante de raideur du cantilever modifié.

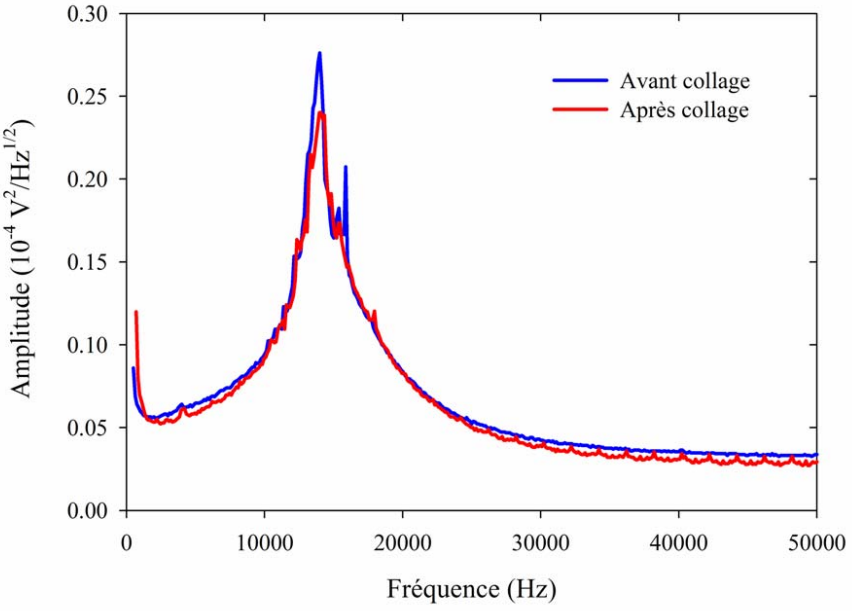


Figure 2.2.2-2 Spectre thermique d'un cantilever avant et après collage d'une bille de SiO_2.

Dans la plupart des cas, lorsque les billes ont été collées proprement et symétriquement à l'extrémité du cantilever, les spectres thermiques, avant et après collage, sont superposables.

Ces derniers montrent que les constantes de raideur des cantilevers sont équivalentes avant et après collage des billes. Bien qu'un léger décalage vers les basses fréquences et un tassement du pic puissent être observés, le calcul de l'aire sous le pic suggère que ces modifications sont négligeables et qu'elles affectent peu la constante de raideur. Avant leur emploi, les cantilevers sont nettoyés deux fois pendant 15 minutes dans un bain d'éthanol aux ultrasons. Enfin, ils sont rincés à l'éthanol et exposés aux rayons UV dans une chambre UV-tip cleaner (Bioforce Nano, Ames, Etats unis) pendant 30 minutes, afin d'éliminer les poussières et autres contaminants résiduels.

Matériel	**Caractéristiques**	**Fournisseur**
Billes de SiO_2 – B1	Nature : Borosilicate Diamètre : (20,3 $\pm$ 1,4) µm ρ_m = 2,50 g/cm^3 n = 1,56 pour λ = 589 nm	Duke Scientific Corp. Fremont, USA
Billes de SiO_2 – B2	Nature : Silicate de sodium Diamètre : (60,0 $\pm$ 3,6) µm ρ_m = 2,50 g/cm^3 n = 1,56 pour λ = 589 nm	Duke Scientific Corp. Fremont, USA
Cantilevers	Raideurs : 0,1 N/m 0,05 N/m 0,03 N/m 0,01 N/m	Veeco Instruments S.A.S. Dourdan, France
Colle	Colle époxy Araldite Cristal	Bostik S.A. Coubert, France
UV-Tip Cleaner	Chambre de Nettoyage : Rayons UV Ozone	Bioforce Nanoscience Inc. Ames, USA

Tableau 2.2.2-1 Matériels utilisés pour le collage des billes.

Les microleviers utilisés et le protocole de nettoyage

Durant nos travaux, nous avons employé deux lots de cantilevers. Le premier groupe est constitué de cantilevers commerciaux dont les billes colloïdales sont déjà fixées, alors que le second lot est constitué de cantilevers commerciaux conventionnels sur lesquels nous avons collé des billes de silice calibrées. Le protocole de nettoyage consiste, avant chaque expérience, à rincer le cantilever avec de l'éthanol et de l'eau milli-Q, à le sécher délicatement

avec un soufflet et enfin à le traiter dans la chambre de l'UV- tip cleaner, pendant 15 minutes. Les lamelles de verre servant au calibrage des cantilevers subissent le même protocole de nettoyage, après avoir été nettoyées dans des bains successifs de SDS 0,02 M et de HCl à 0,1 M pendant 15 minutes.

	Constante de raideur	**Diamètre de la sonde**
Groupe 1	0,580 N/m	5 µm
	0,380 N/m	5 µm
	0,120 N/m	5 µm
	0,060 N/m	5 µm
Groupe 2	0,100 N/m	20-60 µm
	0,050 N/m	20-60 µm
	0,030 N/m	20-60 µm
	0,010 N/m	20-60 µm

Tableau 2.2.2-2 Liste des cantilevers utilisés.

La calibration du cantilever

Avant toute expérience de mesure de force, nous avons déterminé la constante de raideur de chaque cantilever utilisé pour les différents échantillons analysés. La constante de raideur des cantilevers a été déterminée par la méthode des « fluctuations thermiques »[144-146]. Cette méthode consiste à mesurer les fluctuations de la déflexion du cantilever au repos. L'amplitude des fluctuations d'origine thermique est directement reliée à la constante de raideur du cantilever par la relation :

$$K\langle z^2\rangle = k_B T \qquad (2.2\text{-}6)$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température absolue, $\langle z^2\rangle$ la moyenne des carrés des positions du cantilever par rapport à sa position moyenne prise comme référence ($\langle z\rangle = 0$) , et K une constante proportionnelle à la constante de raideur du ressort. La valeur de $\langle z^2\rangle$ est obtenue en mesurant l'aire du pic caractéristique de la fluctuation thermique du cantilever (figure 2.2.2-3).

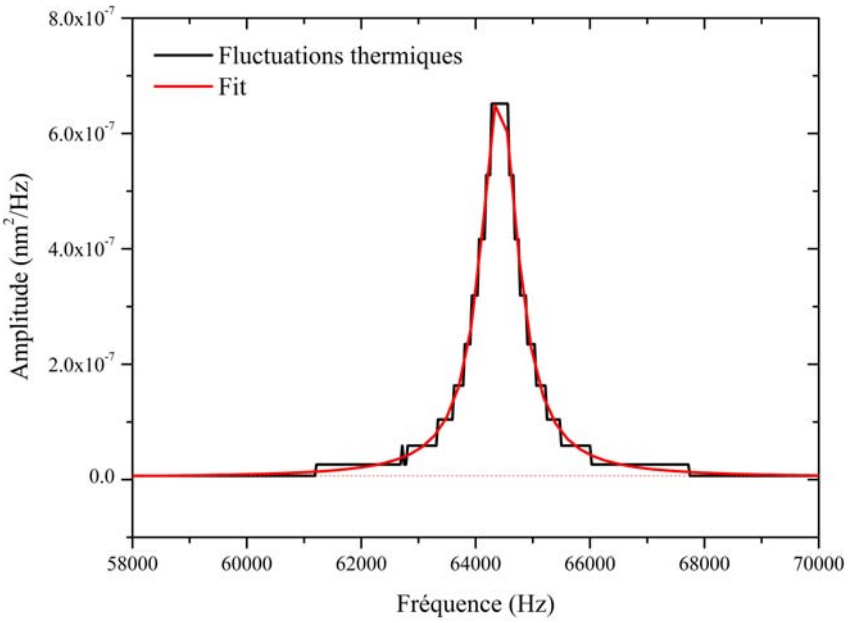


Figure 2.2.2-3 Spectre fréquentiel des fluctuations thermiques d'un cantilever dans l'air.

La constante de raideur k_C du cantilever peut se mettre sous la forme :

$$k_C = cK \tag{2.2-7}$$

En introduisant (2.2-6) dans (2.2-7), on peut définir la constante de raideur du ressort par l'équation :

$$k_C = c\frac{k_B T}{\langle z^2 \rangle} \tag{2.2-8}$$

Le coefficient c est une constante géométrique propre à la forme et au type du cantilever[145]. Dans notre cas, nous avons utilisé des cantilevers de référence de forme triangulaire. Pour évaluer la constante c, nous avons procédé à l'acquisition des spectres thermiques de cantilevers commerciaux dont les constantes de raideurs k_C ont été préalablement déterminées par le constructeur. Les spectres thermiques ont été déterminés à la fois dans l'air et dans une solution de tampon, car toutes les mesures de force ont été conduites en solution. Les spectres thermiques obtenus en solution sont différents de ceux obtenus dans l'air. En effet, dans l'eau les spectres sont plus aplatis et décalés vers les basses fréquences. Cependant, les aires mesurées sous les pics dans l'air et en solution sont équivalents. Ces mesures vérifient le fait que la constante de raideur des cantilevers est indépendante de la nature du milieu dans lequel on opère.

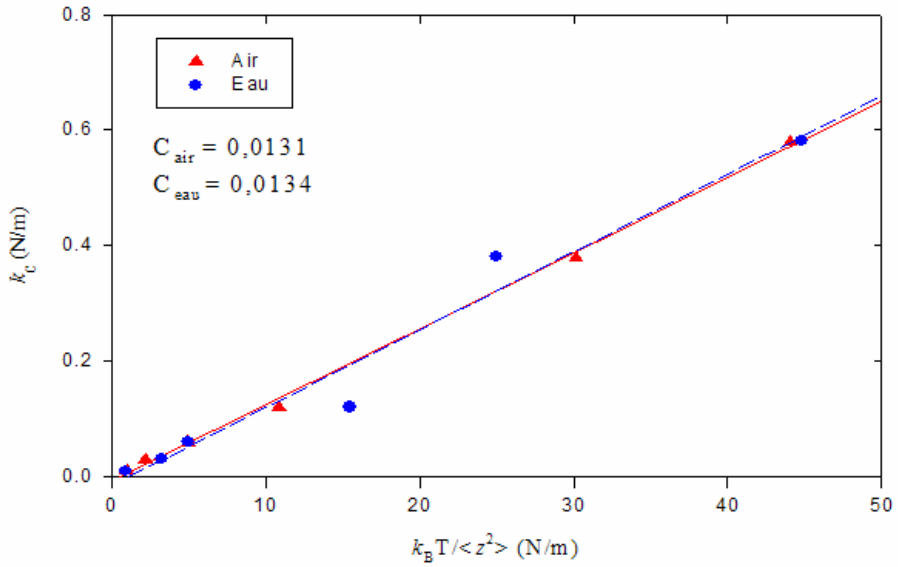


Figure 2.2.2-4 Détermination de la constante caractéristique des cantilevers.

Nous avons ensuite tracé k_C (valeurs de références) en fonction de K afin de déterminer la constante géométrique des cantilevers[145].

	Groupe 1				**Groupe 2**			
Valeurs du fournisseur (N/m)	0,580	0,380	0,120	0,060	0,100	0,050	0,030	0,010
Aires des pics dans l'air (nm²)	$7{,}63\times10^{-5}$	$1{,}35\times10^{-4}$	$3{,}47\times10^{-4}$	$7{,}43\times10^{-4}$	$3{,}62\times10^{-4}$	$8{,}22\times10^{-4}$	$1{,}52\times10^{-3}$	$2{,}94\times.10^{-3}$
Aires des pics dans l'eau (nm²)	$8{,}18\times10^{-5}$	$1{,}42\times10^{-4}$	$3{,}60\times10^{-4}$	$8{,}06\times10^{-4}$	$3{,}81\times10^{-4}$	$8{,}51\times10^{-4}$	$1{,}85\times10^{-3}$	$3{,}82\times10^{-3}$
Valeurs calculées dans l'air (N/m)	0,539	0,305	0,118	0,055	0,114	0,050	0,027	0,014

Tableau 2.2.2-3 Constantes de raideur mesurées.

Les mesures montrent que la constante c est également indépendante du milieu dans lequel les mesures ont été effectuées. La valeur de la constante c (calculée pour des cantilevers de référence), est de l'ordre de 10^{-2}. On peut alors définir la formule suivante, pour calculer la constante de raideur de nos microleviers :

$$k_C \approx 1{,}3\times10^{-2}\left[\frac{k_B T}{\langle z^2\rangle}\right] \qquad (2.2\text{-}9)$$

Les valeurs obtenues, pour les différents cantilevers utilisés, diffèrent de 10 à 30% par rapport aux valeurs indiquées par les fournisseurs.

Calibration de la céramique piézoélectrique

La calibration et la vérification de la linéarité du déplacement de l'actuateur piézoélectrique sont des étapes indispensables en vue du traitement des courbes de force. La dilatation de la céramique piézoélectrique dépend à la fois de la différence de potentiel appliquée à ses électrodes et de la fréquence du signal délivré par le générateur de signaux. Les références précises de la céramique piézoélectrique employée ont été déterminées pour une fréquence de 0,5 Hz ou pour une variation de la tension électrique appliquée de 10 V/s. Cette mesure nous indique que la dilatation du dispositif piézoélectrique est de 208 nm/V pour une fréquence de 0,5 Hz. La course maximale de dilatation est de 2000 nm.

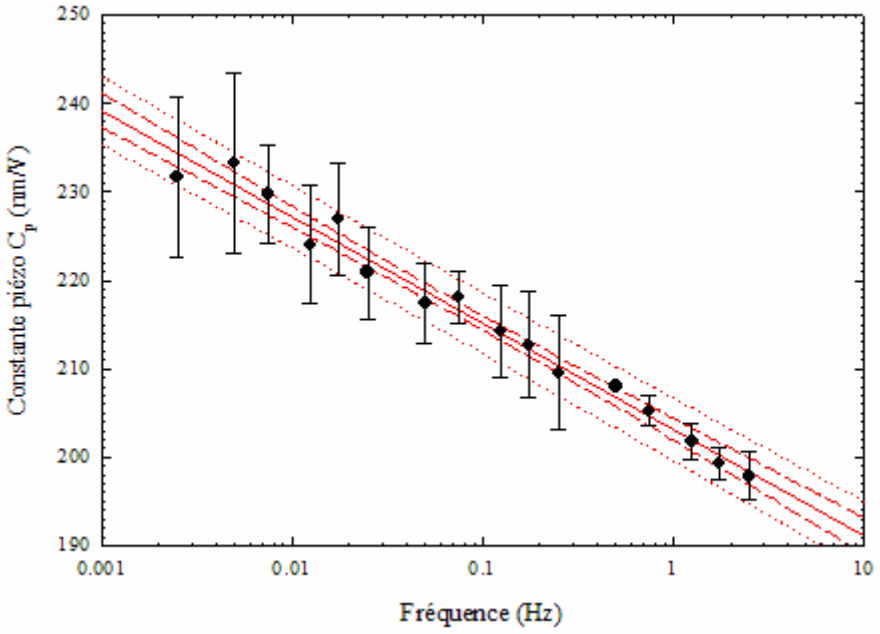


Figure 2.2.2-5 Variation de la constante de conversion de la céramique piézoélectrique.
Variations en fonction de la fréquence de la tension électrique qui lui est appliquée (signal en dents de scie).

Quand l'AFM est utilisé en mode dynamique, c'est-à-dire à vitesse d'approche variable, il est essentiel de connaître le comportement de l'actuateur piézoélectrique en fonction de la fréquence de sollicitation[147]. En effet, la dilatation de la céramique en fonction de la fréquence *f*, suit une loi de la forme suivante (figure 2.2.2-5) :

$$C_P(f) = C_0 - a\log(f) \qquad (2.2\text{-}10)$$

Nous avons alors mesuré la dilatation de la céramique pour des fréquences variant de 10^{-2} à 10 Hz, c'est-à-dire pour des fréquences couvrant le domaine d'étude dynamique que nous avons envisagé. Il ressort de ces mesures que l'équation fréquentielle du dispositif piézoélectrique est :

$$C_P(f) \approx 204 - 12\log(f) \qquad (2.2\text{-}11)$$

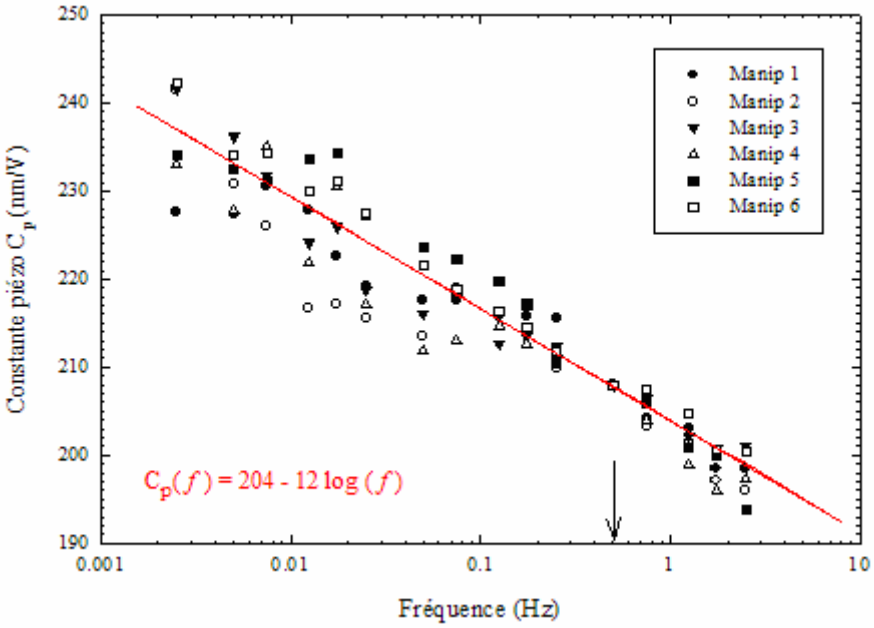


Figure 2.2.2-6 Reproductibilité de l'équation de la céramique piézoélectrique.

Avant chaque utilisation de l'AFM, nous avons effectué ces mesures afin de vérifier que notre céramique piézoélectrique obéit toujours à cette équation (figure 2.2.2-6).

Nous avons aussi effectué la calibration du système de détection optoélectronique (photodiode à quadrants) lors de ces mesures sur l'actuateur piézoélectrique. Toutes les mesures de calibration ont été effectuées sur des lamelles de verre nettoyées selon le protocole décrit dans le sous chapitre précédent (2.1.2). Ces lamelles ont un module de Young de l'ordre de 70 Gpa,[148] et peuvent être considérées comme infiniment rigides par rapport aux échantillons que nous avons étudiés. Ainsi, la déflexion du cantilever enregistrée sur ces substrats reflète le mouvement réel de l'actuateur piézoélectrique. Connaissant la constante du dispositif piézoélectrique, on est alors en mesure de convertir l'information enregistrée par la photodiode (en volts) en distance (en nm). Cette constante est notée par la suite $C_{détect}$. Cette dernière est déterminée avant et après chaque expérience. $C_{détect}$ varie très peu durant les expériences. Les déviations relevées par rapport aux mesures réalisées avant expérience sont inférieures à 5%.

Paramétrage du mode force

Pour nos mesures de force, nous disposons d'un AFM qui fonctionne en trois modes. Le premier mode est dit « asservi », en effet, une boucle rétroactive contrôle la dilatation de la céramique piézoélectrique. Le second mode est dit « non asservi », parce que dans ce cas, l'actuateur piézoélectrique est commandé, sans aucune régulation, par un générateur de signaux. Le dernier mode de fonctionnement est dit « couplé » puisque dans ce cas, un signal délivré par un générateur de signaux se superpose à la commande régulée, par le mode asservi, du dispositif piézoélectrique.

2.2.3 Acquisition et traitement des données

Déroulement de l'expérience et acquisition des courbes de force

Avant toute mesure de force, nous avons effectué la calibration de l'actuateur piézoélectrique sur une lamelle de verre, afin de déterminer la constante du détecteur optoélectronique, la photodiode à quadrants, ($C_{\text{détect.}}$ En nm/V), et de vérifier l'équation fréquentielle de l'actuateur ($C_{\text{piézo}}(f)$ en nm/V). Après ces vérifications préliminaires, la lamelle de verre est soigneusement retirée de la cellule de mesure, en évitant tout déplacement du laser. Nous avons utilisé un IT-AFM construit par notre laboratoire (soutien INSERM par le contrat APEX 99-3) qui permet justement des remplacements d'échantillons, sans avoir à refocaliser le laser. En effet, il est possible d'éloigner manuellement la céramique piézoélectrique du cantilever puis, à l'aide d'une pincette, de retirer la lamelle pour la remplacer par un autre échantillon. Après le remplacement du spécimen, il suffit de déplacer la céramique en direction du cantilever et de compléter le niveau de la solution tampon dans la cellule de mesure.

Un moteur micrométrique permet d'assurer l'approche finie de la céramique en direction de la sonde. Il est capital d'arrêter l'approche motorisée juste avant le contact échantillon-sonde. Cette phase d'approche finale peut être contrôlée visuellement, avec un peu d'expérience, en observant le déplacement du spot laser sur le porte-objet. Lorsque l'échantillon a été approché à moins de 2 µm de la sonde, on déclenche la commande électronique (signal triangulaire) du dispositif piézoélectrique.

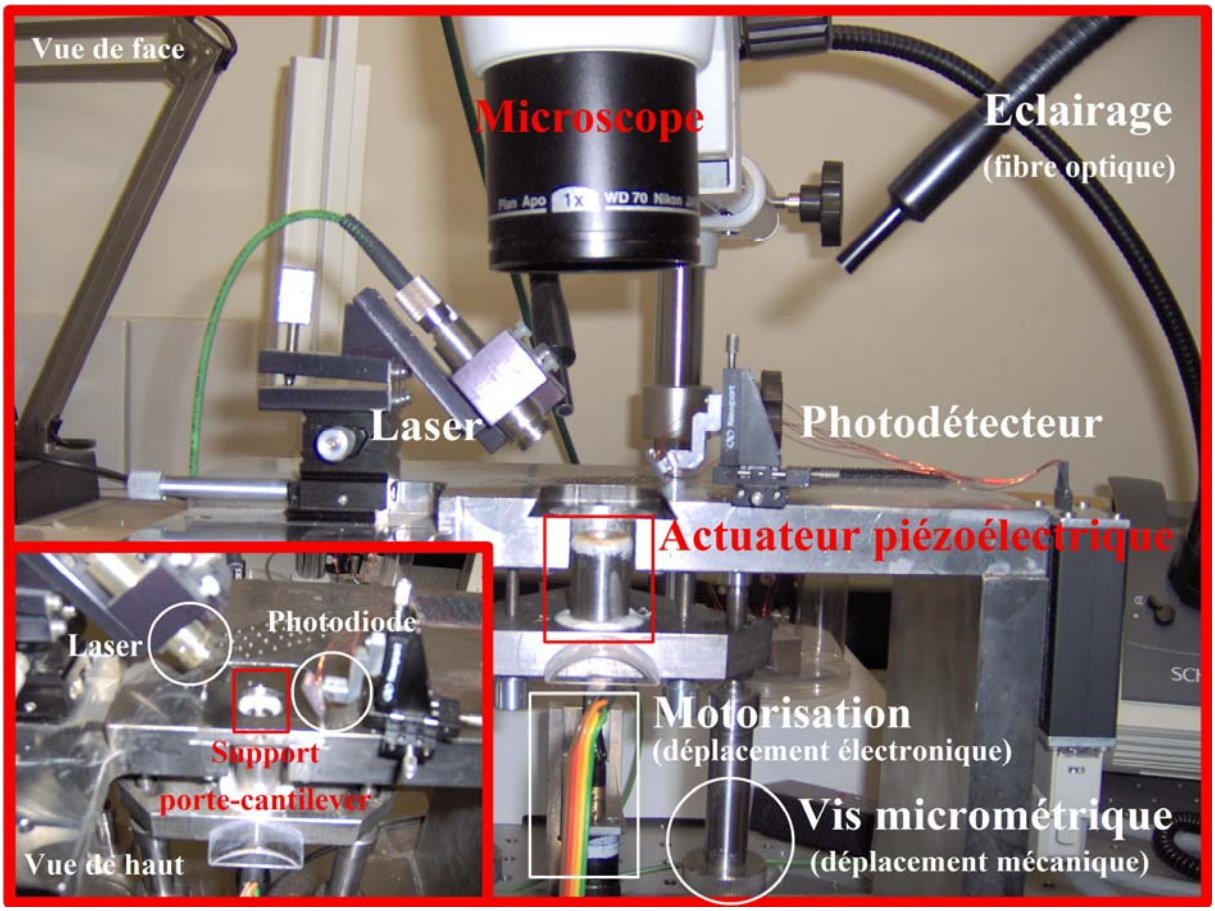


Figure 2.2.3-1 Photographie montrant les éléments constitutifs de l'IT-AFM.

Ensuite, il suffit d'ajuster la distance d'indentation ainsi que la vitesse d'impact de la sonde sur l'échantillon. Les signaux sont enregistrés à l'aide du système d'acquisition DATAQ DI-720 et du logiciel Windaq 2.36 qui nous permettent de suivre la déflexion du cantilever (A) et le déplacement de l'échantillon (B) (figure 2.2.3-2). Chaque expérience est sauvegardée dans un fichier « xxx.WDQ » que l'on peut visualiser avec l'explorateur de Windaq (figure 2.2.3-2). On peut alors sélectionner la zone (par exemple une approche) qui nous intéresse, et la sauvegarder dans un fichier texte, contenant un tableau dans lequel sont consignées trois colonnes contenant les données suivantes : le temps (en s), la déflexion (en V) du cantilever et le déplacement (en V) de l'échantillon.

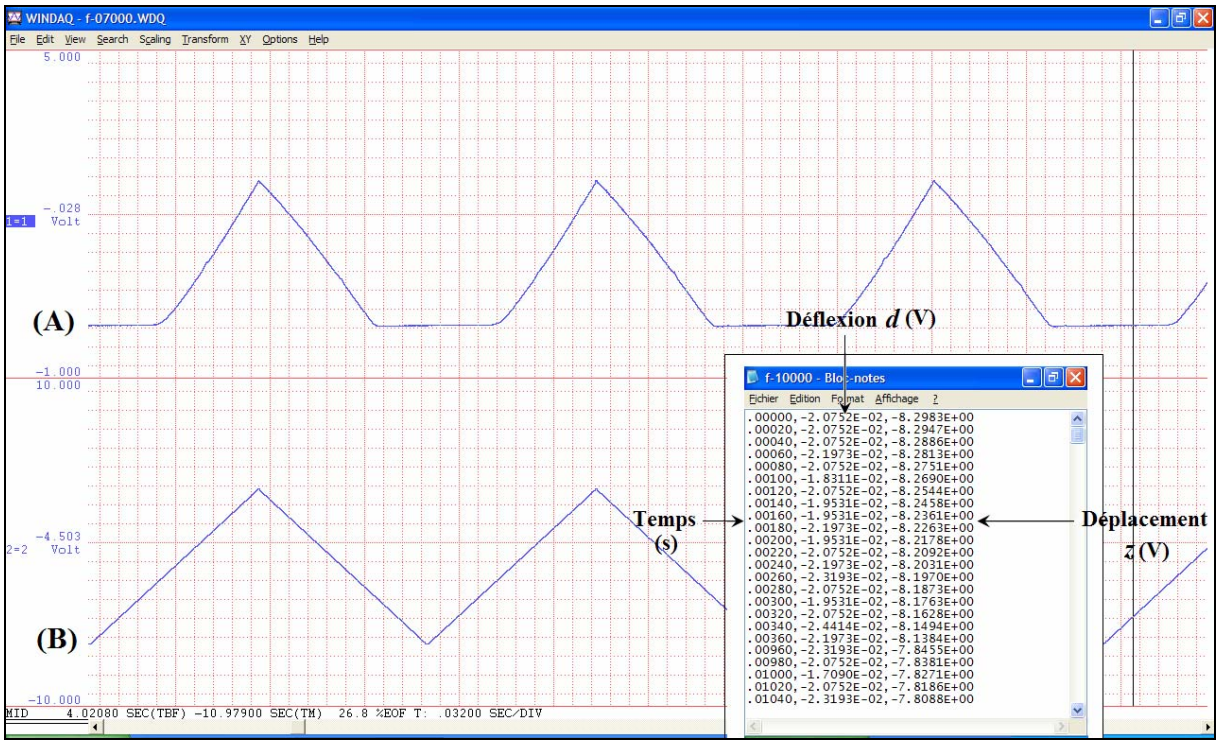


Figure 2.2.3-2 Visualisation sous « Windaq » d'une expérience d'AFM mode « force ».

Traitement des données

Pour chaque expérience, nous avons utilisé la technique de nanoindentation en mode dynamique en imposant successivement 16 vitesses différentes à la céramique (de 10 à 10000 nm/s). Le traitement des données est effectué uniquement sur les informations correspondant à la zone d'approche, à l'aide d'un programme d'ordinateur mis au point à l'Unité de Recherche INSERM U.595. Ce programme permet de traiter plusieurs courbes de force pour chacune des vitesses de déplacement. Il est basé sur les équations définies dans le sous-chapitre 1.3.1, et permet l'utilisation de trois modèles différents :

- le modèle de Hertz,
- le modèle de Dimitriadis,
- le modèle élastique dérivé de celui de Dimitriadis.

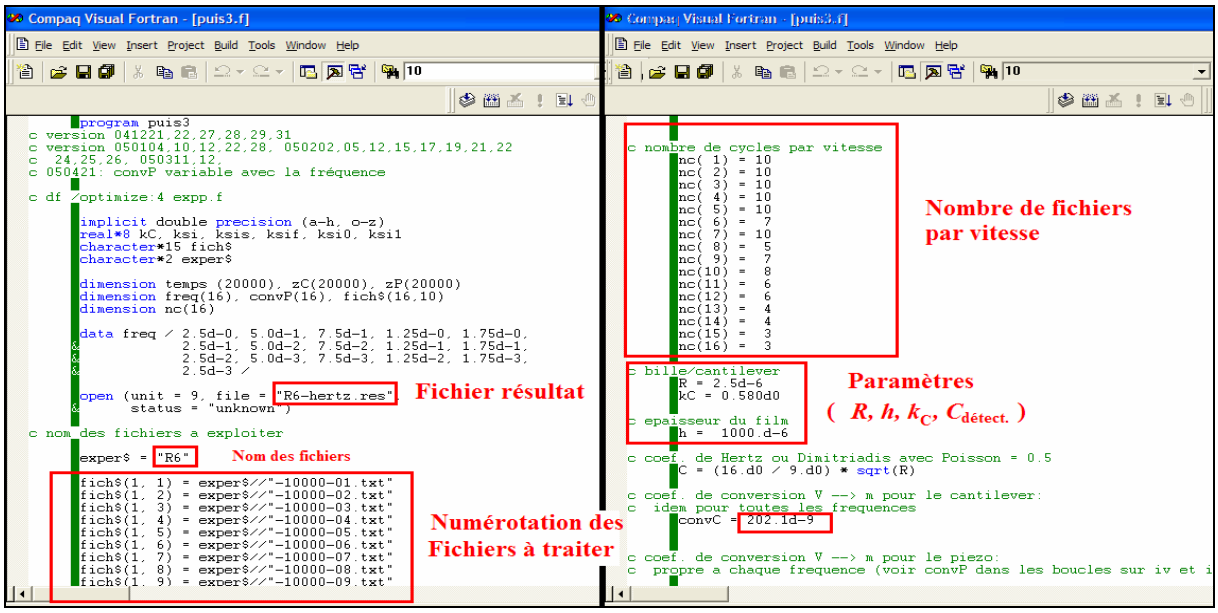


Figure 2.2.3-3 Copie d'écran soulignant les éléments de gestion du programme de traitement des courbes de force.

Le traitement informatique des données est fait à partir des fichiers contenant les enregistrements expérimentaux (temps, déflexion et déplacement), notés ici « R6- v_A – n_c.txt ». R6 désigne l'échantillon, n_c correspond au nombre de fichiers générés pour la vitesse d'approche v_A. Le programme, ici « Puis3.f », permet de traiter n_c courbes de force par vitesse d'indentation.

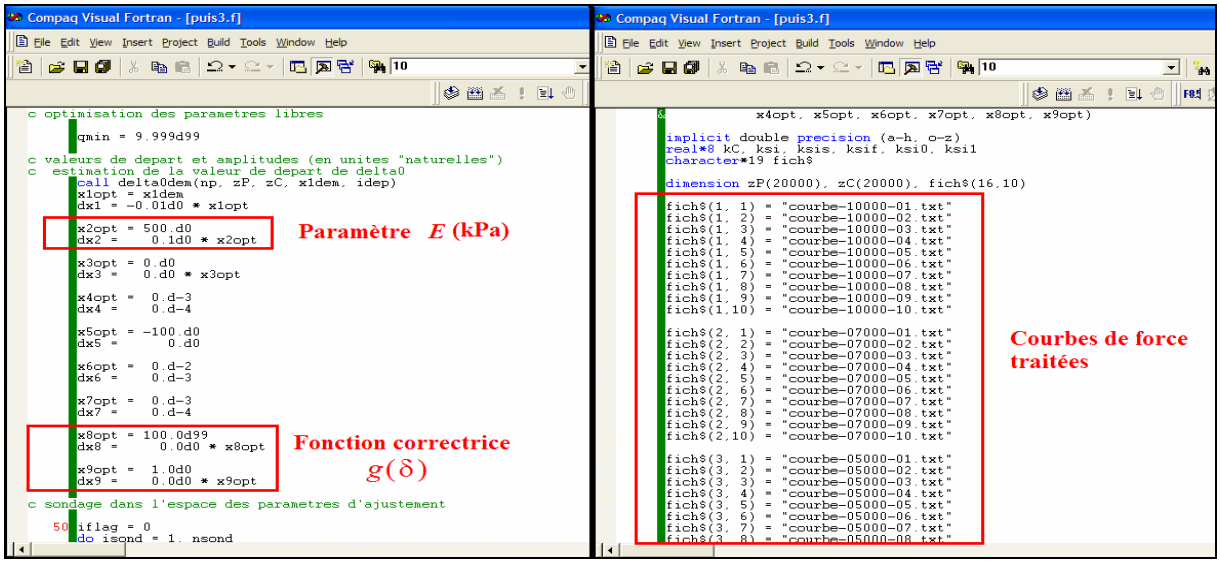


Figure 2.2.3-4 Copie d'écran montrant le réglage des paramètres du traitement.

D'un point de vue pratique, il faut fournir les paramètres suivants au programme (figure 2.2.3-3) :

- nombre de vitesses ($1 \leq Nv_A \leq 16$)

- nombre de fichiers par vitesse ($1 \leq n_c \leq 10$)
- rayon de la sonde colloïdale R
- épaisseur de l'échantillon h
- constante de raideur du cantilever k_C
- constante de conversion du photodétecteur convC

Ensuite, il faut donner les paramètres d'ajustement pour le module de Young (x2opt) ainsi que les paramètres d'une fonction de correction g(δ) définie dans le chapitre 3. En effet, dans certains cas, nous avons eu recours à cette fonction pour traiter les données expérimentales (voir paragraphe 3.2). On note x8opt et x9opt les paramètres de cette fonction. Ceux-ci peuvent être désactivés pour un traitement simple des données expérimentales. On peut également désactiver la fonction correctrice de Dimitriadis f_D, afin de traiter les courbes de force à l'aide du modèle de Hertz. Le programme génère $n_c \times Nv_A$ fichiers dans lesquels figurent les courbes de force brutes ainsi que la modélisation correspondante (figure 2.2.3-4). Ces fichiers textes sont notés "courbe - v_A - n_c.txt".

Le programme génère également un fichier dit « résultat global » noté ici "R6 - hertz". Dans ce fichier sont consignés tous les résultats, c'est-à-dire le module E et le facteur de qualité q_{min}, déterminés pour chaque courbe et pour chaque vitesse. Enfin, un fichier (noté "fort.100") contenant la moyenne et l'écart type des modules de Young à chaque vitesse est créé.

2.2.4 Imageries par AFM

Il existe deux modes principaux d'obtention des images avec un microscope à force atomique : le mode « contact » et le mode «contact intermittent ». Les cantilevers utilisés pour former les images en mode contact sont le plus souvent constitués de nitrure de silicium (Si_3N_4) ; leur face supérieure est dorée afin de les rendre réfléchissants. Les constantes de raideur varient en général de 0,01 à 0,50 N/m, selon les ressorts. Le plus souvent les chips d'AFM comportent plusieurs microleviers de raideurs différentes, ce qui permet à l'expérimentateur d'utiliser le levier le plus approprié aux propriétés de la surface qu'il souhaite imager (figure 2.2.4-1). Un système d'asservissement commande le déplacement vertical du cristal piézoélectrique afin de maintenir la déflexion du ressort (et donc la force appliquée) constante. Ce signal de régulation rétroactive permet d'imager la topographie de la surface balayée. Une autre méthode consiste à balayer la surface à hauteur constante, tout en

mesurant la déflexion du ressort. Mais cette méthode risque de casser la pointe ou de dégrader l'échantillon, surtout si la surface présente une rugosité importante. L'inconvénient majeur du mode contact réside dans le risque de dégrader certains échantillons fragiles, comme les couches de polymères ou encore les films comportant des macromolécules biologiques. Pour imager ces surfaces, on préfère utiliser le mode « tapping » (contact intermittent).

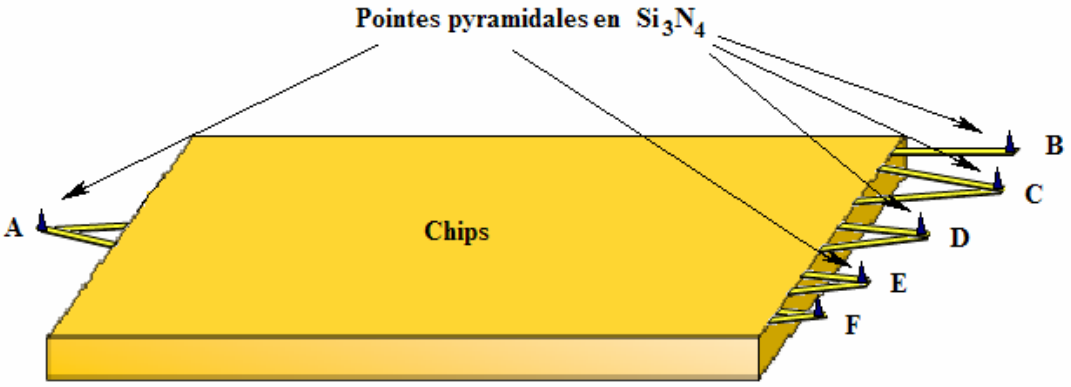


Figure 2.2.4-1 Schéma d'une microplaquette ("chip") comportant 6 cantilevers (cf. tableau 2.2.4-1).

Dans ce mode d'acquisition, le cantilever est mis en oscillation à une fréquence proche de sa fréquence de résonance (une ou quelques centaines de kHz, suivant le ressort utilisé). La pointe entre en contact avec le matériau de façon intermittente à la fréquence de l'oscillation. Ce mode d'acquisition a donc pour avantage de réduire le risque de dégradation de de la surface de l'échantillon à imager. L'interaction entre la pointe et l'échantillon a pour effet de modifier l'amplitude des oscillations du cantilever. La régulation rétroactive de l'amplitude d'oscillation du cantilever permet d'obtenir une image topographique de la surface. Les ressorts utilisés en mode "tapping" sont en nitrure de silicium et recouverts d'une fine couche d'aluminium. Leur raideur varie de 20 à 100 N/m, et le rayon de courbure à l'extrémité de la pointe est environ égal à 10 nm. Notons, que quel que soit le mode d'acquisition, la résolution en *x* et en *y* est limitée par la taille de l'apex de la pointe, alors que la résolution en *z* dépend de la précision du contrôle du déplacement du cristal piézoélectrique qui est de l'ordre de 0,1 nm. C'est pour cette raison que l'on voit apparaître de nouvelles pointes dont la partie sommitale est définie à l'échelle atomique, telles que celles dont l'extrémité est constituée d'un nanotube de carbone.

L'appareil utilisé est un AFM (figure 2.2.4-2), Nanoscope IV, de la société Digital Instruments (Veeco, Californie, Etats-Unis). Les expériences d'AFM ont été effectuées sur des surfaces de verre, de silicium, ainsi que sur des cristaux de microbalance à cristal de quartz qui ont été collés sur un disque ferromagnétique à l'aide de ruban adhésif double face. Ce disque aimanté adhère alors à l'extrémité du tube piézoélectrique. Avant chaque

expérience, les surfaces à imager à sec, ont été rincées à l'eau Milli-Q afin d'éliminer les cristaux de NaCl résiduels provenant de la solution tampon Tris-NaCl puis ont été séchées à l'aide d'un flux d'azote.

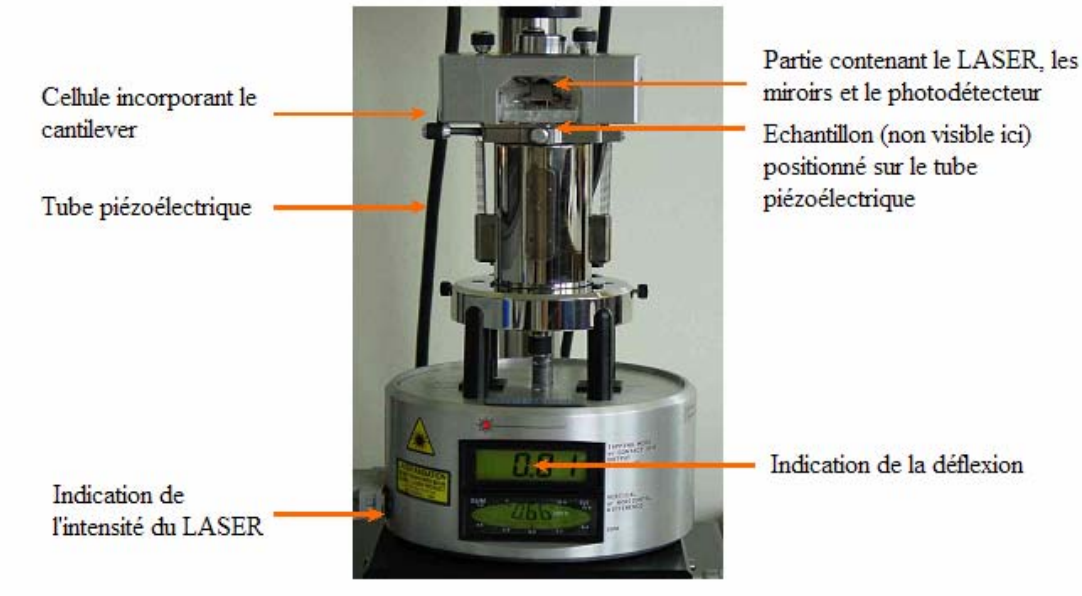


Figure 2.2.4-2 AFM commercial.

Pour les surfaces à imager en milieu hydraté, on utilise une cellule spéciale, pouvant contenirun liquide, que l'on remplit avec quelques microlitres de solution tampon. La solution tampon est préalablement filtrée à 0,22 µm pour éviter la présence d'impuretés et de poussières pouvant gêner le déplacement du cantilever. De plus, les surfaces ont été rincées abondamment avec la solution tampon filtrée pour les mêmes raisons. Les images ont été réalisées avec des cantilevers en nitrure de silicium (Veeco Instruments S.A.S., Dourdan, France).

Cantilevers (cf. figure 2.2.4-1)	A	B	C	D	E	F
Raideurs (N/m)	0,50	0,20	0,01	0,03	0,05	0,10

Tableau 2.2.4-1 Caractéristiques techniques des cantilevers utilisés.

2.3 Spectroscopie infrarouge

2.3.1 Principes de base

La spectroscopie infrarouge est basée sur des mesures de transitions vibrationnelles, entre un état vibrationnel de faible énergie et un état d'énergie plus élevé d'une liaison chimique. Les niveaux d'énergie moléculaires étant quantifiés, on peut passer d'un niveau d'énergie moléculaire à un autre par absorption ou émission d'un quantum d'énergie dont la valeur est égale à la différence d'énergie entre les deux niveaux envisagés. L'énergie totale d'une molécule est la somme de quatre contributions : l'énergie électronique ($E_{élec}$), l'énergie de vibration (E_{vib}), l'énergie de rotation (E_{rot}) et l'énergie de translation (E_{trans}) :

$$E_{totale} = E_{élec} + E_{vib} + E_{rot} + E_{trans} \text{ sachant que } E_{trans} < E_{rot} << E_{vib} << E_{élec} \qquad (2.3\text{-}1)$$

Les changements d'état de vibration sont accompagnés par l'émission ou l'absorption de radiations dans le domaine spectral de l'infrarouge (dont les longueurs d'onde sont comprises entre 25 et 2,5 µm ce qui correspond à des nombres d'onde compris entre 400 et 4000 cm^{-1}). L'absorption ou l'émission d'un rayonnement infrarouge par une molécule conduit à une variation de son énergie vibrationnelle selon la relation d'Einstein :

$$\Delta E = E_f - E_i = h\nu = hc\bar{\nu} \qquad (2.3\text{-}2)$$

où E_i est l'énergie initiale, E_f l'énergie finale, h la constante de Planck, c la vitesse de la lumière dans le vide, ν la fréquence de vibration, λ la longueur d'onde et $\bar{\nu}$ le nombre d'onde (cm^{-1}) défini comme l'inverse de la longueur d'onde. Une molécule polyatomique à N atomes peut comporter $3N$ - 6 modes normaux de vibration actifs en spectroscopie infrarouge ou en spectroscopie Raman (il peut y en avoir $3N$ - 5 pour une molécule linéaire), chacun d'entre eux possédant une fréquence de vibration définie.

En première approximation, ces modes de vibration peuvent être appréhendés à partir du modèle de l'oscillateur harmonique, dans lequel la liaison covalente est représentée par un ressort reliant deux masses. Ainsi, dans le cas le plus simple, celui d'une molécule diatomique, la fréquence de vibration dépend de la masse des atomes et de la force de la liaison covalente reliant les deux atomes. Cette force de liaison est modélisée par la constante de raideur k du ressort. Dans le cadre d'une approximation classique, la fréquence propre ν_0

d'un tel oscillateur harmonique est obtenue à partir de l'équation fondamentale de la dynamique :

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{\mu}} \qquad (2.3\text{-}3)$$

où $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$ est la masse réduite de l'oscillateur comportant les deux particules de masse m_1 et m_2.

Les vibrations caractéristiques des liaisons covalentes peuvent être classées en deux catégories suivant le type du mouvement vibrationnel impliqué :

- Les modes de vibration d'élongation (symétrique, asymétrique)
- Les modes de vibration de déformation (cisaillement, balancement, torsion et rotation)

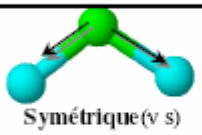
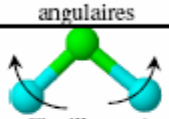
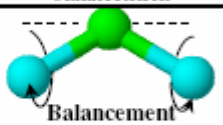
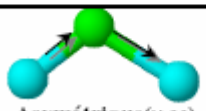
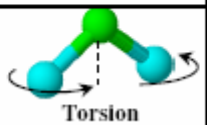
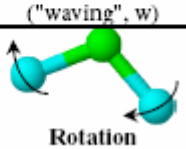
Modes d'élongation ("stretching")	Modes de déformation	
	déformations angulaires	vibrations de balancement
 Symétrique(ν s)	 Cisaillement ("bending", δ),	 Balancement ("waving", w)
 Asymétrique(ν as)	 Torsion ("scissoring", γ)	 Rotation ("rocking", r),

Tableau 2.3.1-1 Modes d'élongation et de déformation des molécules.

Le spectre d'un composé obtenu par des méthodes de spectroscopies vibrationnelles (infrarouge, Raman) lui est propre et constitue une véritable empreinte chimique de ce composé. Parallèlement, en l'absence d'interactions inter ou intramoléculaires, certains groupements chimiques présentent des bandes vibrationnelles qui apparaissent toujours aux mêmes fréquences, quelle que soit la molécule qui porte ces groupements. Par exemple, la présence d'un groupement méthylène -CH_2- au sein d'une molécule se traduit toujours par la présence d'une bande intense vers 2850 cm^{-1} (correspondant au mode d'élongation symétrique d'une liaison C-H), que ce groupement appartienne à des lipides, des protéines, etc.

Cependant, ces fréquences caractéristiques de vibration des groupements peuvent varier sensiblement d'une molécule à l'autre en raison d'interactions intra ou intermoléculaires. Il existe alors un petit décalage des spectres. Parmi ces interactions, la liaison hydrogène est l'un des facteurs les plus importants affectant les fréquences caractéristiques des groupements comportant des atomes d'hydrogène liés à un atome

fortement électronégatif. Les spectres infrarouges sont traditionnellement représentés en fonction du nombre d'onde, qui est souvent appelé par abus de langage "fréquence", même s'il est exprimé en cm^{-1}.

On distingue deux types d'appareillages en spectroscopie infrarouge : les spectromètres dispersifs utilisant un monochromateur, et les spectromètres infrarouges à transformée de Fourier utilisant l'interféromètre de Michelson. Ce dernier type d'appareil supplante de plus en plus les spectromètres dispersifs et c'est un appareil de ce type que nous avons utilisé et que nous allons décrire.

2.3.2 Description de la technique

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) nécessite l'utilisation d'un interféromètre de Michelson dont le principe est décrit dans la figure 2.3.2-1.

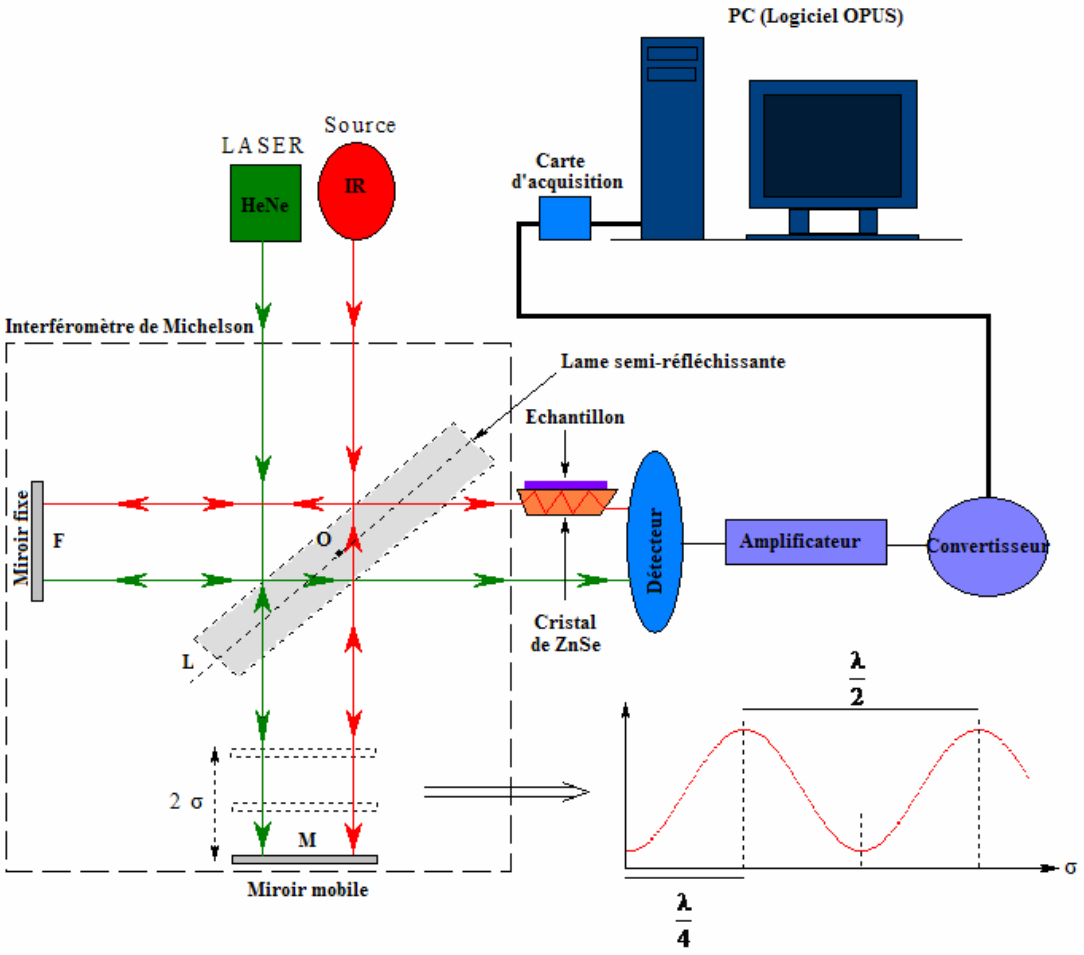


Figure 2.3.2-1 Schéma de principe d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier.

Le faisceau issu de la source infrarouge est divisé en deux grâce à une lame séparatrice semi-réfléchissante, généralement en KBr, revêtue de germanium. Lorsque le faisceau atteint cette lame semi-réfléchissante (L), 50% de l'intensité du faisceau incident sont réfléchis vers le miroir fixe (F), et 50% de l'intensité incidente sont transmis vers le miroir mobile (M). Après réflexion des deux faisceaux sur les miroirs, ils convergent sur la lame L et sont recombinés. Le faisceau passe alors à travers l'échantillon avant d'atteindre le détecteur. Le déplacement d(OM-OF) du miroir mobile (M) permet d'introduire une différence de trajet optique de $x = 2\sigma$. Le faisceau lumineux sortant de l'interféromètre de Michelson traverse l'échantillon avant que son intensité ne soit mesurée par le détecteur.

L'appareil que nous avons utilisé pour nos études est un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier de type Equinox IFS55/E (Bruker, Wissembourg, France). Les principales caractéristiques de cet appareil sont les suivantes :

Gamme de fréquence : 4000 cm^{-1} – 400 cm^{-1}

Résolution maximale : 1 cm^{-1}

Source : L'intensité émergeant de la source de type « Globar » peut être ajustée par l'utilisation d'un diaphragme dont l'ouverture permet de modifier l'intensité de la lumière entrant dans l'interféromètre.

Laser : Helium-Néon qui émet à $\lambda = 632{,}8$ nm.

Détecteurs : Les expériences peuvent être effectuées soit avec un détecteur au sulfate de triglycine deutéré (DTGS) soit avec un détecteur au tellure de mercure et de cadmium (MCT). Le détecteur MCT, qui nécessite un refroidissement à l'azote liquide, repose sur l'effet pyroélectrique. Il est plus sensible que le détecteur de type DTGS. Le détecteur DTGS est utilisé en mode transmission et le détecteur MCT en mode réflexion totale atténuée, lorsqu'il s'agit d'étudier la composition chimique d'un film mince à une interface solide-liquide.

Principe de la mesure

Si la source infrarouge était monochromatique, l'interférence obtenue serait constructive si la différence de chemin optique OF - OM était un multiple entier de la longueur d'onde. Le signal recueilli par le détecteur serait alors maximum. Le déplacement du miroir M engendre une différence de la distance parcourue, et donc un déphasage croissant qui entraîne une interférence de plus en plus destructive. L'intensité du signal perçu par le détecteur est alors décroissante. Lorsque la différence de chemin optique vaut $d = \lambda/4$, le déphasage correspond à $2\pi\nu\ (2d) = \pi/2$ et le signal arrivant sur le détecteur est nul. En

continuant le déplacement du miroir, on arrive de nouveau à une intensité maximale pour $d = \lambda/2$. Par conséquent, le signal $W(x)$ mesuré par le détecteur s'exprime par la relation :

$$W(x) = A(\nu) + A(\nu)\cos(2\pi\nu x) = A(\nu) + I(x) \tag{2.3-4}$$

où $A(\nu)$ est l'intensité maximale de la source à la fréquence ν (égale à c/λ). Le premier terme, $A(\nu)$, est indépendant du déplacement du miroir mobile et le second terme, $I(x)$, est la partie modulée du signal, qui correspond à l'interférogramme de la source. En général, la source infrarouge utilisée est polychromatique. Dans ce cas, toutes les fréquences sont en phase uniquement quand $x = 0$. Toutes les autres positions du miroir induisent différents degrés d'interférences destructives. L'interférogramme $I(x)$ résultant s'écrit alors :

$$I(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} A(\nu)\cos(2\pi\nu x)\mathrm{d}\nu \tag{2.3-5}$$

Le contrôle et la mesure de la différence de trajet optique constituent des éléments essentiels pour les performances de l'appareil. Pour pouvoir interférer, les deux faisceaux obtenus, après division par la lame semi-réfléchissante, doivent être parfaitement parallèles. Cela suppose que le miroir mobile se déplace perpendiculairement au faisceau, sans vibrations mécaniques. Le contrôle du mouvement du miroir mobile s'effectue à l'aide d'un laser hélium/néon (HeNe, $\lambda = 632{,}8$ nm). Ce laser éclaire une partie de la lame séparatrice et le déplacement du miroir mobile génère des franges d'interférence qui sont capturées avec un détecteur adéquat. Ces franges permettent le contrôle de la position du miroir mobile, et sont aussi utilisées pour déclencher le convertisseur analogique/digital qui numérise le signal du détecteur infrarouge pour chaque position x adoptée par le miroir.

2.3.3 Traitement du signal et protocole expérimental

Traitement du signal

En pratique, le signal mesuré au niveau du détecteur [149] peut être affecté par l'efficacité de la lame semi-réfléchissante. En effet, l'efficacité est optimale quand exactement 50% du signal incident est transmis au miroir fixe et 50% du signal incident est réfléchi vers le miroir mobile de l'interféromètre de Michelson. Par conséquent, l'amplitude de l'interférogramme après détection est proportionnelle à l'efficacité de la lame semi-réfléchissante ainsi qu'à l'intensité de la source. Il en découle que le terme $A(\nu)$ dans la

relation (2.3-5) doit être substitué par le terme $B(\nu)$, qui correspond à l'intensité corrigée par les caractéristiques de l'appareillage :

$$I(x) = \int_0^{+\infty} B(\nu)\cos(2\pi\nu x)\mathrm{d}\nu \tag{2.3-6}$$

Réciproquement, la transformée de Fourier de $I(x)$ conduit au spectre de fréquence $B(\nu)$:

$$B(\nu) = \frac{1}{2\pi}\int_{-\infty}^{+\infty} I(x)\cos(2\pi\nu x)\mathrm{d}\nu \tag{2.3-7}$$

La transformée de Fourier est calculée à l'aide d'un algorithme de transformée de Fourier rapide[150]**.** Cependant, afin de limiter l'apparition d'artéfacts lors du calcul de la transformation de Fourier, une fonction d'apodisation (ici de type « Blackmann-Harris ») est appliquée à l'interférogramme expérimental. Une fois ces traitements effectués, l'interférogramme expérimental $I'(x)$ devient un interférogramme lissé, $I''(x)$, et nous pouvons calculer le spectre de l'échantillon analysé par application de la transformée de Fourier à $I''(x)$. Le spectre $B''(\nu)$ d'un échantillon est le spectre infrarouge récolté par le détecteur lorsque le faisceau lumineux traverse l'échantillon. Le spectre d'absorbance $A(\nu)$ de cet échantillon est défini par la loi de Beer-Lambert :

$$A(\nu) = \log\left[\frac{B_0(\nu)}{B''(\nu)}\right] \tag{2.3-8}$$

où $B_0(\nu)$ représente le spectre de la source infrarouge avant passage à travers l'échantillon (ou à travers un échantillon de référence ne contenant pas les molécules dont on veut mesurer le spectre infrarouge). Dans le cadre de notre étude, les échantillons analysés ont été solubilisés en milieu aqueux avant d'être adsorbés sur la surface d'un cristal trapézoïdal en séléniure de zinc (ZnSe) par la technique du dépôt couche par couche. Ce cristal trapézoïdal constitue la partie inférieure de la cellule d'injection dans laquelle la solution de polyélectrolytes ou la solution tampon de rinçage circule.

Les spectres d'absorbance $A(\nu)$ des films multicouches de polyélectrolytes déposés ont été obtenus de la manière suivante (figure 2.3.3-1):

- Mesure du spectre de transmission $B_S''(\nu)$ de la solution tampon ou spectre de référence (« blanc »).
- Mesure du spectre de transmission $B''(\nu)$ du produit dissous dans une solution tampon ou spectre brut de l'échantillon.
- Calcul du spectre d'absorbance $A(\nu)$ du produit analysé ou de l'échantillon par la différence des logarithmes des spectres de transmission de la solution tampon et de l'échantillon.

Nous avons également mesuré l'absorbance de solutions de polyélectrolytes en solution (à différentes concentrations en polyélectrolytes) afin de déterminer le coefficient d'extinction moléculaire de ces composés à une longueur d'onde donnée. Ces expériences ont été effectuées dans le but de déterminer les concentrations des différents polyélectrolytes au sein du film multicouche.

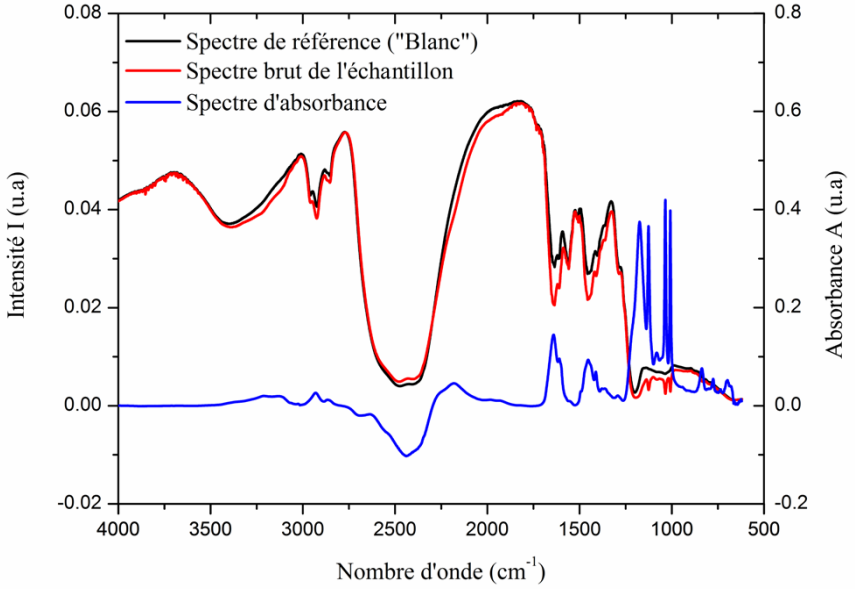


Figure 2.3.3-1 Spectres infrarouge d'un film multicouche de polyélectrolytes.
En bleu est représenté le spectre infrarouge d'absorbance d'un film $(PLL/[HA_{0,90}/PSS_{0,10}])_{12}$.

Les paramètres d'acquisition que nous avons utilisés sont les suivants :

- La gamme de fréquence utilisée est l'infrarouge moyen (4000 à 400 cm^{-1}).
- Le nombre d'interférogrammes n ("scans") accumulés pour chaque position x du miroir était soit de 128 soit de 512 scans. Le spectre d'absorbance est obtenu à partir de la moyenne de ces interférogrammes.

Lorsque le nombre d'accumulations spectrales augmente, le rapport signal à bruit S/B augmente, car l'intensité du signal est proportionnelle à n et le bruit à $\sqrt{n}$.

Il faut noter que la bande de vibration de déformation H-O-H de l'eau ($\bar{\nu}$ = 1650 cm^{-1}) présente un chevauchement avec la bande amide I (entre 1600 et 1700 cm^{-1}), caractéristique des polypeptides. Par conséquent, les mesures concernant des films contenant des polypeptides (notamment la poly-L-lysine, PLL) ont été effectuées dans l'eau lourde (D_2O), dont la bande de déformation est déplacée à $\bar{\nu}$ = 1215 cm^{-1}. D'autre part, la vapeur d'eau et le dioxyde de carbone absorbent très fortement dans l'infrarouge. Lors des mesures en IR, cette absorption réduit l'énergie totale du faisceau qui atteint le détecteur. Ceci se traduit sur les

spectres par une absorption parasite de lumière dans les régions correspondant aux bandes de vibration de l'eau et du dioxyde de carbone. Il est donc nécessaire de purger la cellule de mesure avec un dessiccateur d'air afin de vider la cellule de mesure de la vapeur d'eau et du dioxyde de carbone. Pour ces raisons, le spectromètre FTIR utilisé a été équipé d'un sécheur d'air (série KM 25 MS/TE, Zander, Allemagne).

Mode transmission et mode réflexion totale atténuée (ATR)

Le faisceau de la source infrarouge, issu de l'interféromètre de Michelson, traverse l'échantillon placé dans un compartiment porte cellule, dont les parois sont en CaF_2.

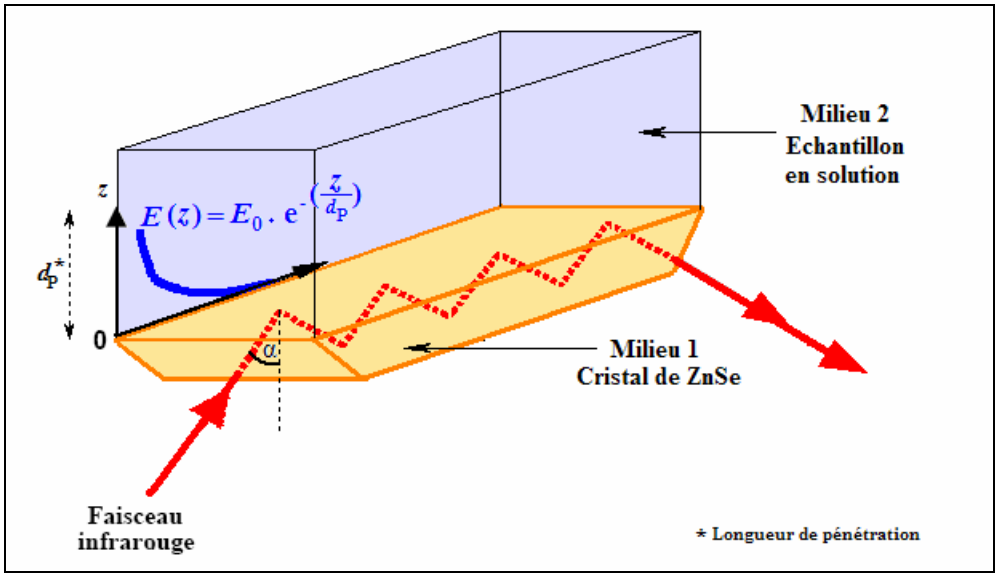


Figure 2.3.3-2 Trajet optique (en rouge) à travers le cristal de ZnSe et représentation du profil de l'onde évanescente (en bleu).

Grâce à un montage optique constitué de plusieurs miroirs, le faisceau infrarouge (provenant de l'interféromètre de Michelson) est dirigé sous incidence normale vers l'une des faces du cristal d'ATR. L'angle entre cette face du trapèze et sa base est de 45° : l'angle d'incidence du faisceau à l'interface entre le cristal (milieu 1 d'indice de réfraction n_1) et la solution aqueuse au-dessus du cristal (milieu 2 d'indice de réfraction n_2) est donc égal à 45°. Notons que si l'angle α du faisceau incident est supérieur à un angle critique α_c, le faisceau incident est totalement réfléchi à l'intérieur du cristal. La valeur de cet angle critique est obtenue facilement à partir de la relation de Snell-Descartes :

$$\alpha_c = \sin^{-1}\left[\frac{n_2}{n_1}\right] \qquad (2.3\text{-}9)$$

Dans ce cas, n_1 est l'indice de réfraction (n_1 = 2,42 à 1550 cm^{-1}) du cristal d'ATR, et n_2 l'indice de réfraction des solutions de polyélectrolytes (n_2 = 1,5 à 1550 cm^{-1}). L'application numérique donne α_c = 38,3°. A l'interface ZnSe-air, l'angle critique est égal à 24,4°.

Pour un angle d'incidence égal à 45°, nous nous trouvons donc dans une configuration de réflexion totale aux deux interfaces : ZnSe-solution et ZnSe-air. Le cristal de ZnSe se comporte donc comme un guide d'ondes et à chaque réflexion à l'une des interfaces considérées il y a propagation d'une onde évanescente de la surface solide dans le milieu le moins réfringent. L'existence de cette onde évanescente est une conséquence des équations de Maxwell : lors du passage d'un diélectrique à un autre, la composante du champ électrique perpendiculaire à l'interface est discontinue tandis que la composante parallèle est continue. Compte tenu des dimensions (72 × 10 × 6 mm) du cristal, il y a treize réflexions au sein du cristal, dont sept se produisent sur la base du trapèze qui se trouve en contact avec le milieu 2. L'intensité du champ électrique associé à l'onde évanescente décroît exponentiellement en fonction de la distance en s'éloignant perpendiculairement à la surface du cristal :

$$E(z) = E_0 \cdot e^{-\left[\frac{z}{d_p}\right]} \qquad (2.3\text{-}10)$$

Dans cette relation, d_p est la profondeur de pénétration de l'onde évanescente dans le milieu 2 et E_0 l'intensité du champ électrique à la surface du cristal (z = 0). La profondeur de pénétration correspond à la distance à l'interface pour laquelle l'intensité du champ électrique n'est plus égale qu'à 0,37 E_0. Lorsque l'on dépose un film multicouche de polyélectrolytes à l'interface ZnSe-solution, l'épaisseur de ce film augmente avec le nombre de paires de couches déposées. On peut donc suivre la construction des films multicouches par cette technique expérimentale en mesurant l'augmentation de l'absorbance à des longueurs d'onde spécifiques. Mais lorsque l'épaisseur du film dépasse de plusieurs fois la valeur de d_p, il n'est plus possible, théoriquement, de suivre la construction du film. En effet, la construction du film se poursuit dans une région où le champ électrique émergeant de l'interface est très proche de zéro. On n'est donc plus capable de mesurer avec précision une diminution supplémentaire de l'intensité du champ électrique due à des absorptions caractéristiques des groupements chimiques déposés. Cependant, lorsque l'adsorption de polyélectrolytes à la surface du film est accompagnée d'un changement de composition dans la région du film « sondée » par l'onde évanescente, il doit se produire des changements d'absorption. De tels changements de composition peuvent se produire lors de phénomènes de gonflement-dégonflement des films multicouches ou lors de phénomènes de diffusion. Ces remarques concernant la signification de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente vont se

révéler importantes lors de notre étude portant sur la stratification éventuelle de films multicouches en « compartiments » (chapitre 5).

La valeur de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente peut être calculée à partir de l'équation suivante[151] :

$$d_P = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2(\theta) - \left[\frac{n_2}{n_1}\right]^2}} \qquad (2.3\text{-}11)$$

où λ représente la longueur d'onde de la lumière incidente. Dans le cas du cristal de ZnSe (n_1 = 2,42) et d'une solution de polyélectrolytes (n_2 = 1,5), la valeur de d_p est de l'ordre de 1,3 µm à 1550 cm^{-1}, c'est-à-dire pour une valeur du nombre d'onde correspondant à l'absorption des groupements carboxyliques de polypeptides tels que le poly acide-L-glutamique. Faisons maintenant un bref rappel des positions des bandes de vibration caractéristiques des polyélectrolytes que nous avons utilisées dans ce travail.

Identification des bandes infrarouge des polyélectrolytes utilisés

Nous avons utilisé le spectromètre infrarouge à transformée de Fourier en mode ATR afin d'obtenir des mesures quantitatives (en terme de concentration des polyélectrolytes) et semi-quantitatives (nature des groupements chimiques présents) concernant quatre types de polyélectrolytes :

- la poly-L-lysine (PLL) qui est un polypeptide,
- le hyaluronane (HA) qui est un polysaccharide,
- le poly-4-styrène sulfonate (PSS),
- la poly hydrochlorure d'allylamine (PAH).

Les polypeptides sont des polymères d'acides aminés. Les acides aminés sont des composés comportant un groupement acide carboxylique, un groupement amine et un groupement latéral R. Tous ces groupements sont liés à un atome de carbone central, noté C_α. Le carbone C_α est asymétrique, sauf dans le cas le plus simple où R = H (l'acide aminé correspondant est alors appelé glycine), car il porte quatre substituants différents. Dans les polypeptides, les acides aminés sont liés les uns aux autres par une liaison amide (-CONH-), impliquant un groupement acide et un groupement amine. Une telle liaison est appelée une liaison peptidique. Par exemple, la poly-L-lysine est une succession de liaisons peptidiques possédant comme chaîne latérale la L-lysine (tableau 2.3.3-1).

Aucune rotation n'est possible autour de la liaison peptidique, en raison d'un phénomène de résonance. De ce fait, la rigidité locale de la chaîne polypeptidique est semblable à celle des molécules éthyléniques conjuguées[152, 153]. Le spectre infrarouge des polypeptides contient plusieurs types de bandes d'absorption caractéristiques, associées à la liaison peptidique –CONH–, appelées "bandes amides".

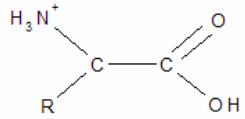
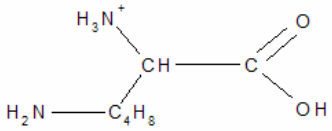
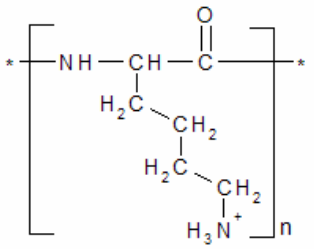
Acide aminé	Lysine	Poly-L-lysine
		

Tableau 2.3.3-1 : Représentation semi développée de la structure des acides aminés, de la lysine et de son homopolypeptide, la poly-L-lysine.

Des études ont révélé que le fait d'utiliser D_2O à la place de H_2O n'induisait pas de modification conformationnelle des protéines[154]. De plus, la forme de la bande amide I dépend de la structure secondaire des polypeptides (et des protéines). En effet, les fréquences propres de vibration des groupements –CONH– sont légèrement modifiées selon l'orientation et l'intensité des liaisons hydrogènes que forment ces groupements. Chaque groupement amide contient un site donneur et un site accepteur de liaisons hydrogènes et la force de ces liaisons est différente selon l'environnement, c'est-à-dire selon que ces liaisons se forment avec des molécules d'eau (la conformation préférentielle de la chaîne est alors celle d'une pelote statistique) ou avec d'autres groupements peptidiques (la conformation préférentielle de la chaîne est alors en hélice α, en feuillet β parallèle ou antiparallèle, en coude β[140-141]). La relation entre la conformation réelle, obtenue par la position des atomes sur la carte de densité électronique issue d'une expérience de diffraction des rayons X, et la forme des bandes amides se fait en ajustant un modèle au spectre expérimental. Les positions spectrales des pics du modèle sont issues d'une banque de données de protéines pour lesquelles la structure analysée par diffraction des rayons X a été déterminée avec une résolution de l'ordre du dixième de nanomètre et pour lesquelles le spectre infrarouge est connu.

Lors de notre étude sur le comportement de la construction de films multicouches par l'adsorption de mélanges de polyélectrolytes, la solution de polyanions était constituée d'un

mélange de poly-4-styrène sulfonate (PSS) et de hyaluronane (HA). Le choix de ces polyélectrolytes repose sur les différences très nettes entre leur spectre infrarouge respectif. Cela permettra de déterminer la composition des films multicouches et de la relier à la composition des solutions utilisées pour réaliser les constructions. En effet, les quatre bandes d'absorption du PSS, se situant entre 1200 et 1000 cm^{-1}, sont attribuées aux torsions du cycle aromatique induites par ses quatre liaisons C-H. Les deux autres bandes, situées à 1005 et 1035 cm^{-1}, sont liées au groupement sulfonate et seront utilisées lors de l'analyse et du traitement des données expérimentales. Le HA présente quant à lui des bandes caractéristiques à 1400, 1560 et 1610 cm^{-1}. Les films seront élaborés à partir d'un mélange de PSS et de HA (en fraction massique variable, la concentration massique totale étant maintenue constante) et d'une solution de polycations contenant de la poly-L-lysine (PLL). La fraction massique du HA sera égale à *x* et les films multicouches seront donc du type $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$. Les positions spectrales des maxima des bandes de vibration de tous les polyélectrolytes utilisés sont données dans le tableau 2.3.3-2.

Polyélectrolytes	**Bandes caractéristiques retenues pour l'étude**
PLL	<u>1650 cm^{-1}</u> ; 1680 cm^{-1}
PSS	<u>1005 cm^{-1}</u> ; <u>1035 cm^{-1}</u> ; 1155 cm^{-1} ; 900 cm^{-1}
HA	<u>1610 cm^{-1}</u> ; 1560 cm^{-1} ; 1400 cm^{-1}

Tableau 2.3.3-2. Position du maximum des bandes de vibration des polyélectrolytes utilisés pour la construction des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$.
Les nombres d'onde soulignés correspondent aux fréquences utilisées dans le traitement des spectres infrarouges des films du type $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$ *étudiés dans le chapitre 5.*

Protocole expérimental

La détermination de la composition des film du type $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$ nécessite la détermination des coefficients d'extinction moléculaires. Pour cela nous avons préparé des solutions de PSS et de HA à concentrations variables et nous avons enregistré leur spectre d'absorbance entre 400 et 4000 cm^{-1}. Pour l'acquisition de ces spectres d'absorption, nous avons utilisé la même cellule que celle utilisée pour réaliser la construction des films multicouches à savoir la cellule trapézoïdale représentée sur la figure 2.3.3.2. Le détecteur utilisé est le MCT. La cellule est rendue hermétique grâce à un joint et possède un volume interne de 500 µL. Tous les constituants de la cellule sont lavés au Hellmanex (2% en volume), puis rincés à l'eau et à l'éthanol. Le trapèze en ZnSe est frotté avec du papier pour nettoyage optique (Whatman, Maidstone, Grande-Bretagne) avant montage de la cellule.

Après avoir monté la cellule et s'être assuré de l'étanchéité de l'ensemble, on introduit la solution-échantillon dans la cellule par l'un des injecteurs. Quand la cellule est mise en place dans le spectromètre et que le réservoir du détecteur est rempli avec de l'azote liquide, il faut attendre environ vingt minutes pour que le détecteur soit complètement froid et opérationnel et que la vapeur d'eau résiduelle soit évacuée du système. Les mesures comptent 128 à 512 interférogrammes chacune avec une résolution de 2 cm^{-1}. La durée nécessaire à l'acquisition totale d'un spectre est comprise entre 2 et 8 minutes selon le nombre d'accumulations. Lors de la construction d'un film multicouche, il est possible de procéder à l'acquisition des spectres sans avoir à manipuler la cellule de mesure. Le film est construit par trempage, comme au robot, sur le cristal de ZnSe grâce à une pompe péristaltique (boucle d'injection) qui permet de faire circuler les solutions de polyélectrolytes et de rincer la cellule de mesure avec une solution tampon (figure 2.3.3-3).

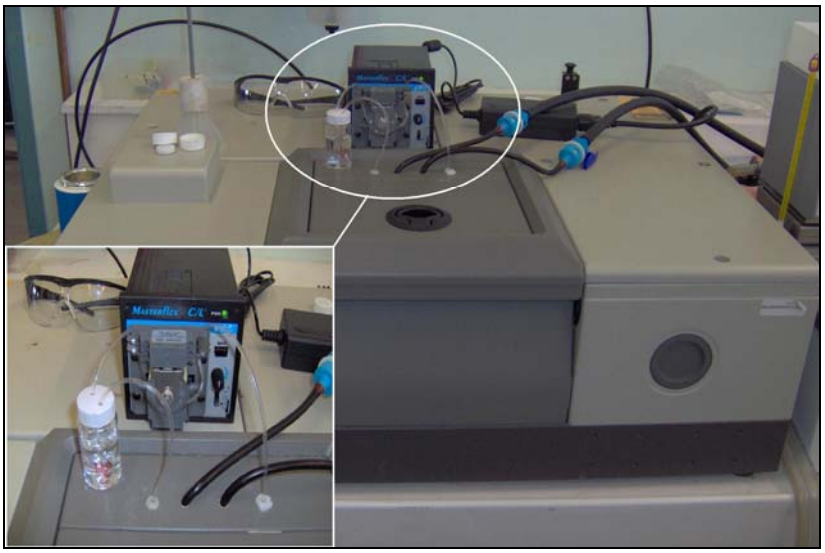


Figure 2.3.3-3 Photographie du spectromètre FTIR (IFS 55 Bruker).
Dans l'insert, on peut voir la pompe péristaltique permettant l'injection des polyélectrolytes dans la cellule de mesure.

Analyse et traitement des spectres infrarouges

Le spectre d'absorbance est obtenu par différence entre le logarithme du spectre de l'ensemble "polypeptide-tampon-cellule" et le logarithme du spectre de l'ensemble "tampon-cellule" qui constitue le spectre de référence. Tous les traitements de spectre sont réalisés à l'aide du logiciel OPUS (Version 5.5), fourni par Bruker Optik GmbH. La décomposition des bandes en composantes gaussiennes ou lorentziennes requiert toujours en premier lieu la détermination des fréquences des différentes composantes. Les spectres sont acquis dans une cellule normalement exempte de vapeur d'eau. La région spectrale correspondant à la bande

amide I ne devrait donc pas être contaminée par les pics dus à la vapeur d'eau. Dans le cas contraire, qui se produit lorsque le taux d'humidité relatif est élevé, le spectre est traité par soustraction de la contribution du spectre de la vapeur d'eau en utilisant la fonction de soustraction interactive du logiciel OPUS. Le spectre obtenu est alors lissé grâce à un programme de lissage de Fourier[155]. Nous avons vérifié que ce lissage n'induisait pas de distorsion, c'est-à-dire que l'allure de la bande d'intérêt n'était pas modifiée.

Après lissage du spectre, la soustraction d'une ligne de base rectiligne est appliquée dans un intervalle de fréquence qui encadre la bande d'intérêt. Avant de commencer la décomposition, la dérivée seconde du spectre est calculée dans ce même intervalle. Elle permet de déterminer le nombre de bandes composant le spectre sur ce domaine de fréquence. Des changements de pente dans le spectre de la dérivée seconde coïncident avec les fréquences centrales des bandes composantes. Ce n'est qu'à ce moment qu'il devient possible d'ajuster le spectre par plusieurs composantes de forme gaussienne ou lorentzienne suivant une méthode des moindres carrés. Dans le cas des solutions diluées, si le solvant n'interagit pas avec le produit, chaque bande constitutive a une forme gaussienne. Dans le cas contraire, elle a une forme mixte gaussienne-lorentzienne. Les paramètres d'ajustement pour chaque courbe constitutive sont (figure 2.3.3-4) :

- l'intensité, qui correspond à l'aire entre la courbe gaussienne ou lorentzienne et la ligne de base,
- la fréquence centrale,
- la largeur de la courbe à mi-hauteur.

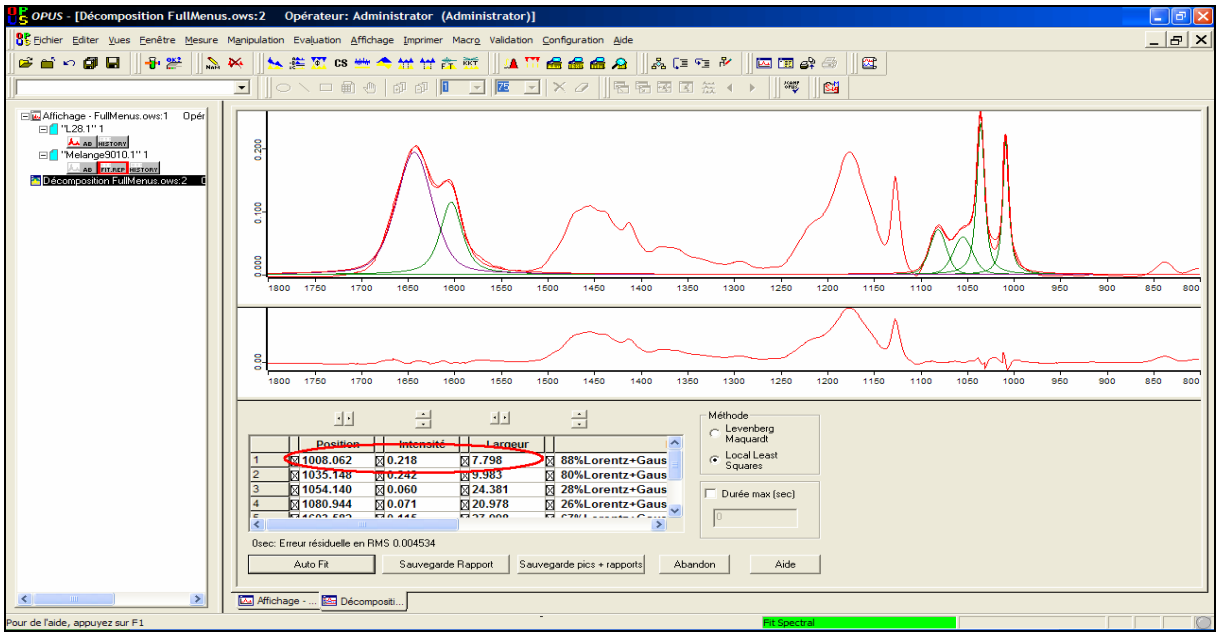


Figure 2.3.3-4 Exemple de décomposition spectrale réalisée avec le logiciel OPUS 5.5.

Tous ces paramètres sont déterminés lors de l'ajustement de la courbe modélisée sur la courbe théorique, par la méthode des moindres carrés. Les valeurs de départ des intensités sont fixées à 1, celles des fréquences sont déterminées par la dérivée seconde, et celles des largeurs de bande fixées à 20 cm^{-1}. Lors de la procédure d'ajustement, on commence par ajuster une à une les trois variables (intensité, fréquence, largeur de bande) du groupe de bandes. Cette démarche est nécessaire afin de guider l'ajustement numérique dans la recherche du minimum absolu de la courbe représentant la somme des carrés des résidus en fonction des paramètres d'ajustement.

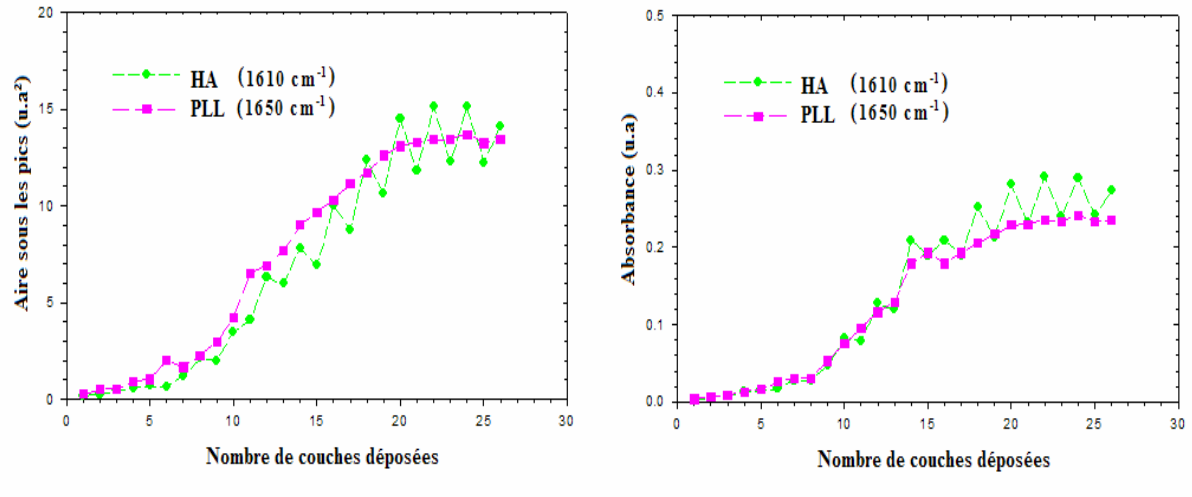


Figure 2.3.3-5 Résultat final d'une analyse des spectres d'un film multicouche $(PLL/HA)_n$.
Evolution de l'aire sous les pics (graphe de gauche) et de l'absorbance au maximum du pic (graphe de droite) en fonction du nombre de couches déposées.

On estimera qu'un ajustement est de bonne qualité si la valeur absolue de l'écart entre la valeur de l'absorbance mesurée et la somme des absorbances calculées à chaque fréquence ne dépasse pas 10^{-5}. Les trois données qui caractérisent les bandes analysées, dont l'intensité et l'aire sont les plus intéressantes (figure 2.3.3-5), sont, par la suite, tracées en fonction du nombre de couches adsorbées.

2.4 Microbalance à cristal de quartz

La microbalance à cristal de quartz a été développée à la fin des années 50 pour mesurer la masse d'un dépôt rigide et parfaitement solidaire du cristal (film métallique par exemple)[156]. Cette technique est basée sur les propriétés piézoélectriques d'un cristal pour mesurer la masse qui y est déposée. A partir des années 1980, la technique a été étendue à la mesure des propriétés viscoélastiques et de l'épaisseur d'un film dans un environnement liquide[157]. Dès lors, elle a été nommée "microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation" ou QCM-D. Le sigle QCM-D fait référence à l'appellation anglo-saxonne "Quartz Crystal Microbalance with Dissipation"[158]. L'appareil que nous avons utilisé est de la marque Q-Sense (Q-Sence AB, Göteborg, Suède) et de type QCM-D301. Il comporte une chambre de mesure thermostatée par un système Peletier et une unité électronique interfacée avec un ordinateur. La fréquence fondamentale de résonance du cristal est de 5 MHz et nous prendrons en compte lors de nos mesures, trois de ses harmoniques (15, 25 et 35 MHz).

2.4.1 Principe de la mesure

Le fonctionnement de la microbalance à cristal de quartz repose sur la variation de la fréquence de résonance d'une lame de quartz, due à l'augmentation de masse induite par le dépôt du film. Les propriétés piézoélectriques de la lame de quartz permettent de traduire des contraintes mécaniques en différences de potentiel électrique et *vice versa*. La lame de quartz est intercalée entre deux minces couches d'or qui servent d'électrodes. En appliquant une différence de potentiel entre les deux faces, un mouvement de cisaillement est induit, sans déformation verticale. Si la face inférieure de la lame est fixée sur un support, la face supérieure subit un mouvement de translation. L'ensemble du système est équivalent à un oscillateur harmonique.

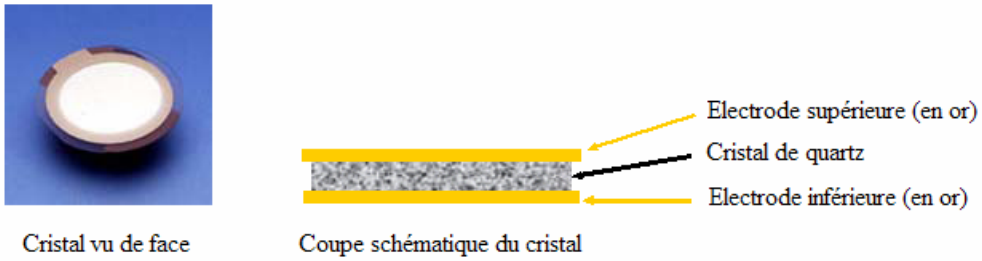


Figure 2.4.1-1 Cristal de QCM-D phographié de face et représenté en coupe.

La mesure consiste à faire osciller le cristal autour de sa fréquence de résonance et ensuite à mesurer l'amortissement du signal (relaxation). Quand on effectue un ou plusieurs dépôts solides sur le cristal, sa fréquence de résonance est décalée vers les basses fréquences et l'amortissement est différent (figure 2.4.1-2).

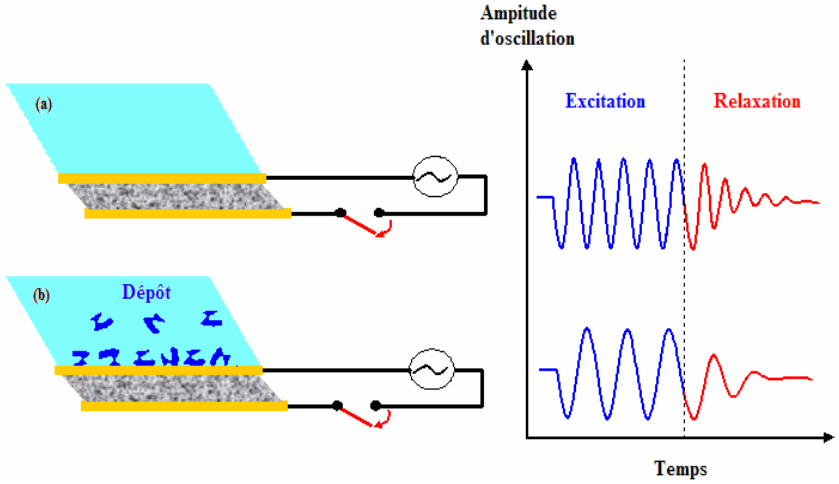


Figure 2.4.1-2 Schéma de principe de la mesure.

On peut montrer qu'au voisinage de ses fréquences de résonance (fréquence fondamentale et harmoniques d'ordres impairs), le cristal de quartz se comporte comme un oscillateur harmonique amorti, dont la masse M est égale à la moitié de celle, m_q, du cristal[159] : $M = m_q/2$. Son paramètre d'amortissement γ' et sa constante de raideur k sont reliés aux propriétés viscoélastiques du quartz. Soit u le déplacement d'un point quelconque de la surface supérieure du cristal, le long de l'axe Ox, parallèle à la surface du cristal, qui indique sa direction de vibration, la variation de u au cours du temps est régie par l'équation :

$$M\left(\frac{\partial^2 u}{\partial t^2} + \gamma_a \frac{\partial u}{\partial t} + \omega_1 u\right) = F_P + F_{ext} \qquad (2.4\text{-}1)$$

avec $\gamma_a = \frac{\gamma'}{M}$ et $\omega_1 = \sqrt{\frac{k}{M}}$; t est le temps, F_p est la force par unité d'aire qu'exerce un milieu quelconque en contact avec la face supérieure du cristal et F_{ext} représente la force oscillante excitatrice. La pulsation ω_1 correspond à la fréquence de résonance fondamentale f_1, de l'oscillateur non amorti ($\omega_1 = 2\pi f_1$). Quand le cristal vibre dans le vide, la force F_p est nulle dans l'équation (2.4-1). Si une couche d'un matériau parfaitement rigide, de masse m, est déposée sur le cristal, cette masse oscille exactement comme le dessus du cristal, en admettant qu'il n'existe aucun glissement à l'interface matériau/cristal. Le déplacement u vérifie donc l'équation :

$$(M+m)\left(\frac{\partial^2 u}{\partial t^2}+\gamma_b\frac{\partial u}{\partial t}+\Omega_1^2 u\right)=F_{ext} \qquad (2.4\text{-}2)$$

Sachant que $\gamma_b=\frac{\gamma'}{M+m}$ et $\Omega_1=\sqrt{\frac{k}{M+m}}\cong\omega_1\cdot\left(1-\frac{m}{2M}\right)$ en supposant que $m << M$. On retrouve ainsi la relation de Sauerbrey[156] qui exprime le changement de la fréquence de résonance en fonction de m :

$$\Delta f_1=\frac{\Omega_1-\omega_1}{2\pi}=-\frac{mf_1}{2M}=-\frac{m}{C_1} \qquad (2.4\text{-}3)$$

C_1 est appelé la constante de Sauerbrey et est définie par :

$$C_1=\frac{2M}{f_1} \qquad (2.4\text{-}4)$$

Cette constante est donnée par le fabricant du cristal. Pour les cristaux que nous utilisons, C_1 = 17,7 ng.cm^{-2}.Hz^{-1}. La masse déposée, m, peut aussi être mesurée à une fréquence qui est un multiple impair, ν, de la fréquence fondamentale ($f_\nu = \nu f_1$):

$$m=-\frac{C_1}{\nu}\Delta f_\nu \qquad (2.4\text{-}5)$$

Cette relation montre que si le film déposé se comporte effectivement comme un film parfaitement rigide et solidaire du cristal, les rapports $\frac{\Delta f_\nu}{\nu}$, obtenus pour ν = 1, 3, etc., sont tous égaux.

La présence d'une solution en contact avec le cristal engendre une résistance à l'oscillation du cristal. Il a été démontré que la relation de Sauerbrey s'applique également, mais de façon approchée, à un dépôt solide au contact d'un liquide[160]. Dans ce cas, la relation n'est valable que pour des films rigides et uniformes. Or, les films multicouches que nous étudions sont très hydratés et se comportent généralement comme des gels lorsqu'ils deviennent épais. La relation de Sauerbrey n'est alors plus applicable. Les récentes évolutions techniques ont permis l'étude d'un nouveau paramètre : le facteur de dissipation D. Le facteur de dissipation est lié aux propriétés viscoélastiques (module élastique de cisaillement μ, et viscosité de cisaillement η) du dépôt.

Les relations entre les propriétés physiques du film (c'est-à-dire μ et η, la masse volumique ρ et l'épaisseur d) et les fréquences de résonance ainsi que les facteurs de dissipation correspondants ont été établies[161]. De plus, la présence d'un fluide visqueux au-dessus du film qui repose sur le cristal vibrant est également susceptible de modifier les fréquences de résonance du cristal et de contribuer à la dissipation de l'énergie mécanique[161].

Il peut donc influer sur le temps caractéristique d'amortissement du cristal après coupure de la tension excitatrice. Le fluide est caractérisé par sa viscosité de cisaillement, η_m, et sa masse volumique ρ_m, son module d'élasticité étant nul ($\mu_m = 0$). Nous nous limiterons au cas où le film étudié est considéré comme une strate homogène, adhérant parfaitement à la face supérieure du cristal. Le système physique examiné ne se compose donc que de trois parties : le cristal, le dépôt et le milieu purement visqueux. Les relations théoriques qui découleront de l'analyse du comportement de ce système pourraient être généralisées au cas où le dépôt serait formé d'un nombre arbitraire de strates, chacune étant homogène et possédant ses propres caractéristiques viscoélastiques, sa propre masse volumique et sa propre épaisseur. Il convient toutefois de réaliser que le nombre de paramètres pouvant être extraits des mesures est limité par le nombre de mesures indépendantes qui peuvent être effectuées. L'appareil dont nous disposons permet de mesurer quatre fréquences de résonance et les quatre facteurs de dissipation correspondants. Il paraît donc raisonnable de se limiter au modèle à strate unique.

Considérons tout d'abord le cristal en contact avec le milieu purement visqueux, c'est-à-dire le système sans film déposé. On suppose que le fluide est infiniment étendu dans le sens positif de l'axe Oz perpendiculaire à la surface du cristal. Pour ce fluide, l'équation de Navier-Stokes s'écrit:

$$\frac{\partial \vec{v}_m}{\partial t} + (\vec{v}_m \vec{\nabla})\vec{v}_m = -\frac{1}{\rho_m}\vec{\nabla} p + \frac{\eta_m}{\rho_m}\Delta \vec{v}_m + \vec{F}_m \qquad (2.4\text{-}6)$$

où $\vec{v}_m$ et $\vec{F}_m$ représentent respectivement la vitesse d'un élément du fluide et une force externe s'y appliquant, et p représente la pression. Nous négligeons les effets de la pression ainsi que le terme non linéaire, $(\vec{v}_m \vec{\nabla})\vec{v}_m$. De plus, nous traitons le cas où aucune force externe ne s'applique au fluide. En outre, étant donné que le fluide ne se déplace que dans la direction de vibration du cristal, l'équation vectorielle (2.4-6) se réduit à une équation scalaire à une dimension. Cette équation est vérifiée par la fonction inconnue v_m, qui dépend du temps et d'une seule variable spatiale, à savoir la distance z, à la surface supérieure du cristal. L'équation (2.4-6) se ramène ainsi à une équation de diffusion scalaire :

$$\frac{\partial v_m}{\partial t} = \frac{\eta_m}{\rho_m}\frac{\partial^2 v_m}{\partial z^2} \qquad (2.4\text{-}7)$$

La transformée de Fourier (TF) de cette équation par rapport au temps conduit à :

$$\frac{\partial^2 \tilde{v}_m}{\partial z^2} = i\omega \frac{\rho_m}{\eta_m}\tilde{v}_m \qquad (2.4\text{-}8)$$

La solution générale de cette équation est :

$$\tilde{v}_m(z) = \tilde{v}_0 e^{(-ik_m z)} + \tilde{v}_1 e^{(ik_m z)} \tag{2.4-9}$$

avec :

$$k_m = \sqrt{-i\omega\frac{\rho_m}{\eta_m}} = (1-i)\sqrt{\frac{\omega\rho_m}{2\eta_m}} = \frac{1-i}{\delta} \tag{2.4-10}$$

où δ est la profondeur de pénétration visqueuse[161]. Puisque $\tilde{v}_m(z)$ doit tendre vers 0 quand z tend vers l'infini, le coefficient $\tilde{v}_1$ doit être nul et l'équation (2.4-9) se réduit à :

$$\tilde{v}_m(z) = \tilde{v}_0 e^{\left(-(1+i)\sqrt{\frac{\omega\rho_m}{2\eta_m}}z\right)} \equiv \tilde{v}_0 e^{\left(-(1+i)\frac{z}{\delta}\right)} \tag{2.4-11}$$

Considérons le cas où le film est viscoélastique, assimilé à une strate unique, et en contact d'une part avec le cristal et d'autre part avec le milieu visqueux. L'épaisseur du film étant d, il est compris entre les plans parallèles à la surface supérieure du cristal, de hauteurs $z = 0$ et $z = d$. Le fluide quant à lui occupe le demi-espace entre $z = d$ et $z = \infty$. Il peut être utile de rappeler ici que nous partons de l'hypothèse qu'il n'y a pas de glissement à l'interface cristal-film, et de même pour l'interface film-fluide (condition de continuité). Cette condition implique que les vitesses de vibration sont identiques de part et d'autre d'une interface au voisinage immédiat de celle-ci, et que la force appliquée à une unité d'aire orthogonale à la direction de vibration est également la même de part et d'autre d'une interface, au voisinage immédiat de celle-ci. Cette force F_p, est directement reliée à la contrainte de cisaillement σ, par la relation $\sigma = \mu\frac{\partial u}{\partial z} + \eta\frac{\partial v}{\partial z}$.

Dans le cas d'un film multicouche, chaque couche est caractérisée par son module élastique de cisaillement, sa viscosité de cisaillement, sa masse volumique et son épaisseur. Ainsi, la $j^{ème}$ couche ($1 \le j \le n$) est caractérisée par les quatre paramètres μ_j, η_j, ρ_j et d_j. Le fluide en contact avec le film est traité comme la $(n + 1)^{ème}$ couche du système et est caractérisé par sa viscosité η_{n+1} et sa masse volumique ρ_{n+1}. Ces deux paramètres ont été notés respectivement η_m et ρ_m précédemment, notation qui sera reprise plus tard. Notons aussi que le fluide visqueux semi-infini ($d_{n+1} = \infty$) ne présente pas de rigidité ($\mu_{n+1} = 0$). Précisons enfin que les couches sont numérotées à partir de la surface du cristal. La première couche est comprise entre les plans $z = z_0 = 0$ et $z = z_1 = d_1$. La $j^{ème}$ couche est comprise entre les plans $z = z_{j-1} = d_1 + d_2 + \ldots + d_{j-1}$ et $z = z_j = z_{j-1} + d_j$. L'épaisseur totale du film est égale à $d \equiv z_n$. Le fluide visqueux s'étend de $z = z_n$ à $z = \infty$. Pour calculer la réponse du cristal, il nous faut évaluer la contrainte de cisaillement σ_{xz}, que le film applique à la surface supérieure du cristal. En effet, comme nous le verrons, la force F_p est reliée à σ_{xz}. Comme le film est

stratifié, nous allons procéder couche par couche. Pour alléger la notation, nous écrirons σ au lieu de σ_{xz}. Pour la $j^{ème}$ couche, la contrainte de cisaillement est définie par :

$$\sigma_j = \mu_j \frac{\partial u_j}{\partial z} + \eta_j \frac{\partial v_j}{\partial z} \tag{2.4-12}$$

où u_j et $v = \partial u_j/\partial t$ désignent respectivement le déplacement et la vitesse d'un point à l'intérieur du film qui dépendent de z et de t. En tenant compte de l'élasticité, l'équation de Navier-Stokes dans le film conduit à :

$$\frac{\partial v_j}{\partial t} = \frac{1}{\rho_j}\frac{\partial \sigma_j}{\partial z} = \frac{\mu_j}{\rho_j}\frac{\partial^2 u_j}{\partial z^2} + \frac{\eta_j}{\rho_j}\frac{\partial^2 v_j}{\partial z^2} \tag{2.4-13}$$

En appliquant la TF par rapport au temps à cette équation, on obtient :

$$\frac{\partial^2 \tilde{v}_j}{\partial z^2} = -\frac{\omega^2 \rho_j}{\mu_j^*}\tilde{v}_j \tag{2.4-14}$$

où $\mu_j^* = \mu_j + i\omega\eta_j$ est le module de cisaillement complexe de la $j^{ème}$ couche. La solution générale de l'équation (2.4-14) est :

$$\tilde{v}_j(z) = \tilde{v}_j^+(z) + \tilde{v}_j^-(z) \tag{2.4-15}$$

avec

$$\begin{cases} \tilde{v}_j^+(z) = \tilde{v}_{j,0}^+ \exp(ik_j z) \\ \tilde{v}_j^-(z) = \tilde{v}_{j,0}^- \exp(-ik_j z) \end{cases} \tag{2.4-16}$$

où $\tilde{v}_{j,0}^+$ et $\tilde{v}_{j,0}^-$ sont des constantes imposées par les conditions aux limites aux deux plans qui définissent la couche, et k_j est le nombre complexe défini par :

$$k_j = \omega\sqrt{\frac{\rho_j}{\mu_j^*}}\,. \tag{2.4-17}$$

En remplaçant μ_j^* par sa définition, on obtient :

$$k_j = \omega\left(\frac{\rho_j^2}{\mu_j^2 + \omega^2\eta_j^2}\right)^{\frac{1}{4}}\left[\cos\left(\frac{1}{2}\arctan\left(\frac{\omega\eta_j}{\mu_j}\right)\right) - i\sin\left(\frac{1}{2}\arctan\left(\frac{\omega\eta_j}{\mu_j}\right)\right)\right] \tag{2.4-18}$$

L'inverse de la partie réelle de ik_j définit la profondeur de pénétration δ*, pour un milieu viscoélastique, et généralise la définition de δ donnée par l'équation (2.4-10). Cette grandeur a un grand intérêt pratique car elle correspond à la distance caractéristique sur laquelle le film

peut être sondé par la microbalance. Nous définissons le paramètre $\chi = \mu_j/\omega\eta_j$, ce qui permet de donner l'expression suivante de δ^* :

$$\delta^* = \sqrt{\frac{2\eta_j}{\omega\rho_j}}\sqrt{\frac{1+\chi^2}{\sqrt{1+\chi^2}-\chi}} \equiv \delta\sqrt{\frac{1+\chi^2}{\sqrt{1+\chi^2}-\chi}} \tag{2.4-19}$$

L'équation (2.4-15) peut être écrite pour les plans situés aux hauteurs $z = z_{j-1}$ et $z = z_j$ qui délimitent la $j^{ème}$ couche. En utilisant l'équation (2.4-16), on observe alors que les composantes de la vitesse sur le plan inférieur sont reliées à celles sur le plan supérieur par la relation matricielle :

$$\begin{pmatrix} \tilde{v}_j^+(z_{j-1}) \\ \tilde{v}_j^-(z_{j-1}) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \exp(-ik_j d_j) & 0 \\ 0 & \exp(ik_j d_j) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \tilde{v}_j^+(z_j) \\ \tilde{v}_j^-(z_j) \end{pmatrix} \tag{2.4-20}$$

Avec $d_j = z_j - z_{j-1}$. Dans ce qui suit, la matrice 2×2 définie par la relation (2.4-20) sera notée $\mathbf{L_j}$. A l'interface séparant les couches j et $j + 1$, la condition de non glissement (ou condition de continuité) implique l'égalité des vitesses et des contraintes de cisaillement (ou de leurs TF) de part et d'autre de l'interface :

$$\begin{cases} \tilde{v}_j(z_j) = \tilde{v}_{j+1}(z_j) \\ \tilde{\sigma}_j(z_j) = \tilde{\sigma}_{j+1}(z_j) \end{cases} \tag{2.4-21}$$

La combinaison des relations (2.4-12), (2.4-15), (2.4-16) et la relation $\tilde{u}_j = \tilde{v}_j / i\omega$ permettent d'exprimer la TF de la contrainte de cisaillement dans la $j^{ème}$ couche :

$$\tilde{\sigma}_j = \mu_j \frac{\partial \tilde{u}_j}{\partial z} + \eta_j \frac{\partial \tilde{v}_j}{\partial z} = \frac{\mu_j^*}{i\omega}\frac{\partial \tilde{v}_j}{\partial z} = \frac{k_j \mu_j^*}{\omega}\left[\tilde{v}_j^+(z) - \tilde{v}_j^-(z)\right] \tag{2.4-22}$$

Alors, les relations (2.4-21) associées à la relation (2.4-15) peuvent se réécrire :

$$\begin{cases} \tilde{v}_j^+ + \tilde{v}_j^- = \tilde{v}_{j+1}^+ + \tilde{v}_{j+1}^- \\ k_j \mu_j^*(\tilde{v}_j^+ - \tilde{v}_j^-) = k_{j+1}\mu_{j+1}^*(\tilde{v}_{j+1}^+ - \tilde{v}_{j+1}^-) \end{cases} \tag{2.4-23}$$

À l'interface, c'est-à-dire en $z = z_j$. Ces deux égalités s'expriment par la relation matricielle :

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 \\ k_j\mu_j^* & -k_j\mu_j^* \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \tilde{v}_j^+ \\ \tilde{v}_j^- \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ k_{j+1}\mu_{j+1}^* & -k_{j+1}\mu_{j+1}^* \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \tilde{v}_{j+1}^+ \\ \tilde{v}_{j+1}^- \end{pmatrix} \tag{2.4-24}$$

dans laquelle les quatre composantes de vitesse sont encore définies en $z = z_j$. La matrice 2×2 du membre de gauche de l'équation (2.4-24) est notée $\mathbf{M_j}$ et celle apparaissant dans le membre de droite est notée $\mathbf{M_{j+1}}$. Il découle alors de l'équation (2.4-24) que :

$$\begin{pmatrix} \tilde{v}_j^+ \\ \tilde{v}_j^- \end{pmatrix} = \mathbf{M_j^{-1} M_{j+1}} \begin{pmatrix} \tilde{v}_{j+1}^+ \\ \tilde{v}_{j+1}^- \end{pmatrix} \tag{2.4-25}$$

où l'inverse de $\mathbf{M_j}$ est défini par :

$$\mathbf{M_j^{-1}} = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & \dfrac{1}{k_j \mu_j^*} \\ 1 & -\dfrac{1}{k_j \mu_j^*} \end{pmatrix} \tag{2.4-26}$$

Les équations (2.4-20) et (2.4-25) permettent de relier la vitesse dans la première couche à la hauteur $z = 0$ à la vitesse dans le liquide à la hauteur $z = z_n = d$:

$$\begin{pmatrix} \tilde{v}_1^+(z=0) \\ \tilde{v}_1^-(z=0) \end{pmatrix} = \mathbf{L_1 M_1^{-1} M_2 L_2 M_2^{-1} M_3 ... L_n M_n^{-1} M_{n+1}} \begin{pmatrix} 0 \\ \tilde{v}_{n+1}^-(z_n) \end{pmatrix} \tag{2.4-27}$$

On notera que $3n$ matrices sont impliquées dans le produit matriciel. Les $3n - 1$ premières matrices contiennent les caractéristiques des n couches constituant le film, et la dernière matrice dépend des caractéristiques du milieu visqueux. Notons aussi que $\tilde{v}_{n+1}^+(z_n) = 0$ est imposé par la condition aux limites $\tilde{v}_{n+1}(z \to \infty) \to 0$ (comme dans l'équation (2.4-9) qui s'applique au cas où le liquide est en contact direct avec le cristal). Le produit matriciel conduit à une matrice résultante $\mathbf{R} = \begin{pmatrix} R_{11} & R_{12} \\ R_{21} & R_{22} \end{pmatrix}$, et donc à :

$$\begin{pmatrix} \tilde{v}_1^+(z=0) \\ \tilde{v}_1^-(z=0) \end{pmatrix} = \tilde{v}_{n+1}^-(z_n) \begin{pmatrix} R_{12} \\ R_{22} \end{pmatrix} \tag{2.4-28}$$

Puisque $F_p = \sigma(z = 0)$, il découle des expressions (2.4-22) et (2.4-28) que la TF de la force par unité d'aire exercée sur le cristal par l'ensemble film-liquide s'écrit :

$$\tilde{F}_p = \tilde{\sigma}(z=0) = \frac{\mu_1^*}{i\omega} \frac{\partial \tilde{v}_1}{\partial z}\bigg|_{z=0} = \frac{k_1 \mu_1^*}{\omega} (\tilde{v}_1^+(z=0) - \tilde{v}_1^-(z=0)) = \frac{k_1 \mu_1^*}{\omega} (R_{12} - R_{22}) \tilde{v}_{n+1}^-(z_n) \tag{2.4-29}$$

La relation (2.4-28), associée aux expressions (2.4-15) et (2.4-16), conduit à la TF de la vitesse dans la première couche en $z = 0$:

$$\tilde{v}_1(z=0) = \tilde{v}_1^+(z=0) + \tilde{v}_1^-(z=0) = (R_{12} + R_{22}) \tilde{v}_{n+1}^-(z_n) . \tag{2.4-30}$$

Sachant que $\tilde{v}_1 = i\omega \tilde{u}_1$, l'expression devient :

$$\tilde{v}_{n+1}^{-}(z_n) = \frac{i\omega\tilde{u}_1}{R_{12} + R_{22}} \tag{2.4-31}$$

En introduisant cette relation dans l'équation (2.4-29), on obtient l'expression de $\tilde{F}_p$ en fonction des caractéristiques du film et du liquide et de la TF du déplacement en $z = 0$:

$$\tilde{F}_p = ik_1\mu_1^* \frac{R_{12} - R_{22}}{R_{12} + R_{22}} \tilde{u}_1(z = 0) \tag{2.4-32}$$

En raison de la continuité (condition de non glissement), $\tilde{u}_1(z = 0)$ dans le film est identique à $\tilde{u}$, qui représente la TF du déplacement d'un point de la surface supérieure du cristal. Par conséquent, la TF de l'équation du mouvement (équation (2.4-1)) conduit à :

$$\tilde{u} = \frac{F_0}{M\left(-\omega^2 + i\gamma_a\omega + \omega_1^2 - \dfrac{ik_1\mu_1^*}{M}\dfrac{R_{12} - R_{22}}{R_{12} + R_{22}}\right)} \tag{2.4-33}$$

où l'on a supposé que F_{ext} est donné par $F_{ext} = F_0 \exp(i\omega t)$. Il s'ensuit que $\tilde{F}_{ext}$ a été remplacé par F_0. La fréquence qui annule la partie réelle du dénominateur du membre de droite de la relation (2.4-33) constitue une bonne approximation de la fréquence de résonance, correspondant à la présence du film déposé sur le cristal et à celle du fluide visqueux au-dessus du film. Il en découle que le décalage de fréquence est donné par :

$$\Delta f_{film+fluide} = \frac{\Delta\omega}{2\pi} \approx -\frac{1}{4\pi M\omega_1} \mathrm{Re}\left(ik_1\mu_1^* \frac{R_{12} - R_{22}}{R_{12} + R_{22}}\right)_{\omega=\omega_1} \tag{2.4-34}$$

Pour un oscillateur harmonique régi par l'équation (2.4-2), le facteur de dissipation (inverse du facteur de qualité) au voisinage de la résonance est donné par $D = \dfrac{\gamma_a}{\omega_1}$. Quand le cristal est recouvert d'un film viscoélastique en contact avec un fluide visqueux, le facteur de dissipation devient[160] :

$$D_{film+fluide} = \frac{1}{\omega_1}\left[\gamma_a - \mathrm{Im}\left(\frac{i\sqrt{\rho_1\mu_1^*}}{M}\frac{R_{12} - R_{22}}{R_{12} + R_{22}}\right)_{\omega=\omega_1}\right] \tag{2.4-35}$$

Dans les équations (2.4-34) et (2.4-35), le membre de droite est évalué en $\omega = \omega_1$. Si le décalage de fréquence et le facteur de dissipation doivent être calculés pour l'harmonique d'ordre $\nu > 1$, ω_1 est simplement remplacé par $\omega_\nu = \nu\omega_1$ dans ces équations. L'équation (2.4-34) donne la variation de la fréquence de résonance quand le cristal est recouvert d'un film viscoélastique en contact avec un milieu visqueux, par rapport à la fréquence de résonance du

même cristal dans le vide. L'équation (2.4-35) exprime le facteur de dissipation du cristal également pour l'ensemble cristal-film-fluide.

Du point de vue expérimental, il est commode d'utiliser l'ensemble cristal-fluide (où le fluide est par exemple la solution tampon) comme système de référence. Ce système peut être vu comme une forme particulière du système général où les paramètres μ, η et ρ de toutes les couches du film sont égaux entre eux et égaux à ceux du liquide visqueux. Le produit matriciel **R** se réduit alors à $\mathbf{R} = \mathbf{L_1 L_2 \ldots L_j \ldots L_n}$. Puisque $\mathbf{L_j}$ est une matrice diagonale quel que soit *j*, **R** est une matrice diagonale également, et par conséquent $\frac{R_{12} - R_{22}}{R_{12} + R_{22}} = -1$. Il s'ensuit que le décalage de fréquence et le facteur de dissipation deviennent :

$$\Delta f_{\text{tampon}} = \frac{\Delta\omega}{2\pi} \approx -\frac{1}{4\pi M}\sqrt{\frac{\rho_m \eta_m \omega_1}{2}} \tag{2.4-36}$$

et

$$D_{\text{tampon}} = \frac{1}{\omega_1}\left(\gamma_a + \frac{1}{M}\sqrt{\frac{\rho_m \eta_m \omega_1}{2}}\right) \tag{2.4-37}$$

où l'indice "n+1" a été remplacé par "m" pour indiquer de façon explicite que ces deux équations s'appliquent au système particulier film-milieu visqueux. En soustrayant les équations (2.4-36) et (2.4-37) respectivement des équations (2.4-34) et (2.4-35) on obtient :

$$\Delta f = \Delta f_{\substack{\text{film+}\\\text{tampon}}} - \Delta f_{\text{tampon}} \approx -\frac{1}{4\pi M\omega_1}\left[\text{Re}\left(ik_1\mu_1^* \frac{R_{12} - R_{22}}{R_{12} + R_{22}}\right)_{\omega=\omega_1} - \omega_1\sqrt{\frac{\rho_m \eta_m \omega_1}{2}}\right] \tag{2.4-38}$$

$$\Delta D = D_{\substack{\text{film+}\\\text{tampon}}} - D_{\text{tampon}} = -\frac{1}{M\omega_1}\left[\text{Im}\left(i\sqrt{\rho_1\mu_1^*} \frac{R_{12} - R_{22}}{R_{12} + R_{22}}\right)_{\omega=\omega_1} + \sqrt{\frac{\rho_m \eta_m \omega_1}{2}}\right] \tag{2.4-39}$$

Les expressions (2.4-38) et (2.4-39) constituent les relations de base servant à analyser les données expérimentales dans le but d'en tirer les paramètres du film. Ici également, $\nu\omega_1$ doit remplacer ω_1 si les mesures correspondent à des harmoniques d'ordres supérieurs à 1. Pour éviter toute ambiguïté, il peut être utile de préciser que Δf et ΔD, donnés par les équations (2.4-38) et (2.4-39), reflètent la présence du film déposé mais ne sont pas identiques à Δf et ΔD qui seraient mesurés si le film était en contact avec le vide.

Dans le cas particulier d'un film considéré comme une couche unique (milieu 1) déposé sur le cristal et en contact avec un fluide visqueux (milieu 2), le rapport $\left(\frac{R_{12} - R_{22}}{R_{12} + R_{22}}\right)_{\omega=\omega_1}$ s'écrit explicitement :

$$\left(\frac{R_{12}-R_{22}}{R_{12}+R_{22}}\right)_{\omega=\omega_1} = -\left[\frac{i\sin(k_1d_1)+(1+i)\sqrt{\frac{\rho_2\eta_2\omega}{2\rho_1\mu_1^*}}\cos(k_1d_1)}{\cos(k_1d_1)-(1-i)\sqrt{\frac{\rho_2\eta_2\omega}{2\rho_1\mu_1^*}}\sin(k_1d_1)}\right]_{\omega=\omega_1} \quad (2.4\text{-}40)$$

D'après l'équation (2.4-17), le produit k_1d_1 peut s'écrire $\frac{\rho_1 d_1}{\sqrt{\rho_1\mu_1^*}}$. Par ailleurs, le produit $\rho_1\mu_1^*$ se développe en $\rho_1\mu_1 + i\omega\rho_1\eta_1$. Par conséquent, le milieu 1 n'est caractérisé que par les trois paramètres indépendants $\rho_1\mu_1$, $\rho_1\eta_1$ et $\rho_1 d_1$. Ceci signifie que toute augmentation (respectivement diminution) de ρ_1 peut être exactement compensée par une diminution (respectivement augmentation) contraire des paramètres μ_1, η_1 et d_1. Notons encore que le produit $\rho_1 d_1$ représente la masse par unité d'aire du film déposé, y compris les molécules de solvant présentes dans le film.

En principe, il est donc possible de déterminer, à partir des mesures de Δ_f et Δ_D pour différentes harmoniques, le module élastique de cisaillement, la viscosité de cisaillement et l'épaisseur de la couche déposée sur le cristal, à l'aide des équations (2.4-38 et 2.4-39). Pour l'exploitation de nos données, nous avons toujours fixé la masse volumique du film à 1 g.cm^{-3}. Par ailleurs, la masse volumique du fluide visqueux (solution aqueuse de NaCl à 0,15 M) est fixée à 1,009 g cm^{-3}, et sa viscosité à 0,91 mPa.s.

Les cristaux utilisés sont de type QSX 303 (cristaux de quartz recouverts d'un film de SiO_2 de 100 nm (Q-Sense)). Ils possèdent une fréquence de résonance fondamentale de 5 MHz et des fréquences harmoniques de 15, 25 et 35 MHz. Les fréquences de résonance du cristal sont mesurées avec une précision de 1 Hz. Dans ces conditions, la sensibilité en masse de l'appareil est de ~5 ng/cm^2 dans l'eau et de ~1 ng/cm^2 dans l'air, à la fréquence de résonance fondamentale de 5 MHz.

2.4.2 Protocole expérimental

Avant chaque expérience, le cristal est nettoyé *in situ*, avec une solution de Hellmanex à 2%, pendant une demi-heure, à température ambiante. Il est ensuite rincé avec du HCl 0,1 M, puis lavé à l'eau et séché à l'azote, puis replacé dans le boîtier de le QCM-D (figure 2.4.2-1). La construction d'un film multicouche par trempage sur le cristal oscillant se déroule de la

même manière qu'au robot ou dans le spectromètre infrarouge. On procède par injection alternée des solutions de rinçage (1), de polycations (2) et de polyanions (3).

Figure 2.4.2-1 Photographie d'une QCM-D.

Les temps d'adsorption et de rinçage sont de 10 minutes (figure 2.4.2-2). Il faut utiliser environ 2 mL de solution par dépôt, et la température de mesure est fixée à 25°C.

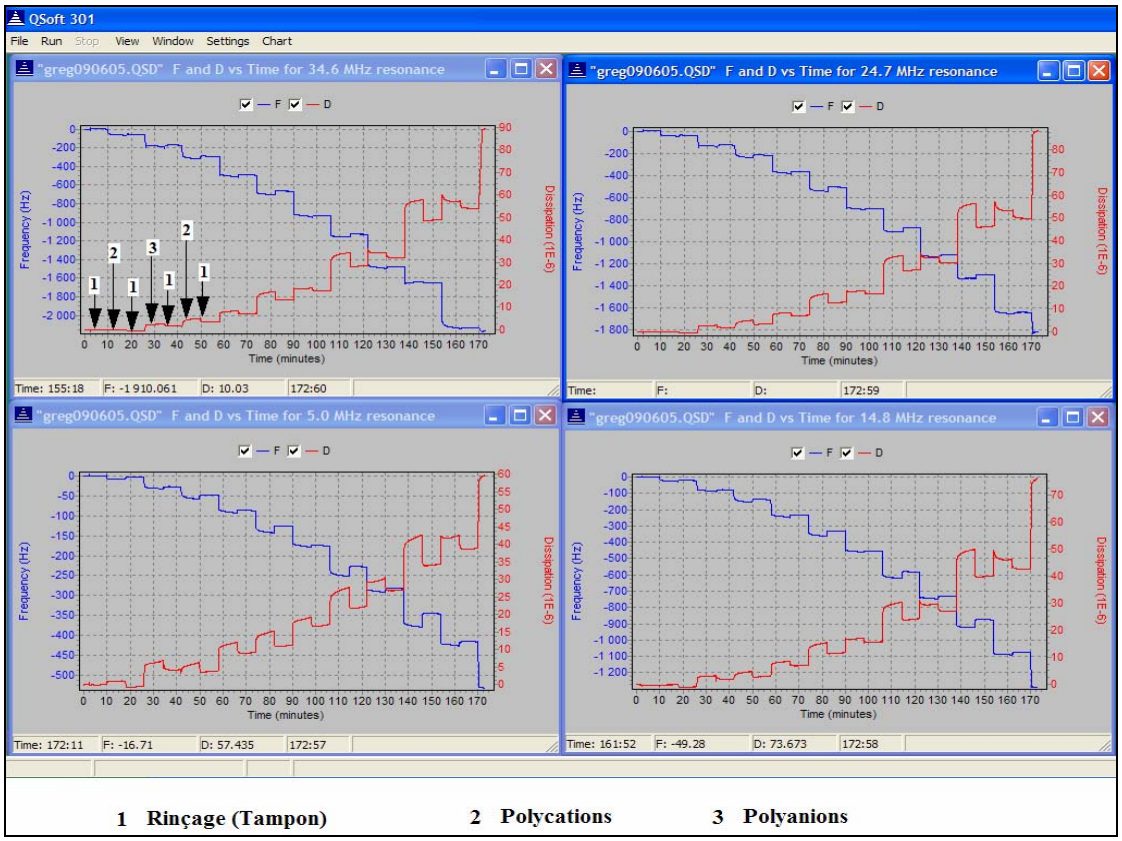


Figure 2.4.2-2 Capture d'écran de l'acquisition d'une expérience de QCM-D.

Elle est régulée par un système de chauffage intégré. Le temps séparant deux mesures n'est que de quelques secondes, ce qui permet d'observer les cinétiques de dépôt et de désorption.

Grâce au logiciel « Q-Tools », on peut suivre les paramètres qui nous intéressent, à savoir les différences de fréquence Δf_v et les dissipations D_v (figure 2.4.2-2), en fonction du temps. Ces courbes sont traitées manuellement afin d'obtenir les variations des paramètres en fonction du nombre de couches déposées (figure 2.4.2-3).

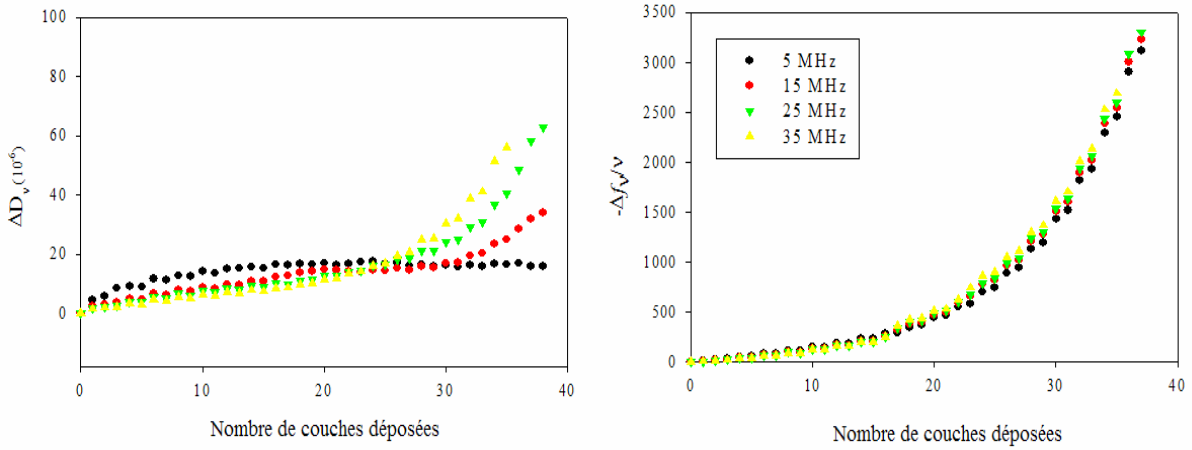


Figure 2.4.2-3 Evolution des paramètres $-\Delta f_v$ et ΔD_v au cours de la construction d'un film (X/Y).
Les courbes sont représentées en fonction des couches déposées.

Ces courbes sont traitées manuellement afin d'obtenir les variations des paramètres en fonction du nombre de couches déposées (figure 2.4.2-3).

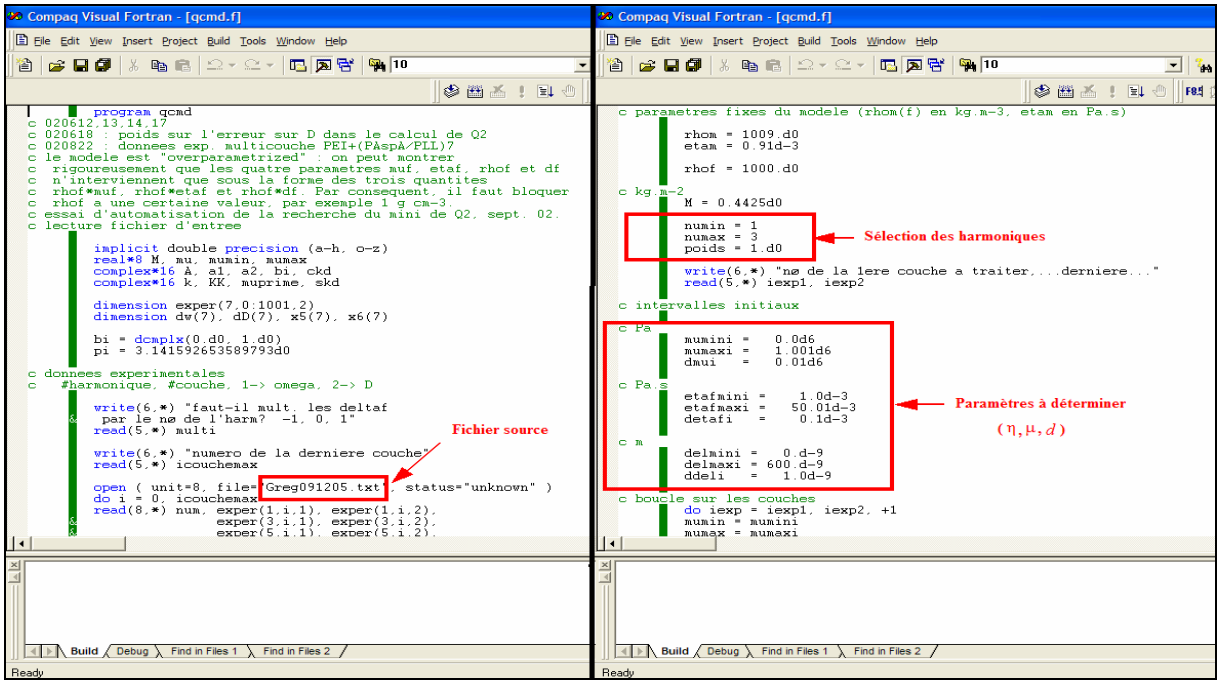


Figure 2.4.2-4 Capture d'écran montrant le programme de traitement des données QCM-D.

Les données recueillies sont stockées sous forme de tableau dans un fichier de type « Experience-2006.txt ». L'évolution de la variation des fréquences et des dissipations correspondantes donne une indication sur la nature de la croissance du film construit, ainsi

que sur ses propriétés viscoélastiques. Si le film construit est peu dissipatif, il contient peu d'eau et est, par conséquent, relativement rigide. A l'inverse, si la dissipation est élevée, il présente un caractère visqueux marqué. Par ailleurs, l'allure de la croissance de $-\Delta f_v$ est un bon indicateur de la catégorie à laquelle le film appartient : film à croissance linéaire ou film à croissance exponentielle.

Pour affiner l'analyse des données expérimentales, il s'avère nécessaire de les soumettre à un traitement basé sur le formalisme mentionné précédemment. Un programme informatique basé sur ces équations a été développé à l'unité de Recherche INSERM U.595, afin d'extraire les trois paramètres caractéristiques d'un film (épaisseur *d*, viscosité η et module de cisaillement μ) des données recueillies au cours de sa construction.

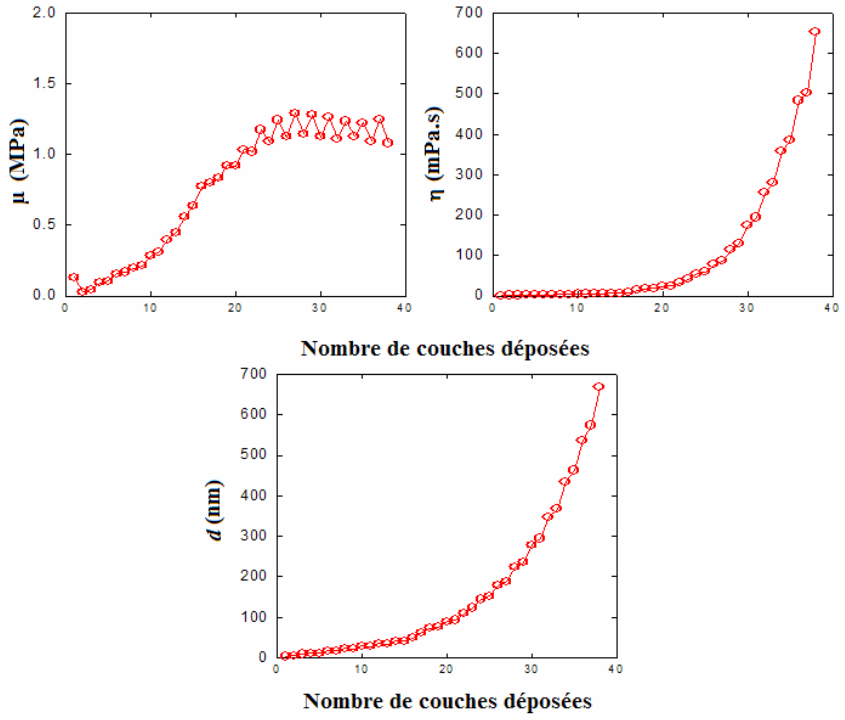


Figure 2.4.2-5 Résultats issus du traitement des données.
Graphes montrant les caractéristiques d'un film lors de sa construction (module de cisaillement μ, viscosité η et épaisseur d).

Ce programme (figure 2.4.2-4) permet de sélectionner les harmoniques et les couches déposées qui seront incluses dans le traitement des données. Le programme permet un traitement indépendant de chacune des couches déposées. Au cours de nos travaux, nous nous intéresserons uniquement à la variation d'épaisseur *d* du film déposé (figure 2.4.2-5). Cependant les deux autres paramètres (μ le module de cisaillement et η la viscosité) nous donnent une estimation des propriétés mécaniques des films construits.

2.5 Ellipsométrie

L'ellipsométrie est une technique de caractérisation optique qui trouve des applications dans de nombreux domaines. Elle est très utilisée pour la caractérisation de films semi-conducteurs, des couches optiques minces, de films d'oxyde à la surface de métaux, de films polymères. Cette technique de mesure est très sensible et offre l'avantage d'être non-destructive. Elle repose sur un changement de l'état de polarisation de la lumière lors d'une réflexion sur la surface séparant deux dioptres. Rappelons que la direction de polarisation de la lumière correspond à la direction du champ électrique. La mesure de ce changement de polarisation lors de la réflexion de la lumière permet de remonter aux propriétés optiques du film déposé, notamment son épaisseur et son indice de réfraction moyen (figure 2.5.0-1).

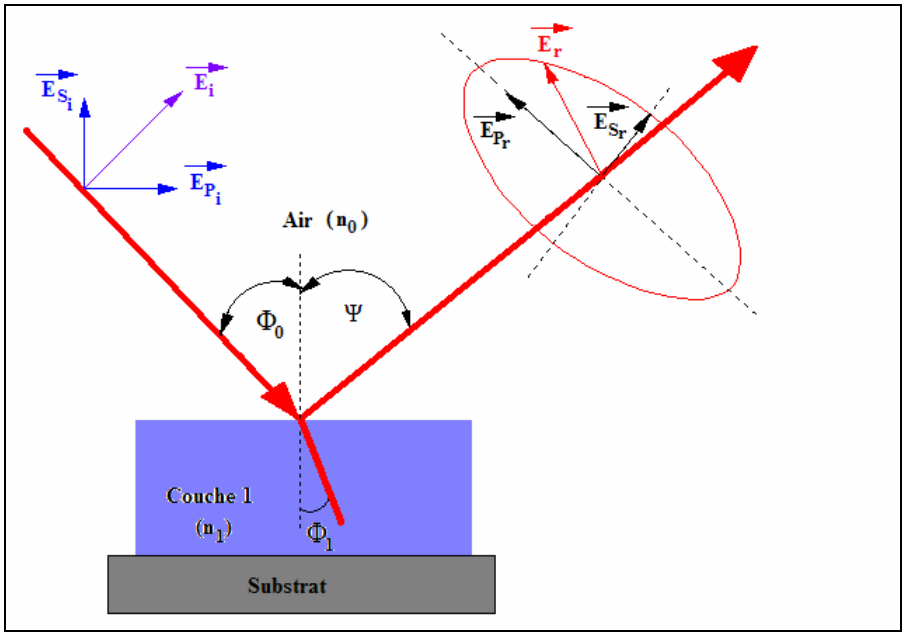


Figure 2.4.2-1 Schéma de principe de la technique d'ellipsométrie.

2.5.1 Description de l'appareil

L'appareil utilisé est un ellipsomètre Laser PZ2000 (HORIBA Jobin Yvon SAS, France), qui permet la caractérisation de l'épaisseur (jusqu'à 20 µm) de couches minces avec une précision de l'ordre de quelques dixièmes de nanomètre. Cet appareil permet également

de réaliser des mesures en mode « réflectométrie optique ». Ce mode de mesure repose sur les interférences entre le faisceau réfléchi au niveau de l'interface film-air et le faisceau réfléchi au niveau de l'interface substrat-film. Cependant, nous n'aborderons pas le mode réflectométrie optique dans la suite de cet exposé. L'ellipsomètre est constitué de deux bras :

- un bras contenant la source lumineuse (un laser He-Ne dans notre cas), une lame quart d'onde et un polariseur fixe.
- un bras comportant un analyseur rotatif et le système de détection.

En général, sur la plupart des appareils, ces deux bras peuvent être orientés par rotation autour d'un axe passant par le plan de l'échantillon. L'angle d'incidence est l'angle entre l'axe optique du bras source et la normale à la surface de l'échantillon (figure 2.5.1.-1). Dans l'appareillage utilisé au cours de ce travail, l'angle d'incidence est maintenu constant et égal à 70°.

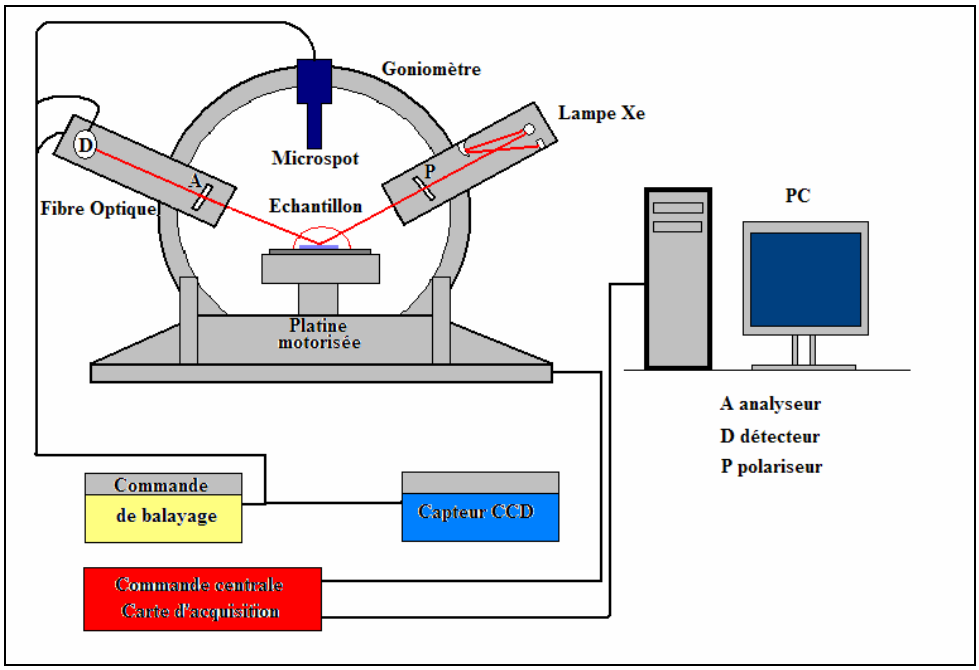


Figure 2.5.1-1 Schéma de principe de l'ellipsomètre utilisé dans cette étude.

Le polariseur :

Le faisceau laser est polarisé linéairement lors du passage par un analyseur dont l'orientation est maintenue constante (et ajusté en début d'expérience).

Le support d'échantillon :

Le support est une lame de silicium (Prolabo, Strasbourg, France) préalablement découpée (dimensions 4 x 1 cm^2) est nettoyée dans un bain d'éthanol, dans une solution de Hellmanex à

2 % (v/v) à 70 °C pendant une demi heure. Le traitement de surface se poursuit par un rinçage à l'eau et une immersion dans une solution d'acide chlorhydrique 1M à chaud afin de désorber les molécules de détergent résiduelles. Après ce traitement de surface, la lamelle est rincée à l'eau et séchée par un jet d'azote. Nous effectuons ensuite une mesure ellipsométrique afin de déterminer les paramètres optiques du film d'oxyde recouvrant la lamelle de silicium. Le film multicouche est déposé sur la lame de silicium par nébulisation d'une solution contenant les polyélectrolytes à déposer[18, 141], puis est rincé à l'eau MilliQ et enfin séché à l'aide d'un jet d'azote. L'échantillon est ensuite placé sur le support porte échantillons de l'ellipsomètre afin d'effectuer une nouvelle mesure. L'orientation de la surface optique peut être repérée à l'aide d'un microspot. La surface de l'échantillon doit être exempte de poussières et de cristaux de sel provenant de la solution tampon utilisée, car la présence de ces contaminants conduit à une surestimation de l'épaisseur du film déposé. Pour ces raisons, la surface est rincée intensivement à l'eau distillée avant toute mesure d'épaisseur.

L'analyseur :

L'analyseur, positionné après l'échantillon, est mis en rotation durant la mesure afin de déterminer la direction de la polarisation de la lumière après réflexion sur le substrat.

2.5.2 Principe de la mesure et protocole expérimental

Les données issues de la mesure sont appelées les angles ellipsométriques Φ et Ψ. L'état de la polarisation de la lumière possède deux composantes *p* et *s* :

- *p* pour la composante du champ électrique parallèle au plan d'incidence
- *s* pour la composante du champ électrique perpendiculaire au plan d'incidence

Le champ électrique $\mathbf{E}_i$ de l'onde incidente peut être décomposé suivant ces deux axes :

$$\mathbf{E}_i = \mathbf{E}_{pi} + \mathbf{E}_{si} \tag{2.5-1}$$

Après réflexion sur la surface de l'échantillon, le champ électrique est modifié. On le note :

$$\mathbf{E}_r = \mathbf{E}_{pr} + \mathbf{E}_{sr} \tag{2.5-2}$$

Les coefficients de réflexion pour ces deux directions de polarisation sont donnés par les relations :

$$R_{\mathbf{p}} = \frac{\mathbf{E_{Pr}}}{\mathbf{E_{Pi}}} = \left|R_P\right| e^{i\delta_P} \tag{2.5-3}$$

$$R_{\mathbf{S}} = \frac{\mathbf{E_{Sr}}}{\mathbf{E_{Si}}} = \left|R_S\right| e^{i\delta_S} \tag{2.5-4}$$

Les deux coefficients R_P et R_S sont des grandeurs complexes, leurs modules $\left|R_P\right|$ et $\left|R_S\right|$ représentent la modification de l'amplitude des deux composantes du champ électrique. Les déphasages δ_P et δ_S représentent le retard de phase introduit lors de la réflexion. Généralement on exprime le rapport des deux coefficients de réflectivité, noté ρ et qui dérive de l'équation fondamentale :

$$\rho = \frac{R_P}{R_S} = \mathrm{tg}(\Phi) e^{i\Psi} \text{ avec } \mathrm{tg}(\Phi) = \frac{\left|R_P\right|}{\left|R_S\right|} \tag{2.5-5}$$

Par conséquent tan(Φ) décrit le rapport des variations d'amplitude des deux composantes du champ électrique lors de la réflexion. Ψ représente la différence de phase induite lors de la réflexion sur l'échantillon. Puisque l'on mesure un rapport de deux intensités lumineuses, l'ellipsométrie est insensible aux fluctuations d'intensité de la source et ne nécessite donc aucune calibration.

Dans notre cas, la détermination des paramètres (Φ et Ψ) se fait par la « méthode de zéro » ou « méthode d'extinction ». Cette méthode utilise l'extinction du signal pour effectuer une mesure angulaire. Le montage optique est constitué d'une source monochromatique (laser ou lampe filtrée), d'un polariseur, d'un compensateur (par exemple une lame quart d'onde), d'un analyseur et d'un photomultiplicateur (figure 2.5.2-2). La polarisation, linéaire après le polariseur, est transformée en polarisation elliptique par le compensateur (une lame quart d'onde). Ce dernier est mis en rotation de manière à obtenir une polarisation linéaire après la réflexion sur l'échantillon. L'analyseur est ensuite mis en rotation de manière à être croisé avec la polarisation linéaire ainsi obtenue, ce qui conduit à l'extinction du faisceau.

Les orientations du polariseur, de la lame quart d'onde et de l'analyseur permettent de connaître les paramètres ellipsométriques de l'échantillon :

$$\mathrm{tg}(\Phi)\, e^{i\Psi} = -\mathrm{tg}(A)\, \frac{\mathrm{tg}(C) - \mathrm{tg}(P-C)}{1 + i\,\mathrm{tg}(C)\,\mathrm{tg}(P-C)} \tag{2.5-6}$$

où *A, C, P* sont respectivement les angles de l'analyseur, du compensateur et du polariseur, repérés par rapport au plan d'incidence. Pour une position donnée du compensateur, à chaque couple de valeurs (Φ, Ψ) correspondent deux paires d'angles *P* et *A*.

Cette méthode permet le calcul direct des angles Φ et Ψ à partir des valeurs de A, C et P (qui est maintenu fixe dans notre configuration expérimentale).

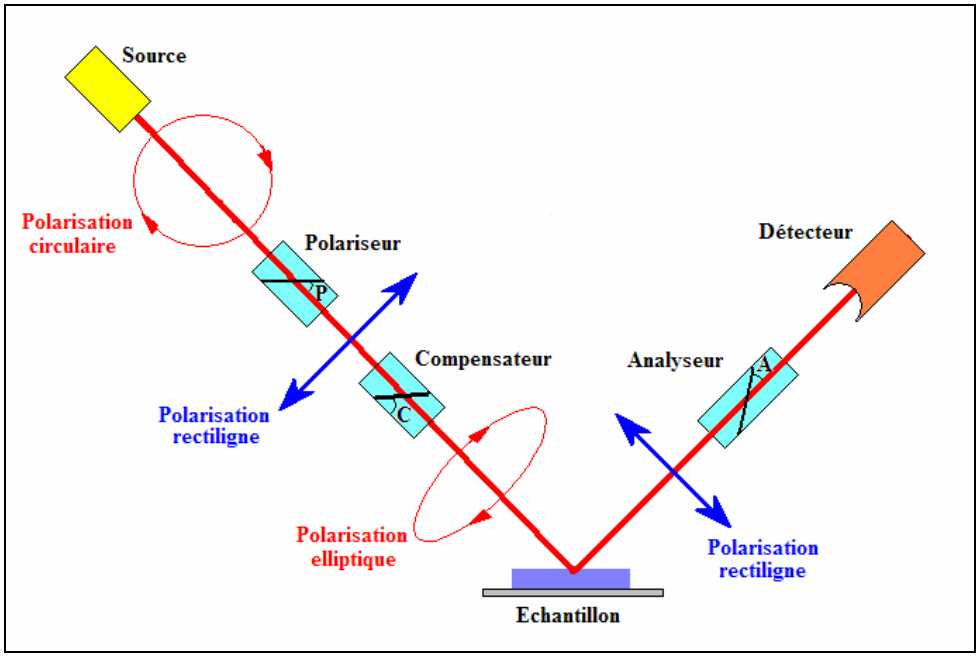


Figure 2.5.2-1 Schéma de montage de l'ellipsomètre à extinction.

Après la mesure et le calcul de (Φ,Ψ) il faut définir un modèle optique de l'interface. Dans l'ensemble de ce travail nous avons considéré que le film multicouche se comporte comme un milieu homogène et isotrope caractérisé par une épaisseur h_c et un indice de réfraction n_c. De plus nous avons fixé la valeur de l'indice de réfraction du film à 1,465 (à la longueur d'onde de 632,8 nm.) Cette valeur est assez proche des valeurs que nous avons déterminé au laboratoire pour d'autres films multicouches[13, 162]. Néanmoins ce choix arbitraire peut influencer significativement les valeurs de l'épaisseur géométrique issu de l'ajustement du modèle de Fresnel aux valeurs mesurées de Φ et Ψ. Il faut noter cependant que l'épaisseur optique, $h_c.n_c$ est un invariant optique, c'est à dire une grandeur qui ne dépend pas du choix du modèle imposé pour effectuer l'ajustement.

2.6 Analyses biologiques

2.6.1 Culture cellulaire des chondrosarcomes

Les chondrosarcomes humains HCS-2/8 sont cultivés dans le milieu de culture « Minimum Essentiel Medium » (MEM, GibcoBRL) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FCS) et des antibiotiques (pénicilline, streptomycine respectivement à 0,5% v/v (GibcoBRL)). Les cellules sont placées dans une étuve thermostatée à 37°C sous une atmosphère enrichie à 5% de CO_2. Pour le passage, les cellules sont détachées en remplaçant le milieu de culture par de la trypsine (trypsine/EDTA à 0.5%, Sigma) pendant 5 min à 37°C. Si besoin, les cellules sont stockées par congélation dans l'azote liquide. Pour cette congélation, elles sont suspendues à 10^6 cellules/mL dans un milieu contenant du MEM, 20 % de sérum de veau fœtal et 20% de diméthyle sulfoxide (DMSO, Sigma). La densité cellulaire est déterminée grâce à une cellule de Neubauer par comptage et s'exprime en nombre de cellules/mL. Pour les études de prolifération cellulaire, les cellules sont ensemencées à une concentration comprise entre 10^4 et 10^5 cellules par mL. Le milieu de culture est changé après 24 heures, 3 jours et 5 jours.

2.6.2 Observations au microscope

Les observations cellulaires sont effectuées avec un microscope TE200 (Nikon France S.A.) équipé en champ clair et en épi-fluorescence (lampe au mercure de 100 W et filtres 365/380 nm pour l'observation en UV, 495/520nm pour la visualisation du marquage à la FITC et 560/590 nm pour le marquage à la rhodamine). Les images sont prises à l'aide d'une caméra numérique DMX1200 (Nikon France S.A.) associée à un logiciel de capture d'images (Lucia 5.1, Nikon France S.A.).

Les observations photoniques des films multicouches ont été obtenues après marquage fluorescent (fluoresceine et ou rhodamine) à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (CLSM, Carl Zeiss, France) généreusement prêté par Jérôme Mutterer (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg).

2.6.3 Comptage au bleu de trypan

Le bleu de trypan est un colorant d'exclusion utilisé pour différencier les cellules mortes des cellules vivantes. En effet, les cellules vivantes n'internalisent pas ce colorant grâce à l'action de leur barrière cytoplasmique qui évacue le bleu de trypan nocif pour la cellule. Cette particularité permet la différenciation des cellules viables (incolores) et non viables (colorées en bleu) lors de la numération cellulaire avec une cellule de Neubauer.

Les cellules sont mises en culture dans des plaques de 24 puits. Les puits contiennent des lamelles de verre sur lesquelles sont construits des films multicouches de polyélectrolytes. Le verre nu est employé comme contrôle. Les différentes mesures sont réalisées après quelques heures ou plusieurs jours après l'ensemencement. Les cellules sont ensuite détachées de la surface par action de la trypsine (trypsine/EDTA à 0,5%, Sigma) pendant 5 minutes à 37°C. Les puits sont rincés avec un peu de milieu de culture, puis une solution de bleu de trypan à 0,4% est ajoutée (à 20% v/v). Après 5 minutes d'incubation, les cellules sont comptées avec une cellule de Neubauer.

Chapitre 3 : Caractérisation de films multicouches mono-domaines

Caractérisation de films multicouches mono-domaines

3.1 Etude de films natifs mono-domaines 117

3.1.1 Elasticité de films à croissance linéaire 117

3.1.2 Elasticité de films à croissance exponentielle 120

3.2 Effet de la réticulation sur l'élasticité 125

3.2.1 Réticulation des films (PLL/HA) 125

3.2.2 Effet de la réticulation sur le système (PLL/HA) 127

3.2.3 Applications biologiques 132

3.3 Conclusion 137

3.3.1 Contrôle des propriétés mécaniques 137

3.3.2 Modulation de l'adhésion cellulaire 137

Il y a plusieurs années, Pelham et Wang,[1] Lo *et al*.,[2] Wong *et al*.,[4] et Gray *et al*.[3] ont démontré que des cellules pouvaient migrer spontanément d'une région molle d'un matériau vers une région plus dure de celui-ci, quand elles étaient initialement déposées sur la région la plus molle. Ce phénomène est appelé « mécanotaxie »[3] ou « durotaxie »[2, 6, 163]. On peut ainsi contrôler la migration ou propagation cellulaires en fonction de la dureté du substrat. Engler *et al.* ont prouvé que les cellules de muscle lisse[7] et les myoblastes[164 164] s'étalent davantage à mesure que le module élastique du substrat augmente. La différentiation des myoblastes, mesurée par le pourcentage des cellules présentant une striation d'actine-myosine, est également sensible au module élastique du substrat. Cependant, la différentiation cellulaire est maximale pour une dureté optimale et non maximale[164]. Récemment, Wong *et al*. ont mis en évidence l'importance primordiale de l'élasticité d'un matériau dans l'adhésion, la migration et la prolifération de cellules déposées dessus[163]. Ces auteurs mettent en valeur, en particulier, l'importance de l'élaboration de substrats dont « les propriétés mécaniques sont réglables » et, du développement de techniques pour sonder les propriétés mécaniques de tels matériaux.

Le microscope à force atomique (AFM) dont le cantilever est pourvu d'une pointe pyramidale ou d'une sonde colloïdale sphérique est couramment employé pour mesurer le module de Young de matériaux mous (gels, films de polymères et de polyélectrolytes, cellules et tissus biologiques). Le terme « mou » est souvent employé pour caractériser certains matériaux, parce que ceux-ci sont sensiblement moins rigides que le substrat en verre (SiO_2) sur lequel ils sont déposés. En effet, les modules de Young, E, mesurés pour de nombreux biomatériaux sont inférieurs à celui mesuré pour du verre, qui est de l'ordre de 70 GPa[148, 165]. L'AFM offre l'avantage de pouvoir mesurer l'élasticité dans des régions localisées (par exemple les films monodomaines), dans un environnement hydraté s'il y a lieu. Ce dernier point est à la fois intéressant pour la biologie et pour la comparaison d'un même matériau à l'état sec et à l'état hydraté, car il existe souvent une grande différence de dureté entre ces deux états[36, 37, 166].

Le travail présenté dans ce mémoire se focalise sur la phase d'approche des cycles d'indentation, c'est-à-dire sur le laps de temps pendant lequel le dispositif piézoélectrique pousse l'échantillon à sonder vers l'indenteur. Quand l'indentation se produit, c'est-à-dire quand la sonde entre en contact avec l'échantillon, le cantilever est dévié. La déflexion de la sonde est reliée à la force s'exerçant sur l'échantillon. Le module de Young se déduit des courbes force-indentation expérimentales. Le calcul du module de Young est basé sur le

modèle de Hertz[45], et tient compte de la géométrie de la sonde indentrice[46]. Il est possible de prendre en compte les forces répulsives (électrostatiques) et adhésives[167-170] dans le traitement des courbes de force. Nous nous sommes limités au formalisme hertzien classique dans l'étude de l'élasticité de nos échantillons. Même dans l'approche hertzienne, plusieurs difficultés apparaissent, notamment la détermination expérimentale du point de contact entre la sonde et l'échantillon. La valeur du module de Young est fortement liée à l'emplacement de ce point. La deuxième difficulté réside dans le fait que le module de Young peut être influencé par la présence du substrat. S'il est infiniment dur[49], la correction à apporter au module de Young peut être évaluée à l'aide de la formule de Dimitriadis *et al*.[49]. Si le substrat ne peut pas être considéré comme parfaitement rigide, il faut faire appel à un formalisme beaucoup plus sophistiqué, développé par Chen[142] et Chen et Engel[143], que nous ne décrirons pas ici.

Le sondage d'un matériau à une seule vitesse d'approche de la sonde se fonde implicitement sur l'hypothèse que le module élastique est indépendant de la vitesse et qu'aucune force visqueuse dépendant de cette vitesse ne s'ajoute à la réaction élastique du matériau indenté. L'originalité des résultats présentés dans ce chapitre provient du fait que les mesures ont été effectuées à différentes vitesses d'approche[43, 55, 130], afin de s'affranchir de cette hypothèse. L'augmentation du module de Young apparent avec la vitesse d'approche a été clairement démontrée par Mathur *et al*. pour divers tissus biologiques, notamment les cellules cardiaques[55]. Dans ce cas, la théorie de Hertz ne suffit plus pour modéliser les courbes force-indentation. La dépendance observée est caractéristique d'effets visqueux qui ont été également mis en évidence par Mahaffy *et al*. [171, 172] et décrits par Tyrrell et Attard[173].

Par ailleurs, le modèle de Hertz suppose que le module de Young ne dépend pas de l'indentation. Cependant, Pryse *et al*. ont montré que ce module peut augmenter avec la contrainte, ce qui est notamment le cas de la plupart des matériaux biologiques, connus pour être non linéaire[59].

Dans ce travail, nous avons testé le comportement élastique des films $(PLL/HA)_n$ natifs et réticulés. Nous avons utilisé un AFM équipé d'une sonde colloïdale sphérique et effectué les mesures à plusieurs vitesses d'approche (de 10 à 10000 nm/s).

3.1 Etude de films natifs mono-domaines

Dans ce chapitre, nous présentons l'étude de systèmes relativement simples, c'est-à-dire de films multicouches mono-domaines. Cette étude est décomposée en trois étapes. La première a consisté à étudier le module de Young de films multicouches de polyélectrolytes à l'état natif, en distinguant les deux types de croissance en épaisseur (linéaire ou exponentielle) présentée au chapitre 1.1.3 La seconde étape a consisté à rigidifier chimiquement (réticulation) les films à croissance exponentielle et à étudier l'impact de la réticulation sur le module de Young. Enfin, dans la dernière étape, nous avons étudié le comportement de chondrosarcomes humains de type HCS-2/8 sur ces mêmes films afin d'établir une corrélation entre la viabilité cellulaire et le module de Young.

3.1.1 Elasticité de films à croissance linéaire

Nous avons construit un film à croissance linéaire (PAH/PSS) très documenté dans la littérature[11, 69, 91, 174, 175]. Ce film est caractérisé par un incrément de 4-5 nm par bicouche déposée, dans les conditions définies dans le chapitre 2, ainsi que par un module de Young élevé (plusieurs centaines de MPa à sec [132]). Les contraintes liées à la taille de la sonde (5 µm de diamètre) et à la technique de nanoindentation nécessitent un échantillon suffisamment épais, c'est-à-dire ayant une épaisseur supérieure à quelques centaines de nanomètres. Nous avons donc construit sur une lamelle de verre un film PEI-$(PSS/PAH)_{210}$-PSS, puis mesuré, par AFM en mode image, son épaisseur après entaille.

Construction et images AFM d'un film PEI-$(PSS/PAH)_{210}$ - PSS

Les images du film PEI-$(PSS/PAH)_{210}$-PSS en milieu aqueux montrent que celui-ci est homogène, de forte rugosité ($\rho \sim 50$ nm) et d'une épaisseur moyenne d'environ 1,1 µm (figure 3.1.1-1).

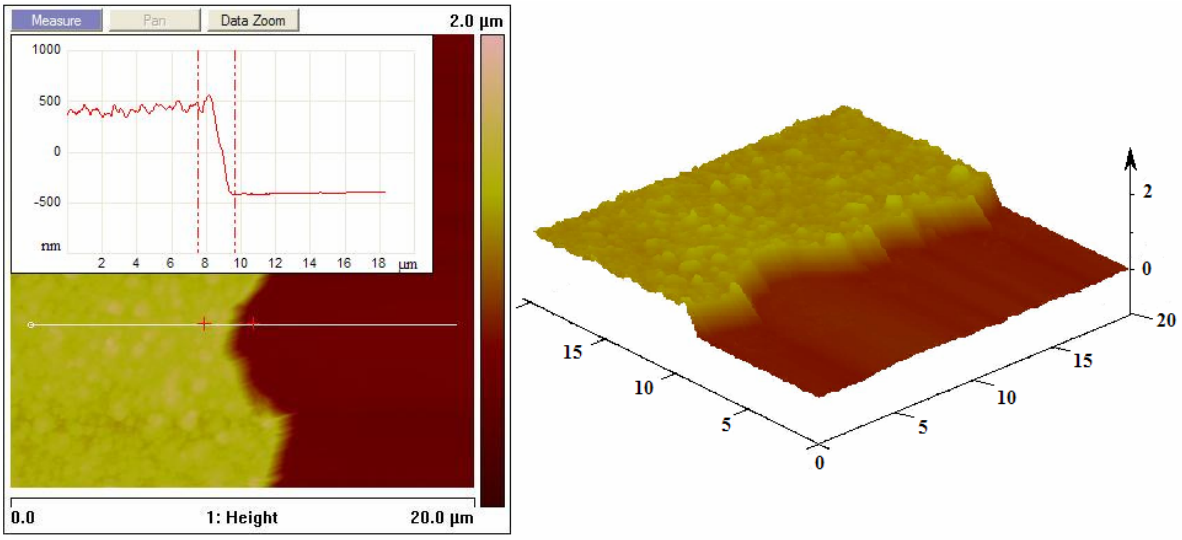


Figure 3.1.1-1 Coupe transversale d'un film (PSS/PAH)$_{210}$-PSS imagé par AFM.

Mesures de force et traitement des données

Nous avons employé la technique de nanoindentation afin de déterminer le module de Young du film PEI-(PSS/PAH)$_{210}$-PSS. La sonde utilisée est une bille colloïdale fixée à un cantilever de constante de raideur k_C = 0,580 N/m. La course maximale de la céramique piézoélectrique a été fixée à environ 2000 nm. Le mode dynamique a été utilisé sur une gamme de vitesse s'étendant de 10 à 10000 nm/s en vue d'obtenir une indication sur la nature mécanique de ce film (élastique pur ou viscoélastique).

Nous avons opéré 113 mesures de force (figure 3.1.1-2), sur l'ensemble des 16 vitesses imposées à l'actuateur piézoélectrique.

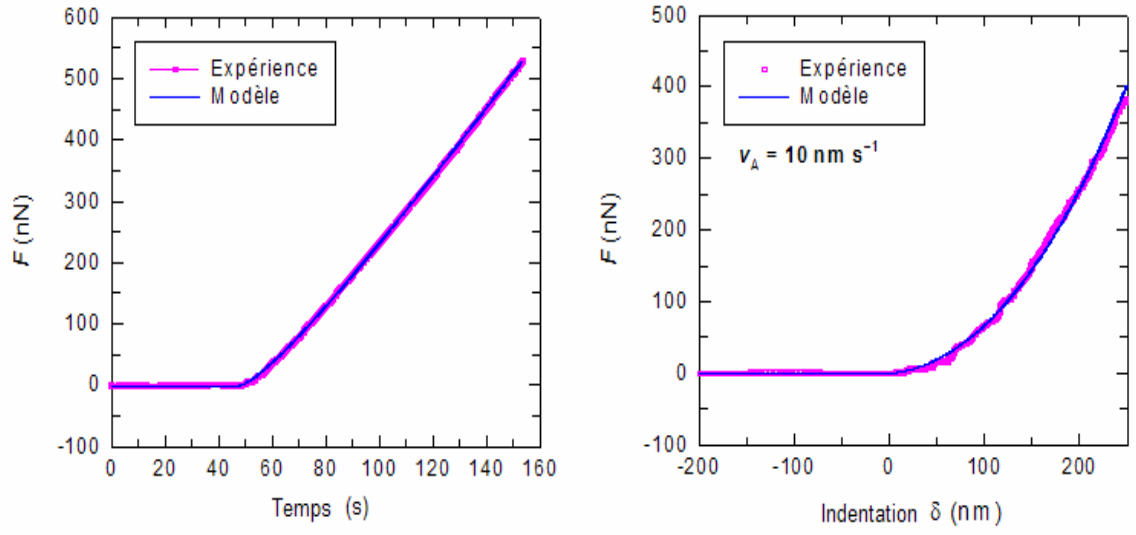


Figure 3.1.1-2 Courbe de force enregistrée à 10 nm/s.

L'étude qualitative des courbes de force en fonction de la vitesse de la céramique piézoélectrique montre que les courbes ne suivent aucun ordre hiérarchique en fonction de la vitesse (figure 3.1.1-3).

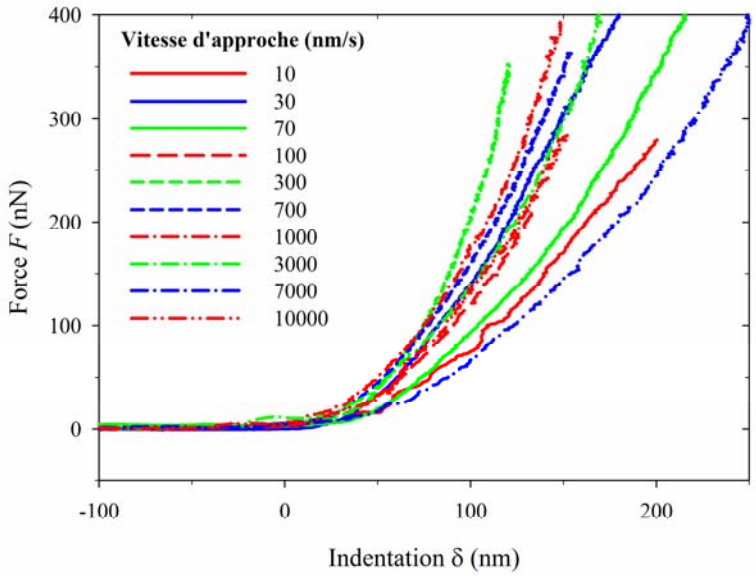


Figure 3.1.1-3 Courbes de force obtenues en fonction de la vitesse d'approche.

Cette observation suggère que le film PEI-$(PSS/PAH)_{210}$-PSS est un matériau essentiellement élastique. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons déterminé le module de Young du film pour les 113 courbes de force obtenues. Le traitement de ces courbes a été réalisé à l'aide du modèle hertzien de Dimitriadis (figure 3.1.1-4), qui permet de tenir compte de l'effet du substrat qui soutient un film relativement mince.

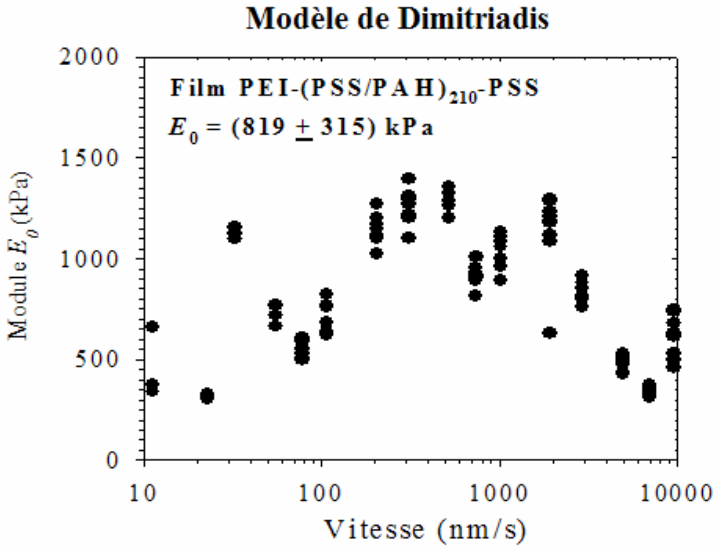


Figure 3.1.1-4 Modules de Young obtenus en fonction de la vitesse d'approche.

Le traitement des courbes de force par le modèle de Dimitriadis montre que le film PEI-$(PSS/PAH)_{210}$-PSS est à dominante élastique. Le module de Young moyen est de l'ordre de 1 MPa et la viscosité est indétectable à partir de la modélisation choisie.

3.1.2 Elasticité de films à croissance exponentielle

Construction et images des films $(PLL/PSS)_{24}$, $(PLL/HA)_{24}$ et $(CHI/HA)_{24}$

Nous avons élaboré trois types de films dont la croissance est exponentielle. Il s'agit des films (PLL/PSS), (PLL/HA) et (CHI/HA). Les deux derniers films sont caractérisés par des croissances fortement exponentielles. A nombre égal de bicouches déposées, ces deux films présentent des épaisseurs très proches (comme l'illustre la figure 3.1.2-2). Le film (PLL/PSS) est caractérisé par une croissance exponentielle plus lente (figure 3.1.2-1) que celle du film (PLL/HA). On souligne aussi que les films (CHI/HA) présentent une croissance exponentielle voisine de celle qui est observée pour les films (PLL/HA).

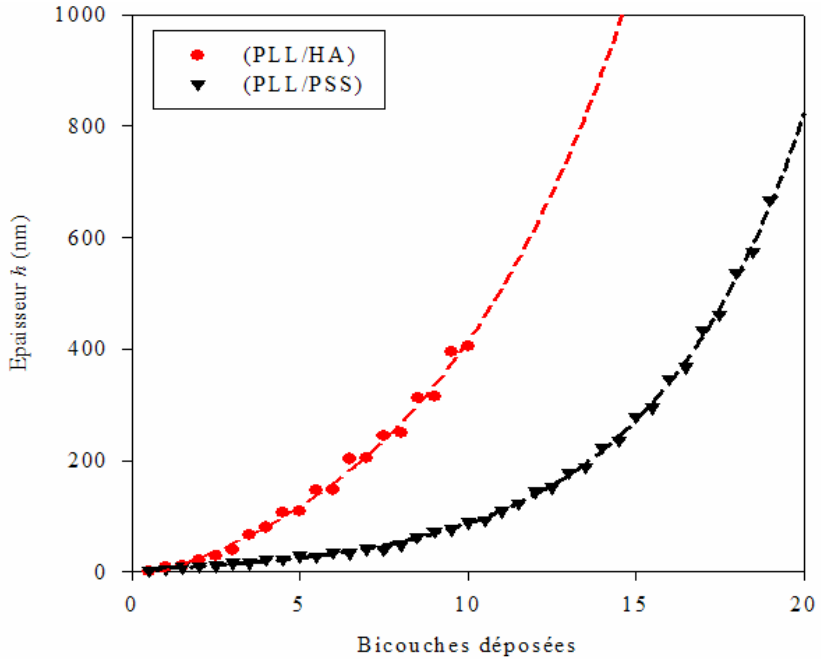


Figure 3.1.2-1 Croissances de (PLL/PSS) et (PLL/HA) mesurées par QCM-D.

Nous avons eu recours à la microscopie confocale à balayage laser (CLSM) pour imager les films à croissance exponentielle (figure 3.1.2-2). Les marqueurs fluorescents choisis sont :

- la PLL^{Fitc}, que nous avons déposée au-dessus des films $(PLL/PSS)_{24}$ et $(PLL/HA)_{24}$
- le HA^{Rho}, que nous avons déposé au-dessus de $(CHI/HA)_{24}$

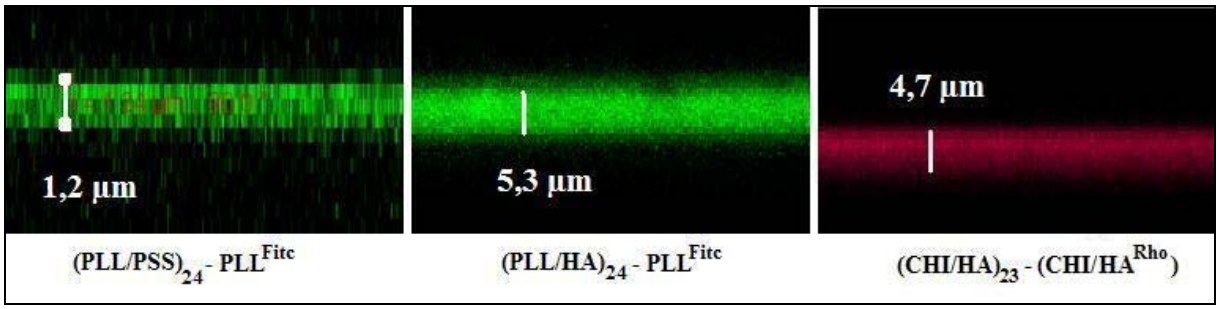


Figure 3.1.2-2 Films multicouches observés par microscopie confocale.
Observation par CLSM de films multicouches marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (Fitc) en vert et à la rhodamine(Rho) en rouge.

Mesure de force et traitement des données

Les mesures de force ont été réalisées avec un cantilever de constante de raideur k_C = 0,380 N/m pour le film $(PLL/PSS)_{24}$ et un cantilever de constante de raideur k_C = 0,060 N/m pour les films $(PLL/HA)_{24}$ et $(CHI/HA)_{24}$. Dans tous les cas étudiés, la sonde est une bille colloïdale en borosilicate de 5 µm de diamètre. Comme pour le film $PEI\text{-}(PSS/PAH)_{210}\text{-}PSS$, nous avons utilisé le mode dynamique pour mettre en évidence la viscoélasticité des films à croissance exponentielle. Les courbes de force obtenues pour $(PLL/HA)_{24}$ et $(CHI/HA)_{24}$ présentent toutes une petite adhésion juste avant le contact lors de la phase d'approche. De plus, la phase de retrait est marquée par une adhésion importante (figure 3.1.2-3) qui augmente quand la vitesse d'approche diminue.

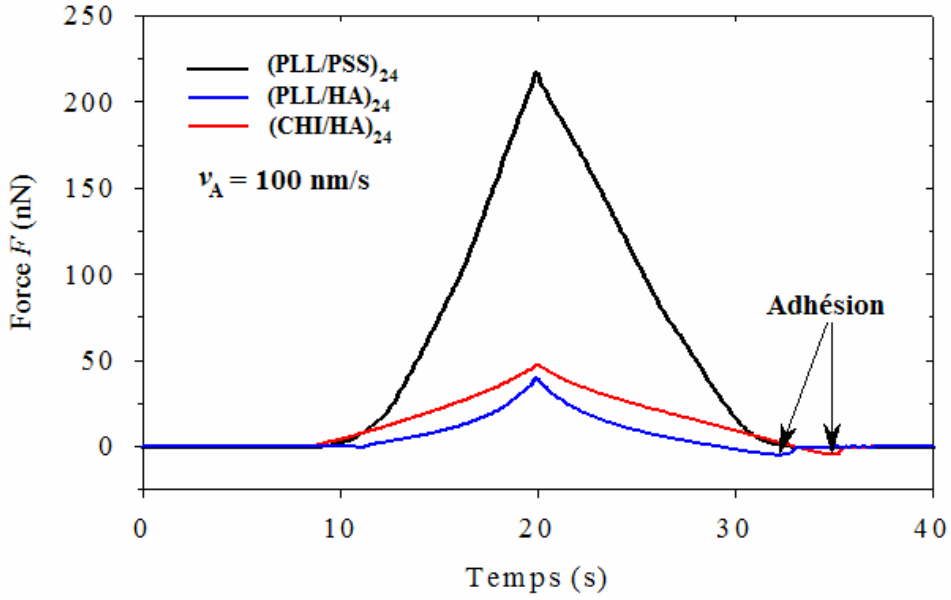


Figure 3.1.2-3 Courbes de force des films à croissance exponentielle.

L'attraction avant contact avec le film constitue un problème majeur, puisqu'il est alors très difficile de localiser le point de contact initial. Le point de contact est un paramètre qui joue un rôle primordial dans la détermination du module de Young[167] des matériaux déformables. Les courbes de force obtenues pour les films $(PLL/HA)_{24}$ et $(CHI/HA)_{24}$ présentent une dépendance avec la vitesse d'approche de la sonde (figure 3.1.2-4). En effet, quand la vitesse diminue, la pente de la courbe force-indentation diminue, cela signifie que le module de Young apparent dépend de la vitesse. Ceci est la caractéristique d'un milieu viscoélastique.

Dans le cas du film $(PLL/PSS)_{24}$, on ne note ni attraction pré-contact lors de la phase d'approche, ni d'adhésion lors de la phase de retrait (figure 3.1.2-3). Il convient de souligner que le module de Young de ce film ne montre aucune dépendance avec la vitesse d'approche (figure 3.1.2-4). Ceci est la signature d'un milieu élastique.

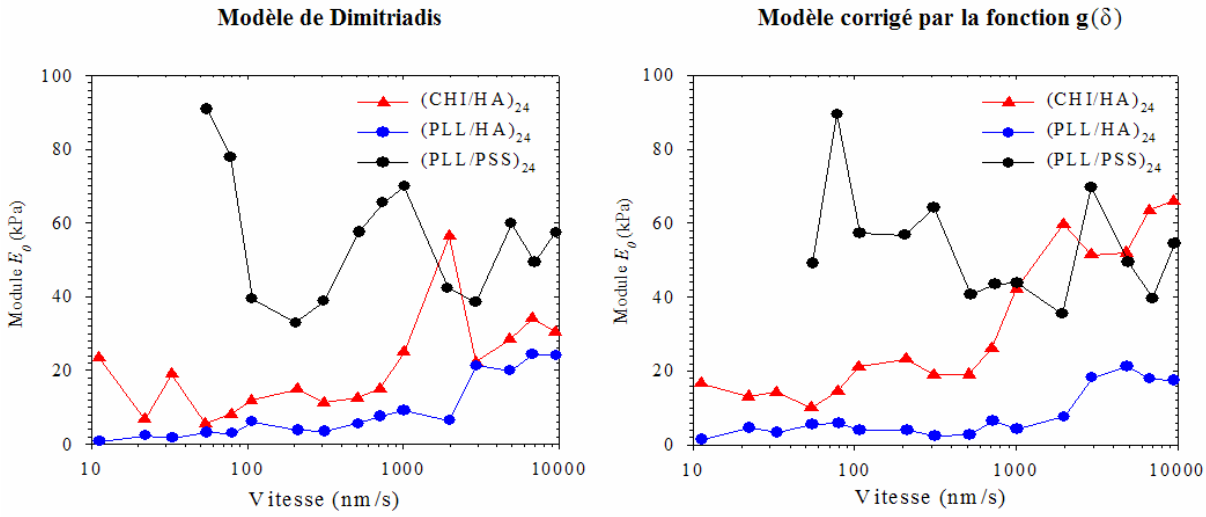


Figure 3.1.2-4 Evolution du module de Young en fonction de la vitesse d'approche.

Nous avons déterminé les modules de Young à l'aide du modèle de Dimitriadis et d'un modèle hertzien corrigé par une fonction empirique $g(\delta)$. Cette correction s'avère en effet nécessaire dans certains cas pour obtenir une un bon accord entre la courbe modélisée et la courbe expérimentale. En effet, les courbes de force expérimentales ne sont pas bien modélisées aux grandes indentations (supérieure à 200 nm) par la théorie de Dimitriadis. En outre, il apparaît un décalage entre le point de contact expérimental et le point de contact théorique. De plus, la superposition des courbes théoriques et des courbes expérimentales devient très mauvaise à partir de 200 nm d'indentation. Nous avons alors introduit une fonction corrective notée $g(\delta)$ égale à 1 quand l'indentation tend vers zéro. Cette fonction est définie par la relation :

$$g(\delta) = 1 + \left[\frac{\delta}{w}\right]^{p} \tag{3.1-1}$$

où p est un nombre sans dimension tel que $p \geq 1$ et w est une distance non nulle caractéristique du milieu telle que $w < h$. Il en résulte que la force exercée par la sonde sur le film s'écrit :

$$F = \frac{4E}{3(1-\nu^2)} R^{1/2}\, \delta^{3/2} f_D\, g(\delta) \tag{3.1-2}$$

La figure 3.1.2-5 montre l'amélioration de l'ajustement de la courbe théorique par rapport à la courbe expérimentale, notamment la détermination du point de contact, par insertion de la fonction correctrice dans l'équation 3.1-2. Les courbes théoriques issues du modèle de Dimitriadis et du modèle de Dimitriadis modifié par la fonction correctrice $g(\delta)$ sont, comme prévu, confondues pour des indentations suffisamment petites ($\delta \leq 200$ nm). Pour de plus grandes indentations, on observe une divergence entre les deux courbes théoriques qui croît avec l'indentation. Parallèlement, on remarque que la correction permet un meilleur ajustement de la courbe théorique sur tout le domaine d'indentation. Ces résultats montrent que si l'on restreint l'analyse des courbes de force à des indentations ne dépassant pas environ 200 nm, l'adjonction d'une fonction correctrice n'est pas nécessaire. On remarque aussi que dans la plupart des cas, la valeur du module de Young calculée à l'aide du modèle corrigé est légèrement inférieure à celle calculée sans correction (tableau 3.1.2-1).

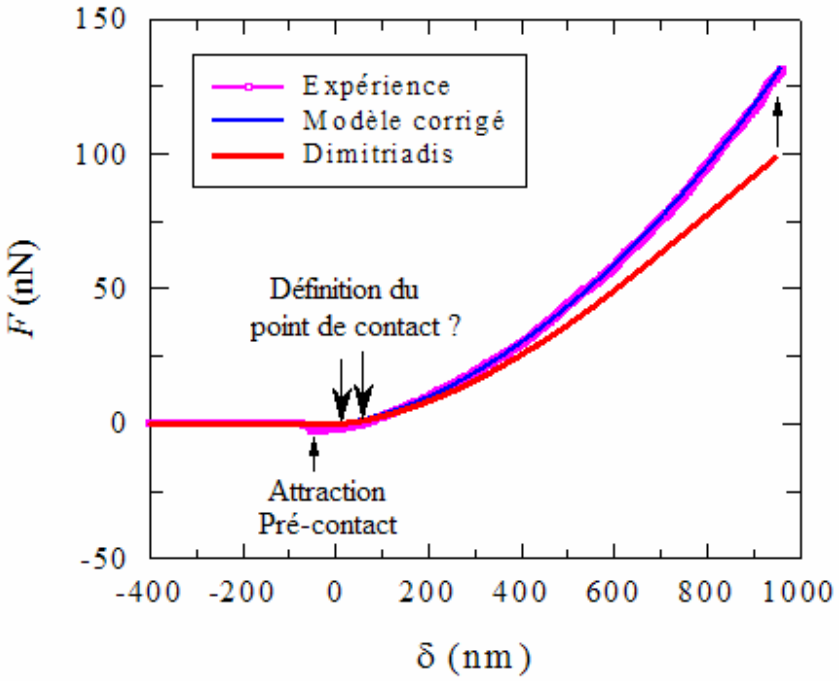


Figure 3.1.2-5 Correction de la courbe modélisée par la fonction *g*(δ).

Les résultats présentés dans la figure 3.1.2-4 montrent que le module de Young des films $(PLL/HA)_{24}$ et $(CHI/HA)_{24}$ dépend de la vitesse et présente un plateau aux faibles vitesses ($v_A \leq 500$ nm/s), alors que le module de Young de $(PLL/PSS)_{24}$ ne présente aucune dépendance avec la vitesse d'impact de la sonde. Les modules de Young calculés sont de l'ordre de 3, 13 et 53 kPa respectivement pour les films $(PLL/HA)_{24}$, $(CHI/HA)_{24}$ et $(PLL/PSS)_{24}$.

Caractéristiques	**Type de croissance**	Linéaire	Faiblement exponentielle	Exponentielle	
	Film	$(PSS/PAH)_{210}$-PSS	$(PLL/PSS)_{24}$	$(CHI/HA)_{24}$	$(PLL/HA)_{24}$
	Epaisseur (µm)	1,1	1,2	5	5
	Vitesse (nm/s)	10-10000	70-10000	$1\text{-}10^4$	$1\text{-}10^4$
	Nombre de mesures	113	83	116	96
Dimitriadis (kPa)	**Tous les points**	819 ± 315	55 ± 17	32 ± 20	9 ± 8
	Valeur plateau	--	--	17 ± 4	6 ± 3
Modèle corrigé (kPa)	**Tous les points**	535 ± 188	53 ± 15	30 ± 17	8 ± 6
	Valeur plateau	--	--	13 ± 6	3 ± 1

Tableau 3.1.2-1 Tableau récapitulatif des caractéristiques des films étudiés.

En conclusion, les films à croissance exponentielle sont beaucoup plus mous que le film à croissance linéaire étudié (tableau 3.1.2-1). On peut souligner que les films à forte croissance exponentielle sont également plus mous que les films caractérisés par une croissance faiblement exponentielle. Ceci est probablement dû au fait que les films dont la croissance est exponentielle, sont moins denses et donc plus chargé en molécules d'eau. Les films sont alors très épais et possèdent des propriétés viscoélastiques semblables à celles des hydrogels[131]. En comparaison, le film à croissance linéaire étudié présente un module de Young important (~ 1 MPa).

3.2 Effet de la réticulation sur l'élasticité

De nombreuses études ont été menées sur les films (PLL/HA) par l'Unité 595 de l'INSERM à Strasbourg, notamment sur l'amélioration de la stabilité des films et la modulation des propriétés d'adhésion cellulaire[23, 35, 56]. Ces études ont montré que les films (PLL/HA) pouvaient être rigidifiés chimiquement avec de l'EDC ou l'hydrochlorure de N, N-(3-diméthylaminopropyl)-N-carbodimide. La réaction de réticulation permet de créer des liaisons covalentes entre les groupements carboxyles du hyaluronane et les fonctions amines primaires de la poly(L-lysine). De plus, la réticulation favorise l'adhésion et la viabilité de cellules de type chondrosarcome sur de tels films. Des études similaires ont montré qu'il était ainsi possible de moduler l'adhésion cellulaire en contrôlant les propriétés mécaniques des films multicouches [118, 119]. D'autres travaux montré que le comportement de certaines cellules est fortement influencé par la dureté du substrat[112, 176-178].

3.2.1 Réticulation des films (PLL/HA)

Les propriétés mécaniques des films multicouches de polyélectrolytes natifs peuvent être modifiées par réticulation suivant différentes méthodes. Pavoor *et al*[37] ont montré que dans le cas des films hydratés construits à l'aide de poly hydrochlorure d'allylamine et de poly acide acrylique, noté (PAH/PAA), la réticulation pouvait se produire par chauffage à 150°C pendant six heures. Le film est ensuite réhydraté dans de l'eau à pH 7. Ces auteurs ont montré que le module de Young du film passe de 70 kPa avant réticulation à 410 kPa après réticulation. Cependant, il a été mis en évidence que les films secs sont peu sensibles au chauffage. Par contre, ces mêmes auteurs ont mis en évidence que le pH de construction des films influence l'élasticité de ceux-ci en milieu humide. L'effet du pH de construction a été récemment confirmé par Thompson *et al*.[119] qui ont prouvé que la diminution du pH augmente la rigidité d'un film (PAA/PAH). En outre, dans le cas de films (PAH/azobenzène), Mermut *et al*.[42] ont démontré que le module de Young pouvait varier de 150 kPa à plus de 6 MPa quand le pH des solutions de polyélectrolytes passait de 10,5 à 5. Une autre voie de réticulation consiste à utiliser un agent chimique afin d'établir des liaisons covalentes entre les polyélectrolytes. Ainsi, Kuijpers *et al*. ont utilisé l'EDC, c'est-à-dire l'hydrochlorure de N, N-(3-diméthylaminopropyl)-N-carbodimide et le N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS)

pour réticuler des gels de gélatine[179]. Richert *et al*. ont réticulé des films (PLL/HA) en utilisant également l'EDC et le sulfo-NHS[23]. Le durcissement observé[34, 56] a été attribué à la formation des liaisons covalentes en plus des liaisons ioniques existant dans le film (PLL/HA) natif. Les mêmes auteurs ont prouvé qu'un film réticulé de (PLL/HA) favorise l'adhérence de cellules de chondrosarcome et leur prolifération[35], alors que le film natif possède des propriétés anti-adhésives vis à vis de ces cellules[23]. Dans le cas des gels de polyacrylamide, les effets de la réticulation et l'augmentation de la température peuvent être combinés[131].

Les réactions impliquées dans la réticulation à l'aide de l'EDC et du sulfo-NHS sont schématisées ci-dessous :

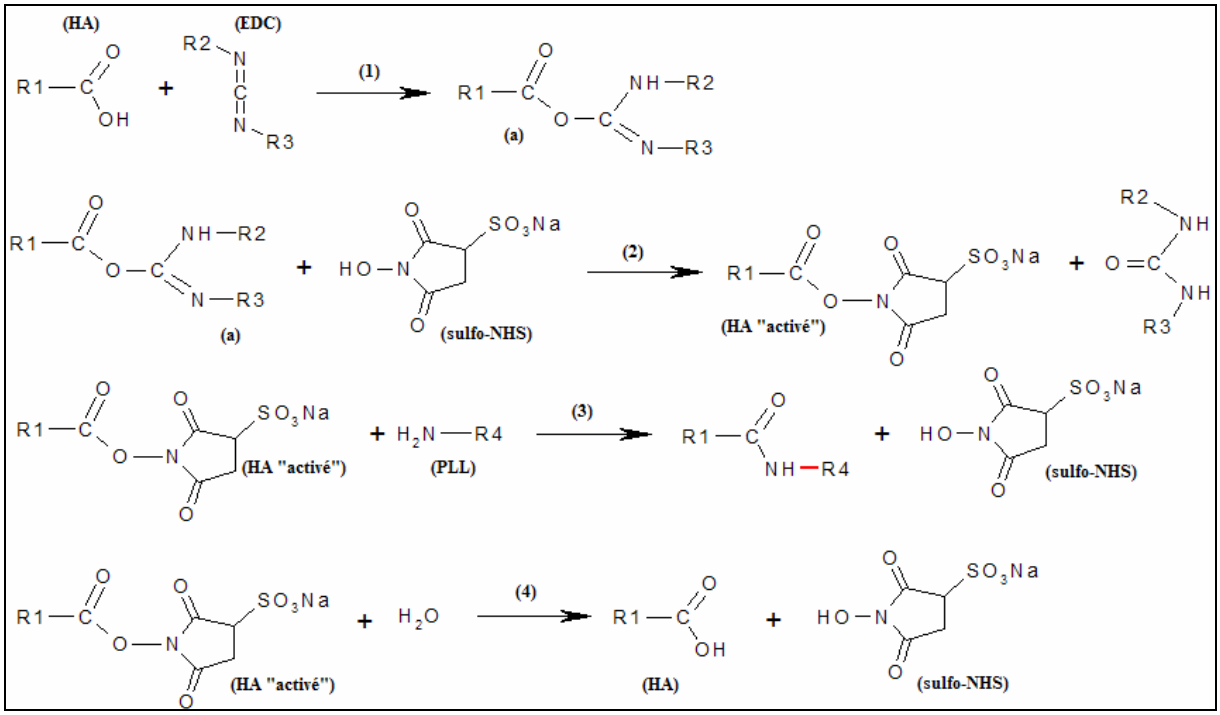


Figure 3.2.1-1 Réactions au cours de la réticulation chimique d'un film (PLL/HA) par l'EDC et le NHS.

La réticulation se déroule en quatre étapes :

- le carbodiimide se greffe sur la fonction acide carboxylique du HA par addition nucléophile (1) pour former le produit (a),
- le produit (a) réagit avec le catalyseur (sulfo-NHS) pour former le HA « activé » et libère un dérivé de l'urée (2),
- la PLL forme un pont amide avec le HA « activé » et régénère le catalyseur nucléophile (3),
- on observe aussi une réaction parasite minoritaire (4) où une partie du HA « activé » est hydrolysée ou désactivée par les molécules d'eau et le catalyseur régénéré.

La construction des films $(PLL/HA)_{24}$, ainsi que la réaction de réticulation ont pu être suivies à l'aide de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) en mode ATR. Ainsi, il a été possible d'observer la diminution des pics correspondant aux groupements carboxyles du hyaluronane et la formation de pics amides témoignant de l'efficacité de la réaction de réticulation. L'influence de la concentration en EDC est déterminée en faisant varier sa concentration initiale. Par intégration des pics caractéristiques de l'EDC, juste après injection de la solution de réticulation et à la fin de la réaction, après l'étape de rinçage, il est possible de déterminer la quantité d'EDC consommé pendant la réticulation (figure 3.2.1-2).

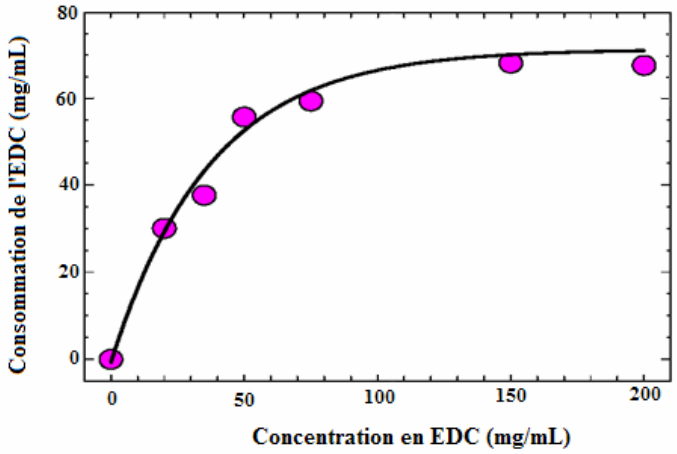


Figure 3.2.1-2 Consommation de l'EDC durant le processus de réticulation.

Nous avons ainsi pu démontrer la possibilité de faire varier le taux de réticulation, c'est-à-dire de faire varier le nombre de liaisons amides formées, en jouant sur la concentration initiale en carbodiimide.

3.2.2 Effet de la réticulation sur le système (PLL/HA)

Nous avons construit des films $(PLL/HA)_{24}$ d'épaisseur h = 5 µm à partir des solutions de PLL et de HA à 150 mM en NaCl dont le pH a été ajusté à 6-6,5. Ensuite, ces films ont été réticulés pour une gamme de mélanges réticulants contenant de 1 à 100 mg/mL d'EDC pour 11 mg/mL de sulfo-NHS, à pH 5, pendant 18 heures à température contrôlée T = 4°C. Après réticulation, les films sont rincés 3 fois avec une solution aqueuse de NaCl à 150 mM et pH compris entre 8 et 8,5 pendant 15 minutes. Tous les échantillons ont été conservés en milieu aqueux (solution de NaCl à 150 mM) à pH 8-8,5. En effet, la réticulation ne peut pas avoir

lieu en milieu basique. La réaction de réticulation a lieu en milieu acide (pH 5) à froid (4°C) pour limiter l'hydrolyse du HA « activé » et ralentir la dégradation du catalyseur.

Les mesures de forces ont été réalisées sur 14 échantillons, en utilisant le mode dynamique, comme dans l'étude présentée au paragraphe 3.1. Le traitement des données a été effectué avec le programme d'ordinateur décrit dans le chapitre 2.2.

Concentration en EDC (mg/mL)	E_D (kPa)	E_M (kPa)	Domaine de vitesses (nm/s)
0	6 ± 3	3 ± 1	10-10000
1	30 ± 4	23 ± 5	20-10000
2	44 ± 13	43 ± 12	10-10000
3,5	87 ± 6	86 ± 6	10-10000
5	135 ± 17	122 ± 15	20-10000
10	261 ± 13	196 ± 34	30-10000
20	263 ± 97	236 ± 75	20-10000
30	272 ± 79	220 ± 165	10-10000
40	509 ± 171	353 ± 100	30-10000
50	646 ± 369	330 ± 110	10-10000
60	856 ± 293	374 ± 82	70-10000
75	473 ± 177	348 ± 152	100-10000
80	808 ± 213	373 ± 98	30-10000
100	1390 ± 420	414 ± 112	70-10000

Tableau 3.2.2-1 Modules de Young calculés à partir des deux modélisations.
E_D correspond au module de Young déterminé par le modèle de Dimitriadis et E_M correspond à la valeur du module obtenue à l'aide du modèle corrigé.

Le programme utilisé est basé sur le modèle de Dimitriadis alors que le modèle que nous avons développé se base sur les mêmes équations mais fait intervenir la fonction $g(\delta)$. Les résultats issus du traitement des courbes de force montrent que le module de Young des films

$(PLL/HA)_{24}$ augmente progressivement avec le taux de réticulation. On note aussi que les valeurs calculées avec les deux modèles divergent à partir d'une concentration de 5 mg/mL en agent réticulant. Cette divergence s'accentue avec le taux de réticulation et pour une concentration de 100 mg/mL en EDC, on a $E_D \sim 3\ E_M$.

La comparaison entre les courbes théoriques et les courbes expérimentales correspondantes montre que la fonction $g(\delta)$ permet d'améliorer de manière significative la concordance entre les courbes de force théorique et expérimentale. Cela se traduit d'abord par une meilleure estimation du point de contact (diminution du décalage présent dans la modélisation de Dimitriadis) et une meilleure superposition de la courbe modélisée à la courbe expérimentale (figure 3.2.2-1).

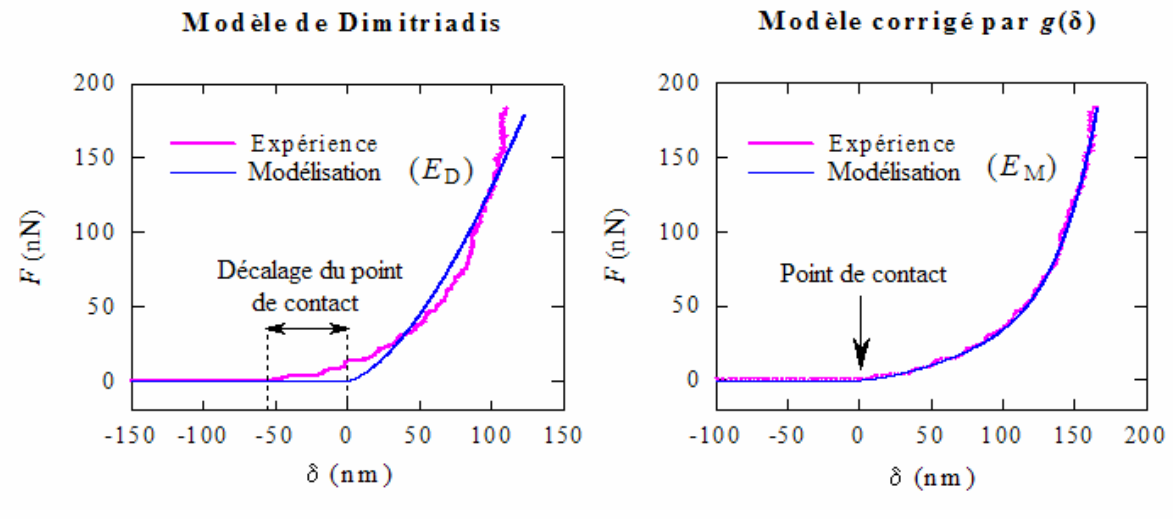


Figure 3.2.2-1 Amélioration de la modélisation par la fonction *g*(δ).
E_D correspond au module de Young calculé à l'aide du modèle de Dimitriadis et E_M correspond au module déterminé avec la correction introduite par la fonction g(δ).

Dans la plupart des cas, le traitement des courbes de force par le modèle de Dimitriadis tend à surestimer la valeur du module de Young, noté E_D, par rapport à celle du module de Young, noté E_M, déduit du modèle corrigé par la fonction g(δ). En effet, le décalage du point de contact identifié par le modèle par rapport au point de contact que l'on peut localiser sur la courbe expérimentale conduit à l'exagération de la pente de la courbe de force modélisée, donc à la surestimation du module de Young du film. Le défaut constaté quant à la position du point de contact disparaît grâce à l'introduction de la fonction correctrice qui, de plus, conduit à une très bonne reproduction de la courbe de force expérimentale sur tout le domaine d'indentation. On peut donc légitimement estimer que le module de Young extrait des mesures par le modèle corrigé est le plus réaliste.

Pour évaluer l'amélioration apportée par la fonction $g(\delta)$ à la modélisation, nous avons comparé la force de Dimitriadis (F_D) et la force théorique ($F_{Théo}$) issue de la correction induite par $g(\delta)$ à la force expérimentale F_{exp} mesurée. La force de Dimitriadis et la force théorique ont été représentées quand le module de Young prend la valeur E_M définie précédemment :

$$F_D = \frac{4E_M}{3(1-\nu^2)} R^{1/2} \delta^{3/2} f_D \qquad (3.2\text{-}1)$$

$$F_{Théo} = \frac{4E_M}{3(1-\nu^2)} R^{1/2} \delta^{3/2} f_D \, g(\delta) \qquad (3.2\text{-}2)$$

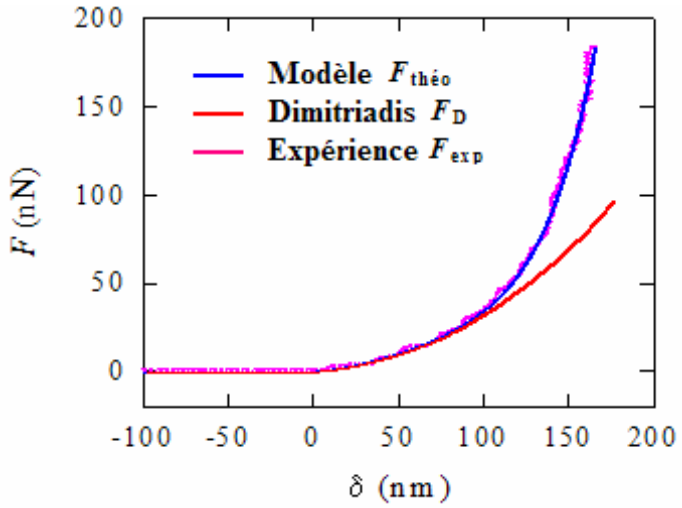


Figure 3.2.2-2 Domaine de validité des modèles utilisés.
La force expérimentale F_{exp} est représentée par la courbe rose, la force théorique $F_{théo}$ en bleu et la force de Dimitriadis F_D calculée avec E_D en rouge.

On constate que les deux courbes théoriques se superposent pour des déformations inférieures ou égales à 100 nm. Cependant, cette valeur varie d'un film à l'autre. Elle diminue quand le film se rigidifie, et passe ainsi de 100 nm pour les films les plus rigides à environ 200-400 nm pour les films les plus mous. Au-delà de 100 nm d'indentation, pour les films les plus rigides, la courbe théorique prévue par notre modèle est toujours confondue avec la courbe expérimentale, alors que la courbe prévue par le modèle de Dimitriadis s'en écarte progressivement. La modélisation des courbes expérimentales étant meilleure avec le deuxième modèle utilisé, nous avons pris le second comme référence pour l'estimation des modules de Young de nos échantillons. Le nombre de courbes de force mesurées pour chacun des échantillons étant très important, ces dernières sont consignées en annexe 1.

Les résultats présentés ci-dessous montrent que les films $(PLL/HA)_{24}$ perdent leur caractère visqueux avec le degré de réticulation (figure 3.2.2-3). Pour des concentrations en agent réticulant comprise entre 1 et 3,5 mg/mL, le module de Young des films réticulés croît

avec la vitesse, et présente, comme dans le cas d'un film natif, un plateau élastique aux basses vitesses. On remarque que la dépendance du module de Young avec la vitesse s'atténue progressivement avec l'augmentation du degré de réticulation. La caractéristique viscoélastique des films n'est plus détectable à partir d'une concentration de 3,5 mg/mL en agent réticulant ou en EDC (le sulfo-NHS étant le catalyseur de la réaction).

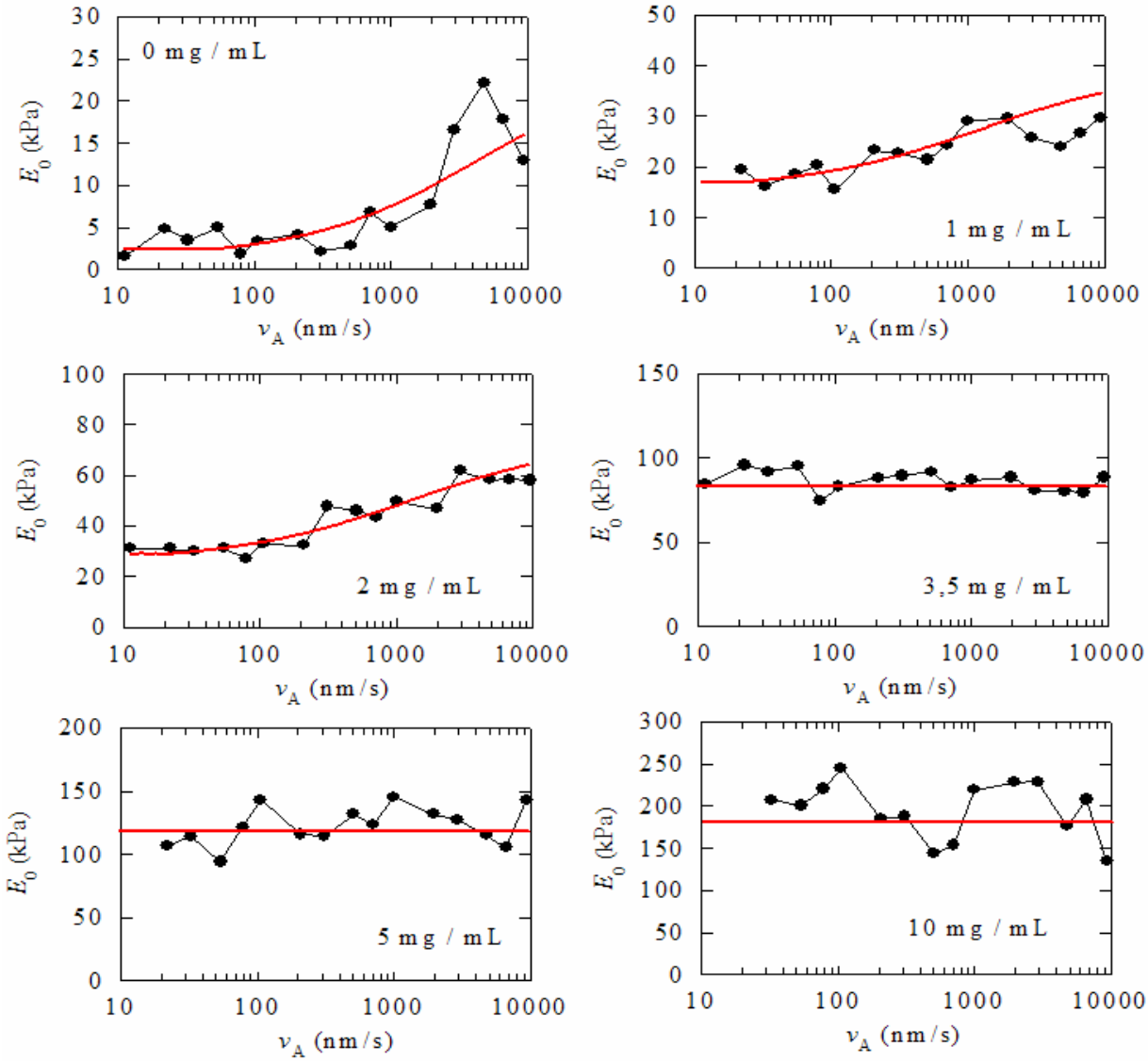


Figure 3.2.2-3 Evolution de l'élasticité en fonction de la vitesse d'approche pour six taux de réticulation.

On remarque également que le module de Young de nos échantillons tend vers un plateau quand le taux de réticulation devient important (figure 3.2.2-4). Ce plateau apparaît à partir d'une concentration d'environ 40 mg/mL en EDC, et est de l'ordre de 400 kPa. La présence de ce plateau suggère que la réticulation du film est totale et par conséquent que le film a atteint sa rigidité maximale.

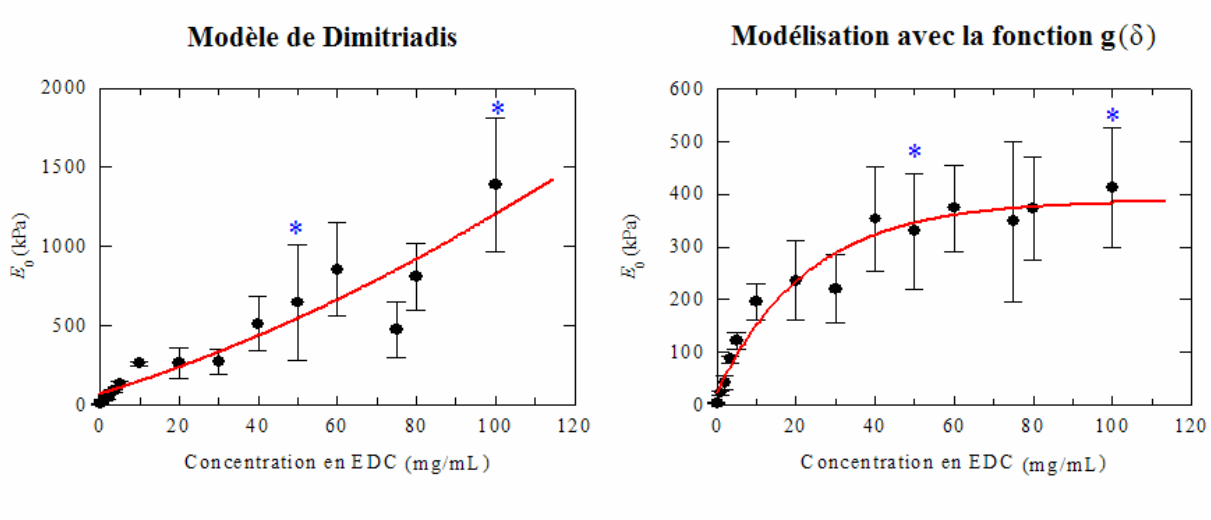


Figure 3.2.2-4 Variation de l'élasticité en fonction du taux de réticulation.
* *Correspond au module de Young moyenné sur toute la gamme de vitesse contrairement aux valeurs publiées*[34].

3.2.3 Applications biologiques

Récemment, l'influence de l'élasticité du substrat sur plusieurs propriétés biologiques des cellules telles que l'adhésion, la différentiation, la migration et la prolifération a été montré pour plusieurs types de cellules cultivées sur différent substrats[1, 6, 56, 119, 164, 178]. De plus, l'influence de la charge de la surface, de la composition chimique et de la topographie du substrat a été largement étudiée[67, 180-185] et ces facteurs ont été identifiés comme étant responsables de modifications notables dans les processus cellulaires (adhésion, prolifération, etc). Dans le domaine des biomatériaux, le contrôle des propriétés mécaniques permet de modifier le comportement des cellules, notamment l'adhésion, la colonisation et la migration. Les mêmes phénomènes ont été observés dans le cas de cultures de myotubes sur des gels de polyacrylamide (PAAM) d'élasticité modulable[7]. Ces études ont d'abord concerné des gels « modèles » à trois dimensions de polyacrylamide et de polydiméthyle siloxane (PDMS), qui peuvent être facilement préparés et dont l'élasticité peut être ajustée en changeant la concentration en agent réticulant[2, 4]. Cependant, de tels substrats présentent l'inconvénient de ne pas être biocompatibles, et sont donc inadaptés à de futures applications *in vivo*. Par ailleurs, des gels d'alginate (un biopolymère) sont couramment utilisés dans des applications d'ingénierie tissulaire, et ont été également employés pour vérifier l'influence de l'élasticité du gel sur l'adhésion cellulaire[186, 187] pour des chondrocytes et des myoblastes. De plus, il convient de noter que de telles observations de l'effet de la dureté du substrat sur l'adhésion

cellulaire ont été toujours vérifiées pour des gels relativement « épais » (c'est-à-dire des gels d'au moins 70 µm d'épaisseur). Par contre, le comportement des cellules a été peu étudié pour des films minces (épaisseur allant de quelques nanomètres à quelques micromètres), en raison de la difficulté de préparer des gels minces d'épaisseur et de duretés[119] contrôlées dans les applications biologiques.

De ce fait, les films multicouches de polyélectrolytes dont l'épaisseur est facilement modulable sont de plus en plus utilisés comme alternative aux gels. Ils permettent d'étudier les modifications des processus cellulaires[188-190] liées aux différentes propriétés physicochimiques des films (dureté, composition chimique, charge de la couche externe). De plus, ces films peuvent également être fonctionnalisés. Par exemple, l'hormone α-MSH (Melanocyte Stimulating Hormone) peut être greffée à un polyélectrolyte et être enfouie dans un film afin d'induire la production d'α-mélanocortine par les mélanomes[191]. Par ailleurs, l'hydratation et le taux de gonflement des films modifient l'adhésion des cellules[96]. De même l'hydrophobicité et l'hydrophilie[192] des films affectent l'adhésion et peuvent être contrôlées en choisissant soigneusement les polymères utilisés lors de la construction des films. La greffe de peptides adhésifs tels que la RGD (-Arg-Glyc-Asp-) est une autre voie pour modifier les propriétés adhésives des films [193, 194]. Plus récemment, plusieurs études ont montré que les propriétés mécaniques des films pouvaient avoir une grande influence sur l'adhésion de plusieurs types de cellules [23, 119, 195]. La dureté des films peut être modulée en incorporant des nanoparticules ou des colloïdes dans le films[195] ou en changeant le pH pendant la construction des films ou en modifiant la nature de la paire polycation/polyanion[119] ou bien en utilisant un agent chimique de réticulation[23].

Il a été montré que les chondrocytes primaires peuvent déformer les films de polyélectrolytes natifs, et peuvent s'ancrer durablement à leur surface lors de la prolifération quand les films sont réticulés [196]. Cet effet, souvent appelé « effet du substrat », a jusqu'à présent été vérifié pour le PDMS, les gels de polyacrylamide et les gels d'alginate, mais peu étudié pour d'autres types de matériaux tels que les films minces de polymères[56, 197], notamment les films (PLL/HA). En outre, il serait intéressant de préparer des films d'élasticité modulable qui couvrent une large gamme de dureté afin de tester et déterminer les limites de la sensibilité des cellules aux propriétés mécaniques du substrat sur lequel elles ont été ensemencées.

Contrairement aux gels de polyacrylamide, les films multicouches de polyélectrolytes ont l'avantage de faciliter l'observation des effets mécaniques dans des conditions *in vivo* de part leur faible épaisseur et de leur biocompatibilité (facilement intégrable dans le milieu

biologique). Ils permettent d'envisager leur future application dans divers domaines comme l'implantologie. Le travail présenté ici vise à élaborer des films (PLL/HA) d'élasticité réglable et à vérifier l'impact de la dureté sur l'adhésion des cellules cultivées dessus. Pour moduler l'élasticité de ces films, nous avons employé le protocole de réticulation chimique basé sur la chimie des carbodiimides en combinaison avec l'hydroxy-sulfosuccinimide (sulfo-NHS) décrit dans le sous-chapitre 3.2.1.

Des cellules de type chondrocytes et chondrosarcomes ont été cultivées sur ces films réticulés par un mélane (EDC/NHS) à différentes concentrations. Les tests de nanoindentation opérés sur les différents films $(PLL/HA)_{24}$ réticulés ont montré que le module de Young est multiplié par 100 quand le film est totalement réticulé (sous-chapitre 3.2.2). Les chondrosarcomes humains de type HCS 2/8, cultivés sur ces films dont la rigidité est contrôlée par réticulation, présentent une adhésion cellulaire et une prolifération fortement influencées par les propriétés mécaniques de la surface. Le but de l'étude suivante consiste à suivre l'évolution de la viabilité et de l'étalement cellulaire en fonction de la rigidité des différents films, afin d'établir une corrélation entre les propriétés mécaniques des substrats et l'activité cellulaire. Ce travail a été mené en collaboration avec le Docteur Aurore Schneider et est largement détaillé dans sa thèse[198].

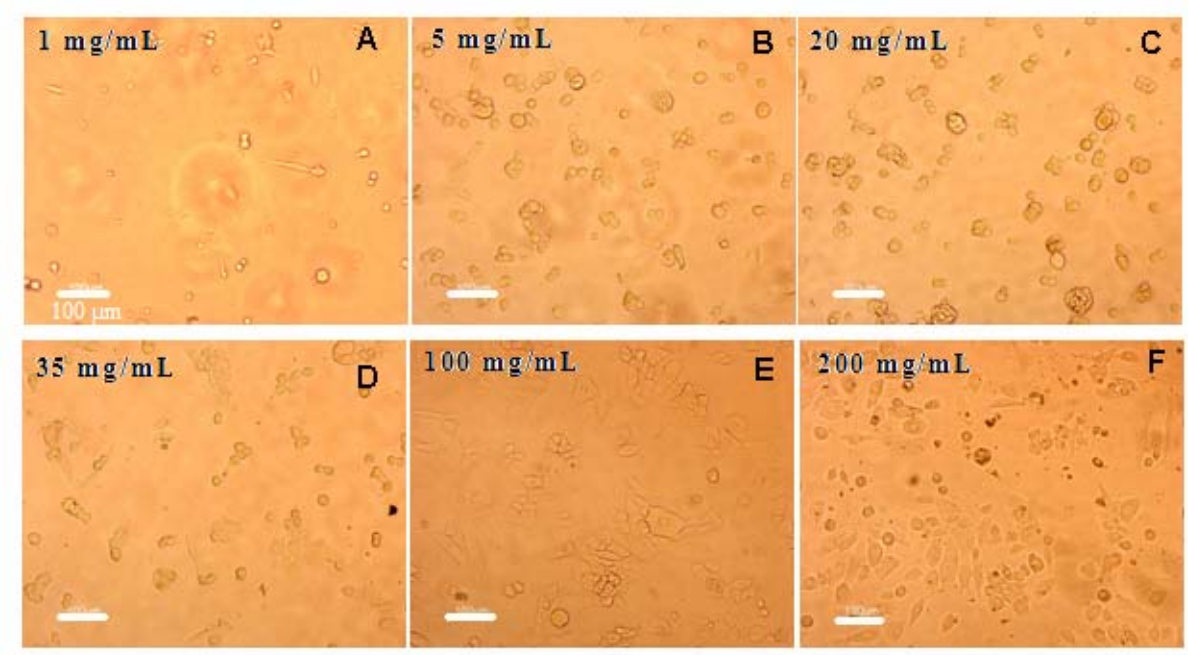


Figure 3.2.3-1 Observation par microscopie photonique de l'étalement des cellules.

La figure 3.2.3-1 montre l'étalement des cellules de type HCS 2/8 sur 6 films $(PLL/HA)_2$ réticulés (concentration en EDC variant de 1 à 200 mg/mL). Les observations par microscopie photonique attestent d'un changement de forme des cellules en fonction du taux

de réticulation. En effet, les cellules sont petites, rondes et peu nombreuses sur les substrats faiblement réticulés (A, B et C) alors que celles-ci sont très nombreuses et très étalées sur les substrats fortement réticulés (D, E et F).

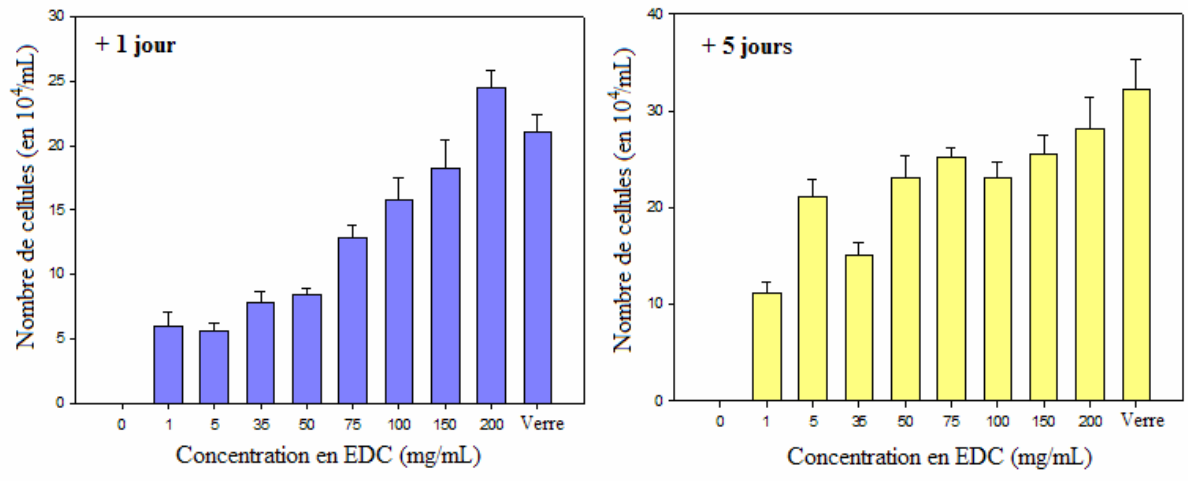


Figure 3.2.3-2 Viabilité cellulaire des HCS 2/8 à 1 et 5 jours.

Des mesures de viabilité des cellules pour les différents taux de réticulation (figure 3.2.3-2) ont ensuite été effectuées. Les tests de viabilité cellulaire montrent que le nombre de cellules cultivées sur les substrats est multiplié par 5 quand la concentration en EDC de la solution de réticulation passe de 1 mg/mL à 200 mg/mL. Cette augmentation observée après un jour de culture est encore présente après 5 jours.

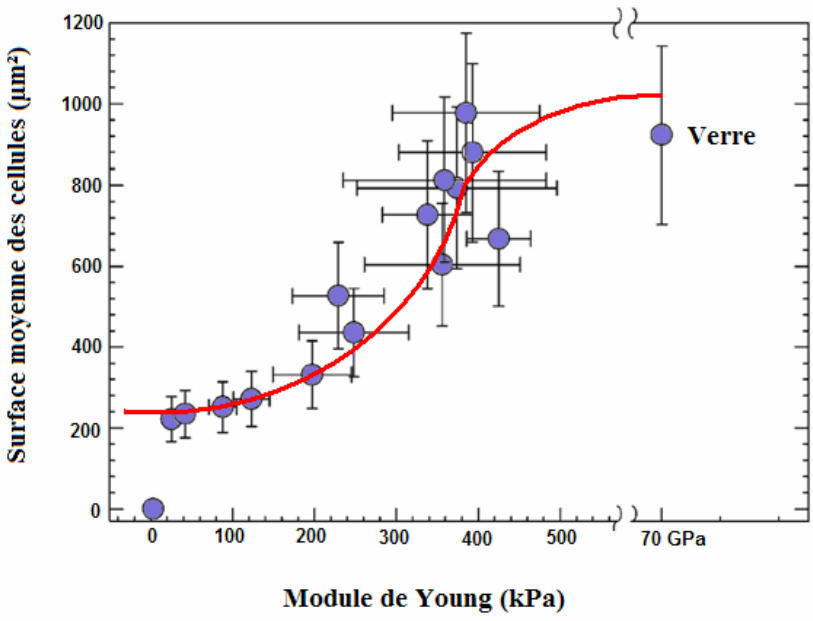


Figure 3.2.3-3 Corrélation entre le module de Young et l'étalement des cellules HCS 2/8.

Toutes ces mesures indiquent une forte dépendance entre le comportement des HCS 2/8 et les propriétés mécaniques du substrat. L'étude de l'étalement des cellules en fonction du module de Young (figure 3.2.3-3) et de leur viabilité sur les différents substrats illustre la corrélation entre la rigidité du substrat et le comportement des cellules HCS 2/8 (étalement et viabilité). Cette corrélation montre que les chondrosarcomes humains de type HCS 2/8 ont une grande affinité pour les substrats rigides. De plus, ces cellules présentent le même comportement en terme d'étalement sur un substrat comme le verre (E_0 ~ 70 GPa) que sur un film $(PLL/HA)_{24}$ fortement réticulé (E_0 ~ 400 kPa)[35].

3.3 Conclusion

3.3.1 Contrôle des propriétés mécaniques

De récents travaux ont mis en évidence une dépendance entre le module de Young et le degré de réticulation des matériaux, notamment dans le cas des gels de polyacrylamide[199, 200], des polymères[201, 202], et même dans le cas de surfaces chimiquement modifiées[177]. Nous nous sommes basés sur des travaux du Docteur Ludovic Richert traitant de l'effet de la réticulation sur l'amélioration de l'adhésion et de la viabilité cellulaire[56], afin de caractériser les films de polyélectrolytes et de contrôler leurs propriétés mécaniques.

Le contrôle de la dureté (module de Young) des films $(PLL/HA)_{24}$ a été réalisé par réticulation chimique. Celle-ci se fait par adjonction d'un agent de couplage, un carbodiimide, et d'un catalyseur, un sulfosuccinimide. La réaction de couplage permet de créer des liaisons covalentes entre les groupements carboxyles du hyaluronane et les fonctions amines primaires de la poly-(L-lysine). Il a été démontré à l'aide de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) qu'il était possible de faire varier le taux de réticulation, via le nombre de liaisons amides formées, en jouant sur la concentration en carbodiimide de la solution de réticulation[23, 35].

Nous avons employé la technique de nanoindentation pour mettre en évidence l'influence du taux de réticulation des films $(PLL/HA)_{24}$ sur le module de Young apparent de ceux-ci[34]. Nous avons montré que la dureté des films augmentait très rapidement avec la concentration en EDC pour atteindre une valeur maximale de l'ordre de 400 kPa quand le film était totalement réticulé.

3.3.2 Modulation de l'adhésion cellulaire

L'effet de la rigidité du substrat sur les chondrosarcomes humains de type HCS 2/8 a ensuite été étudié en déposant des cellules sur des films $(PLL/HA)_{24}$ réticulés par l'EDC à différentes concentrations. Nous avons observé que le nombre de cellules adhérentes sur la surface de ces films augmentait en même temps que la rigidité des films. Par ailleurs, la corrélation entre le module de Young et l'étalement des cellules (figure 3.2.2-3) indique que lorsque la rigidité du film augmente, l'étalement cellulaire augmente aussi, jusqu'à atteindre

un plateau où les cellules ont un comportement identique à celui qu'elles adoptent sur le verre.

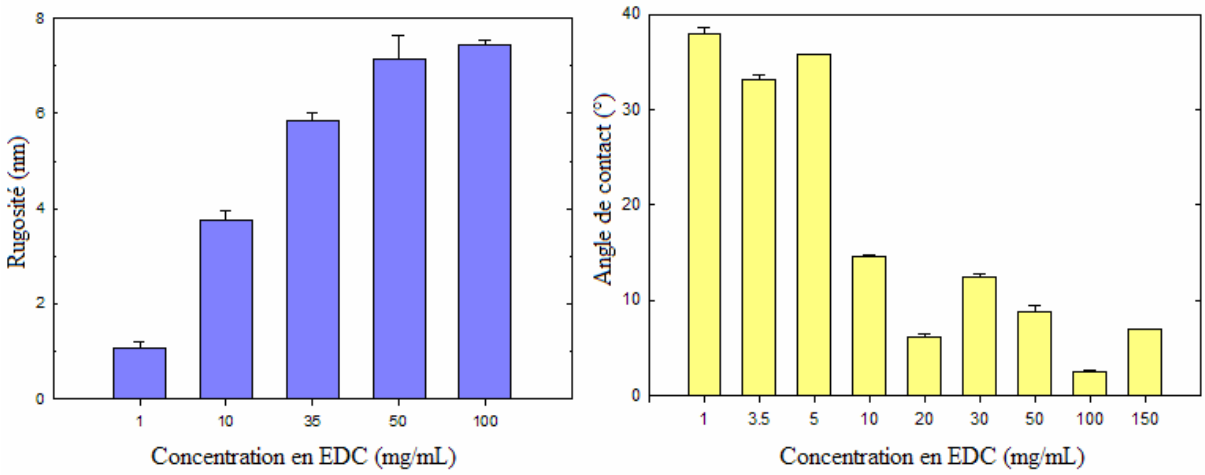


Figure 3.3.2-1 Evolution de la rugosité et de l'angle de contact des films réticulés en fonction de la concentration en EDC de la solution de réticulation.

L'intérêt de cette étude a donc été de montrer que le module de Young du substrat peut être contrôlé dans le cas de films multicouches de polyélectrolytes et qu'il présente une influence notable sur l'étalement de cellules biologiques qui y sont déposées. Il faudrait toutefois se garder d'en tirer la conclusion que la rigidité de la surface est le seul paramètre caractéristique de cette surface ayant une influence sur l'adhésion et la viabilité cellulaire. Il faut en particulier mentionner parmi les caractéristiques de surface susceptibles d'être importantes l'augmentation de la rugosité et de la mouillabilité (diminution de l'angle de contact) des films avec la concentration en EDC (figure 3.3.2-1).

Chapitre 4 : Caractérisation de films bi-domaines

Caractérisation de films bi-domaines

4.1 Etude de l'architecture $(PLL/HA)_{24}$–$(PSS/PAH)_n$–PSS 144

4.1.1 Construction du système et étude par spectroscopie infrarouge 144

4.1.2 Détermination du module de Young 146

4.1.3 Evolution de l'élasticité en fonction du nombre de couches déposé 146

4.1.4 Applications biologiques 150

4.2 Etude de la construction $(PLL/HA)_{24}$–$(PLL/PGA^{sucre})_6$ 155

4.2.1 Construction du système 155

4.2.2 Evolution du module de Young en fonction de la nature du sucre 156

4.2.3 Applications biologiques 158

4.3 Conclusion 163

4.3.1 Propriétés physico-chimiques et mécaniques 163

4.3.2 Contrôle de la réponse cellulaire 164

La diffusion de petites molécules (solvant, molécules organiques, colloïdes…) dans l'ensemble d'un film de polyélectrolytes permet de modifier les propriétés mécaniques et physicochimiques des films[18, 32, 203-205]. Néanmoins, dans certains cas, la diffusion de certaines molécules peut être néfaste pour les drogues ou les molécules actives incluses dans les films[206]. Par exemple, la diffusion de l'urée dans des films multicouches contenant de la myoglobine provoque la dénaturation de cette protéine[206].

Ainsi, différents procédés ont été développés pour améliorer la stabilité de la structure interne des multicouches[9, 207-213]. Les films traités par ces procédés se sont avérés plus résistants aux contraintes environnementales [78, 83, 214-219] (pH, température, force ionique…) tout en préservant leur perméabilité aux petites molécules. Par exemple, la réticulation thermique ou chimique permet une rigidification facile et rapide des films. Cependant, elle présente des inconvénients tels que la désactivation ou, dans certains cas, l'immobilisation des molécules incluses. De plus, la réticulation chimique ou thermique n'est pas applicable à tous les systèmes (polycation/polyanion). Une alternative à la réticulation consiste à adsorber une couche hydrophobe à la surface des films multicouches, permettant ainsi une réduction de leur sensibilité à l'eau et à d'autres molécules polaires. En outre, la capacité des films à éviter la perméation de petites molécules hydrophiles peut être augmentée. Par analogie aux membranes biologiques, Kügler *et al.* ont déposé des bicouches uniformes de lipides sur des multicouches de polyélectrolytes[220-222] et ont montré que ce dépôt permettait d'éviter efficacement la diffusion de petites molécules dans le film. Cependant, les couches lipidiques sont connues pour être instables sous contrainte mécanique et au séchage. Une méthode similaire consiste à adsorber à la surface d'un film multicouche un couple de polyélectrolytes capable de former une couche-barrière imperméable à certaines molécules.

Dans ce chapitre, nous avons utilisé la méthode citée précédemment afin de modifier la surface de films (PLL/HA) connus pour leur faible module de Young[34]. Nous avons déposé plusieurs bicouches de (poly-4-styrène sulfonate/poly hydrochlorure d'allylamine) noté (PSS/PAH) sur des films $(PLL/HA)_{24}$. Ces films, dits bi-domaines, ont été étudiés par microscopie optique confocale, spectroscopie infrarouge et par microscope à force atomique. Les observations par microscopie photonique nous ont permis de vérifier si les films étaient bien constitués de deux strates et si la seconde strate est imperméable. La spectroscopie infrarouge a été employée pour étudier et quantifier les possibles phénomènes d'échange et de diffusion. De plus, nous avons eu recours à l'AFM en mode force pour caractériser les

propriétés mécaniques de ces films. Ensuite, nous avons étendu notre étude à d'autres couples de polyélectrolytes pour former la seconde strate de l'édifice. Enfin, nous présenterons différentes possibilités d'application de ces systèmes à la biologie.

4.1 Etude de l'architecture $(PLL/HA)_{24}$–$(PSS/PAH)_n$–PSS

4.1.1 Construction du système et étude par spectroscopie infrarouge

Les films $(PLL/HA)_{24}$ – $(PSS/PAH)_n$ – PSS ont été construits par trempage dans une solution saline (150 mM en NaCl) tamponée par du TRIS 20 mM à pH 7,4. Les polyélectrolytes ont été dissous dans la solution tampon à raison de 1 mg/mL. Les temps de trempage sont de 10 minutes pour les rinçages, 10 minutes pour l'adsorption de PLL et HA et enfin 4 minutes pour PSS et PAH.

Figure 4.1.1-1 Observation par microscopie confocale des films bi-domaines.
La première strate $(PLL/HA)_{24}$ est marquée en avant dernière couche par PLL^{Fitc} et la seconde strate $(PSS/PAH)_i$ est marquée par PSS^{Rho}.

Les observations par microscopie confocale (figure 4.1.1-1) montrent que l'épaisseur des films est de l'ordre de 5 µm. De plus, elles mettent en évidence l'existence de deux domaines au sein du film. La première strate est fine (marquage à la rhodamine) et correspond l'accumulation de PSS et certainement à l'ensemble (PSS/PAH), alors que la seconde strate est très épaisse (marquage à la fluorescéine) et correspond au bloc $(PLL/HA)_{24}$. Ceci suggère que le film (PSS/PAH) déposé au-dessus du film (PLL/HA) constitue une véritable barrière comme cela a été démontré lors de récents travaux sur les réservoirs[15, 223, 224]. On remarque aussi que la seconde strate est moins homogène que la première, comme en témoignent les petites zones sombres au niveau de cette strate. Ces zones correspondent à des inhomogénéités de la structure et peuvent constituer des trous dans la seconde strate.

Nous avons ensuite observé par spectroscopie infrarouge l'évolution du spectre du film $(PLL/HA)_{24}$ – $(PSS/PAH)_n$ – PSS (figure 4.1.1-2) construit *in situ* comme nous l'avons expliqué dans le chapitre 2. Le film est construit dans les mêmes conditions que les films construits par trempage (durées d'adsorptions et de rinçages). Les solutions ont été préparées dans du D_2O et tamponnée avec du TRIS 20 mM à pH 7,4.

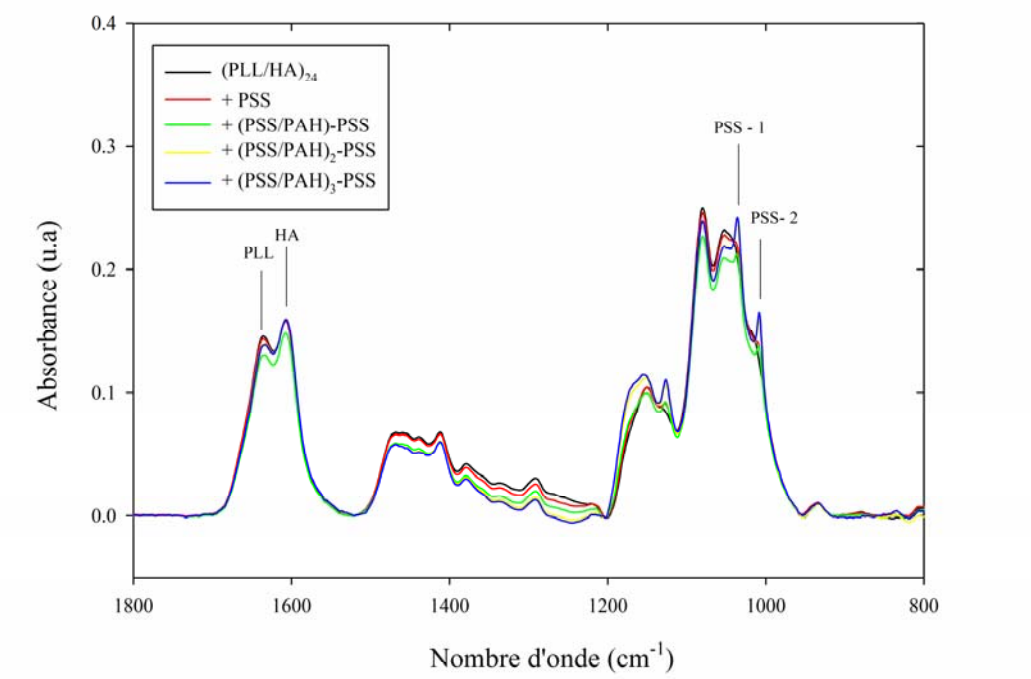


Figure 4.1.1-2 Spectre infrarouge de $(PLL/HA)_{24}$ - $(PSS/PAH)_n$- PSS.

Les spectres infrarouges du film $(PLL/HA)_{24}$ – $(PSS/PAH)_n$ – PSS montrent que dès l'ajout de la première couche de PSS, un épaulement apparaît à 1005 et 1035 cm^{-1}. Cet épaulement correspond aux bandes d'absorption caractéristique du PSS. De plus, cet épaulement augmente avec *n*, le nombre de paires de couches déposées.

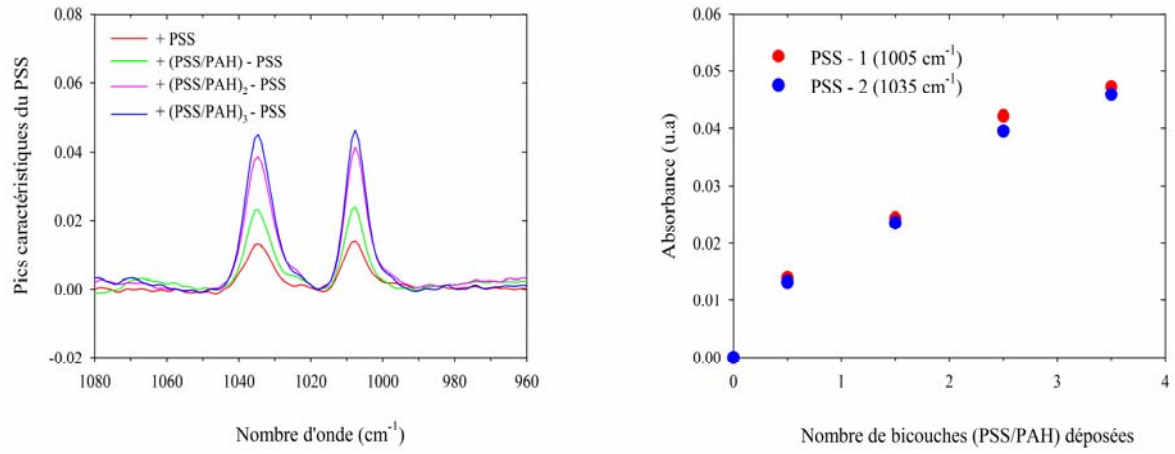


Figure 4.1.1-3 Proportion de PSS dans le film.
Les spectres représentés sur la figure de gauche ont été obtenus après soustraction du spectre infrarouge de $(PLL/HA)_{24}$ des spectres obtenus pour $(PLL/HA)_{24}$ – $(PSS/PAH)_n$ – PSS. La figure de droite représente l'absorbance des 2 pics après décompositions des spectres.

Parallèlement, on observe une légère diminution des bandes d'absorption caractéristiques du HA et de la PLL. Ceci suggère une baisse de la concentration du HA et de la PLL dans le film sur une épaisseur proche de la longueur de l'onde évanescente d_p définie dans le sous-chapitre

2.3.2. En outre, le film se trouve chargé en PSS comme l'illustre la figure 4.1.1-3. Cependant, cette technique ne permet d'évaluer quantitativement que les polyélectrolytes présents dans le domaine couvrant la longueur de l'onde évanescente à partir de la surface du cristal de ZnSe. Les mesures attestent que la présence d'une forte accumulation de PSS en surface du film forme une barrière, imperméable à certaines molécules[15, 225], mais celles ci n'excluent pas la possibilité qu'une petite fraction de PSS puisse diffuser dans le film.

4.1.2 Détermination du module de Young

Le module de Young des films bi-domaines $(PLL/HA)_{24}$ – $(PSS/PAH)_n$ – PSS a été déterminé par la technique de nanoindentation (cf. chapitre 3) pour $0 \leq n \leq 24$. En outre, nous avons utilisé la modélisation de Dimitriadis modifiée par la fonction empirique $g(\delta)$ définie dans le chapitre 3.

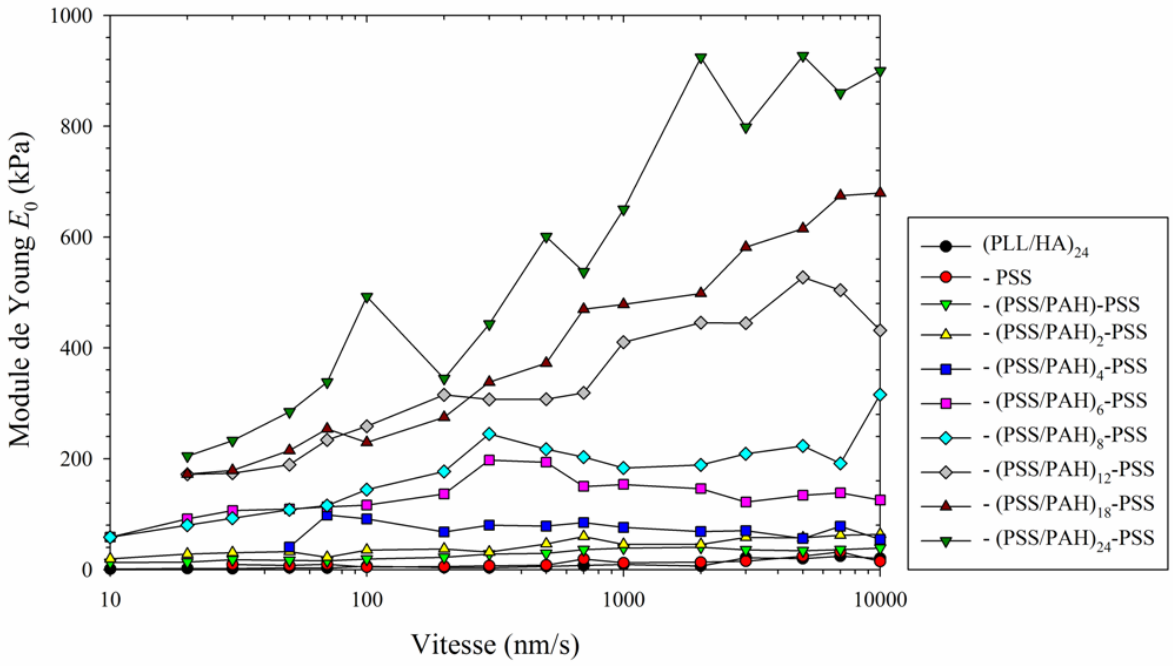


Figure 4.1.2-1 Variations du module de Young des films bi-domaines.

Le traitement des courbes de force (AFM) montre que le module de Young des films (figure 4.1.2-1 et annexe 2) augmente avec la vitesse d'impact de la sonde. Ces résultats mettent en évidence le caractère viscoélastique de ces films. En effet, quand la vitesse d'approche passe de 10 à 10000 nm/s, le module de Young est multiplié par 4 dans le cas où $n = 24$ et par 2 dans le cas où $n = 8$. De plus, on observe une augmentation des modules de Young en fonction du nombre de dépôts de (PSS/PAH) pour une vitesse d'approche donnée.

4.1.3 Evolution de l'élasticité en fonction du nombre de couches déposées

On a mis en évidence que l'élasticité de ces films dépend du nombre de dépôts de (PSS/PAH). Ainsi, le module de Young moyenné sur l'ensemble des vitesses passe de quelques kPa pour $n = 0$ à quelques centaines de kPa pour $n = 24$ (figure 4.1.3-1). Cette valeur est voisine de celle du module de Young d'un film $(PSS/PAH)_{210}$–PSS que nous avons estimée à 500-800 kPa (sous-chapitre 3.1). Les valeurs moyennées des modules des films bi-domaines sont présentées dans l'annexe 2.

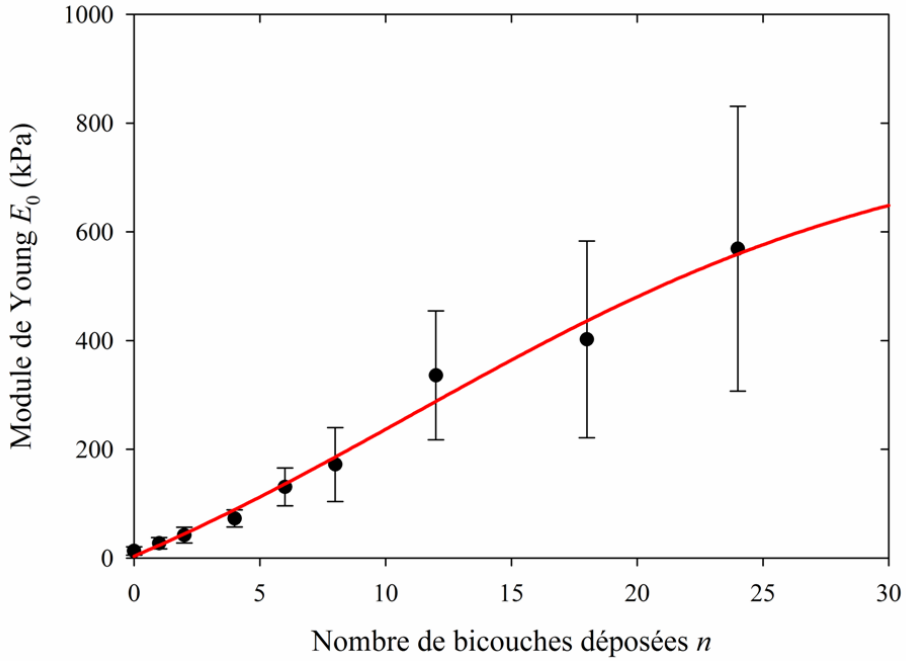


Figure 4.1.3-1 Evolution du module de Young en fonction du nombre de dépôts.

Les résultats obtenus suggèrent qu'il est possible d'augmenter le module de Young d'un film $(PLL/HA)_{24}$, au-delà de la valeur maximale obtenue par réticulation chimique (~ 400 kPa), par le simple dépôt alterné de PSS et PAH sur l'assise $(PLL/HA)_{24}$. Cette observation pose la question de l'origine du durcissement.

La seconde strate du film bi-domaine, telle qu'elle est visible au microscope confocal, est très mince (au plus une centaine de nanomètres) par rapport à la strate basale (environ 5 µm). Une pellicule rigide posée sur un film épais et mou peut-elle engendrer la forte augmentation du module de Young de l'ensemble par rapport à l'assise basale seule? La réponse à cette interrogation réclame une analyse attentive d'un système que l'on suppose ici formé de trois éléments bien distincts superposés: la lame de verre infiniment rigide, la base molle et la strate dure qui entre en contact avec la sonde. Le problème de l'élasticité résultante

d'un système formé de trois strates supperposées a été traité par Chen[142] et Chen et Engel[143]. Nous n'entrerons pas ici dans les détails de ce formalisme, mais donnerons seulement un exemple pouvant éclairer la question qui nous occupe.

Nous avons élaboré un logiciel permettant de déterminer la force à appliquer à une sonde sphérique pour produire une certaine indentation, compte tenu des modules de Young des trois parties du système et de leurs coefficients de Poisson, ainsi que des épaisseurs de la strate supérieure et de la strate intermédiaire ; la strate inférieure étant supposée infiniment épaisse. Nous avons ainsi traité le système où la strate supérieure est caractérisée par un module de Young E_1 = 1000 kPa (ordre de grandeur pour un film (PSS/PAH)) et une épaisseur e_1 = 100 nm, la strate intermédiaire par un module de Young E_2 = 5 kPa (ordre de grandeur pour un film (PLL/HA)) et une épaisseur e_2 = 5000 nm, et la strate inférieure par son module de Young E_3 = 70 GPa (soit pratiquement l'infini par rapport aux deux autres modules). Les trois coefficients de Poisson ont été fixés à 0,5 (figure 4.1.3-2).

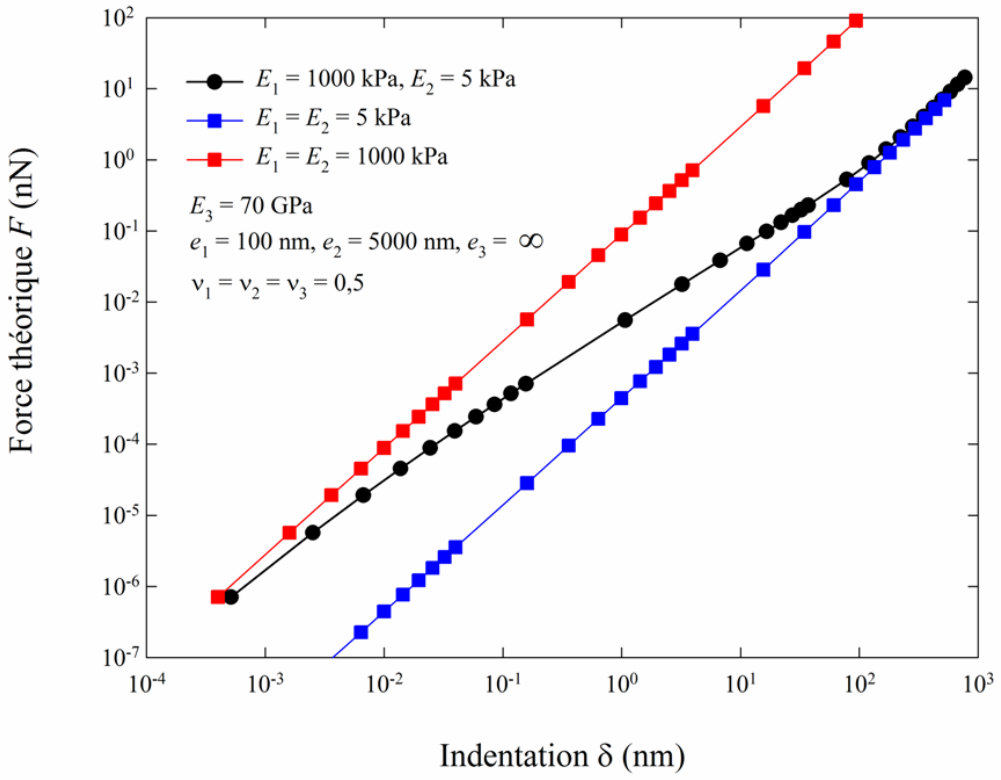


Figure 4.1.3-2 Modélisation de Chen & Engel pour un système élastique à trois couches.

Sur cette figure nous avons également représenté la force correspondant à $E_1 = E_2$ = 5 kPa et $E_1 = E_2$ = 1000 kPa. D'après ces calculs, il est très clair que, sauf aux indentations très petites (inférieures à quelques dizaines de nanomètres), la relation force-indentation est pratiquement indiscernable de celle qu'on obtiendrait si le film déposé sur la lame de verre

était un film (PLL/HA) natif seul (base molle). Il découle de ce constat que le dépôt de PSS et PAH sur la strate basale $(PLL/HA)_{24}$ ne peut pas provoquer le durcissement observé expérimentalement s'il ne conduisait qu'à la formation d'une strate fine, même dure, à la superficie de l'assise molle. Ce raisonnement nous amène donc à formuler l'hypothèse que le PSS et/ou le PAH doit (doivent) diffuser dans le film (PLL/HA) pour en modifier substantiellement les propriétés mécaniques. Les constructions suivies par spectroscopie infrarouge, décrites ci-dessus, étayent cette idée dans la mesure où elles montrent la pénétration de PSS dans l'assise $(PLL/HA)_{24}$, du moins au cours des quatre premiers dépôts de ce polyélectrolyte. Pour autant, nous sommes loin d'avoir complètement élucidé le phénomène. Il conviendra en particulier de reprendre les expériences au spectromètre infrarouge pour savoir si la pénétration de PSS se poursuit tout au long de la construction (c'est-à-dire jusqu'au dépôt de la vingt-quatrième paire (PSS/PAH)).

4.1.4 Applications biologiques

Depuis les années 1980, de nombreux travaux ont mis en avant la nécessité de concevoir des surfaces de biomatériaux ayant des propriétés spécifiques[226], en particulier, des matériaux permettant la délivrance de médicaments, le contrôle de l'adsorption de protéines et la modification des propriétés d'adhésion cellulaire[227, 228]. C'est dans ce but que des études ont été menées pour modifier des surfaces avec des peptides ou des protéines, notamment par la greffage directe sur le substrat ou par adsorption simple sur le substrat, ce qui permet un contrôle de la densité et/ou de l'orientation spatiale des molécules[229, 230]. Plus récemment, la possibilité de recouvrir un substrat avec des matrices de polymères, dans lesquelles des facteurs biologiques ont été inclus, a été mise en évidence[231, 232]. L'objectif final d'une telle approche est de contrôler le taux et la sélectivité de l'adhésion cellulaire. Les réactions cellulaires et les processus tels que l'inflammation et la régénération du tissu biologique ont été contrôlés en utilisant ces méthodes[20, 233].

Pour recouvrir des surfaces de matrices polymères de façon contrôlée, une approche basée sur le dépôt couche-par-couche de polyélectrolytes a été développée il y a une quinzaine d'années. Cette méthode est apparue comme une stratégie prometteuse, simple et peu coûteuse pour modifier les surfaces[8, 9, 11, 213, 234, 235]. Il est ainsi possible de conférer aux films multicouches des propriétés particulières pour cibler des activités biologiques précises, par inclusion de peptides, de protéines, d'hormones, de facteurs de croissance ou de drogues dans la structure des films, sans affecter l'activité de ces molécules[20, 30, 191, 236-238]. Ainsi, grâce à cette méthode, il a été possible d'élaborer des films présentant des propriétés anti-inflammatoires[188, 233] et anti-microbiennes[22, 239].

Le paclitaxel (Taxol™) est un agent stabilisant des microtubules ayant des propriétés antimitotiques et une activité antiproliférative efficace[240]. Cette drogue chimio-thérapeutique est une molécule largement utilisée dans le traitement des cancers du sein et des ovaires[241]. Beaucoup d'études se sont concentrées sur l'administration locale du paclitaxel à partir de microsphères de polymères[240, 242-244]. Le paclitaxel a été également employé dans le traitement et la prévention de la resténose coronaire (rétrécissement d'un vaisseau sanguin). En outre, cette drogue permet une réduction importante de la resténose une fois appliquée à la surface d'une prothèse endovasculaire ou stent[245-247]. Les systèmes capables de libérer les agents antiprolifératifs à la surface des stents sont en cours de développement, d'autres tels que les prothèses recouvertes par des films renfermant de la rapamycine, un immunosuppresseur

(molécule utilisée dans les traitements anti-rejet lors de greffes) sont commercialisées depuis trois ans[248].

Ainsi, une approche originale pour élaborer des films avec des propriétés anti-thrombiques repose sur des méthodes de pré-complexation de drogues avec les polycations ou les polyanions présents dans les multicouches[249]. Cette stratégie est plus particulièrement efficace dans le cas des molécules hydrophobes[250]. Luo et Prestwich ont développé une pro-drogue, le paclitaxel conjugué à l'acide hyaluronique qui agit comme vecteur[251, 252]. Plus récemment, Thierry *et al.*[253] ont modifié chimiquement l'acide hyaluronique en greffant le paclitaxel par une liaison ester labile. Ils ont aussi développé des films multicouches en greffant le paclitaxel sur le chitosan.

Le but de ce travail, réalisé avec en collaboration étroite avec le Docteur Constant Vodouhê, est de concevoir une couche extérieure à effet « barrière » sur les films $(PLL/HA)_n$, pour obtenir un réservoir pour des drogues, comme le paclitaxel. Dans ce cas, aucune modification chimique des polyélectrolytes ou de la drogue n'est nécessaire et l'architecture finale est obtenue par la méthode de trempage. La dose de paclitaxel disponible pour les cellules humaines d'adénocarcinome de côlon HT29 peut être finement ajustée[225]. L'accessibilité des drogues est contrôlée en recouvrant le film $(PLL/HA)_n$, qui constitue le réservoir, par un film multicouche synthétique, tel que (PSS/PAH). La couche terminale est aussi nécessaire à l'adhésion des cellules, car les films $(PLL/HA)_n$ sont anti-adhésifs pour les cellules HT29[225]. Dans cette étude, nous avons vérifié dans quelle mesure ce revêtement favorisant l'adhésion cellulaire et cloisonnant la strate sous-jacente, permettrait un contrôle de l'activité du paclitaxel sur les cellules qui ont été ensemencées sur les films $(PLL/HA)_n$-$(PSS/PAH)_i$-PSS.

Les films $(PLL/HA)_n$-$(PSS/PAH)_i$-PSS sont destinés à servir de réservoirs pour stocker des drogues ou des molécules actives destinées à être délivrées progressivement selon la constitution de la dernière strate. Dans notre cas, la molécule active est le paclitaxel. Cette molécule a été incorporée dans le film[225] avant dépôt de la seconde strate. Les cellules HT29 ont été ensuite cultivées sur ces films. Dans un premier temps, on a vérifié la toxicité des films avant incorporation du Taxol™. Les mesures de viabilité cellulaires ont été effectuées par dosage de la phosphatase acide (figure 4.1.4-1).

Après 24 heures, la viabilité cellulaire est identique sur les trois constructions (n = 30 et i = 0, 1 et 2) alors qu'elle est nulle sur les films (PLL/HA) non recouvert par (PSS/PAH). Cela confirme encore une fois que le film $(PLL/HA)_{30}$ est anti-adhésif pour les cellules HT29.

Après 96 heures de culture, la viabilité des cellules augmente en fonction du nombre de couches (PSS/PAH) déposées sur le film (PLL/HA). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une strate (PSS/PAH) plus épaisse, déposée à la surface d'un film (PLL/HA), offre un substrat mieux recouvert, plus adhésif et plus stable dans le temps pour les cellules HT29.

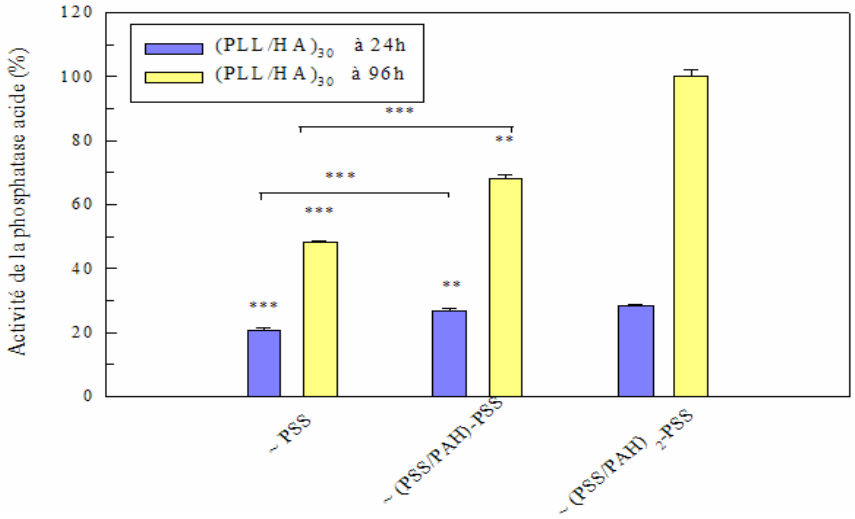


Figure 4.1.4-1 Mesure de viabilité des cellules HT29 sans paclitaxel.
*La viabilité cellulaire est mesurée par dosage de la phosphatase acide (en %) à 24h (en bleu) et à 96h (en jaune). La valeur 100% a été attribuée arbitrairement à l'activité des cellules sur le films $(PLL/HA)_{30}$-$(PSS/PAH)_2$-PSS. Les cellules HT29 sont non viables sur les films $(PLL/HA)_{30}$. Test de Student, * p < 0,05 ; **p < 0,01 et ***p < 0,001).*

Cette observation est à mettre en relation avec le fait que les cellules sont très sensibles aux propriétés mécaniques et chimiques du substrat sur lequel elles sont ensemencées[35] (cf. chapitre 3).

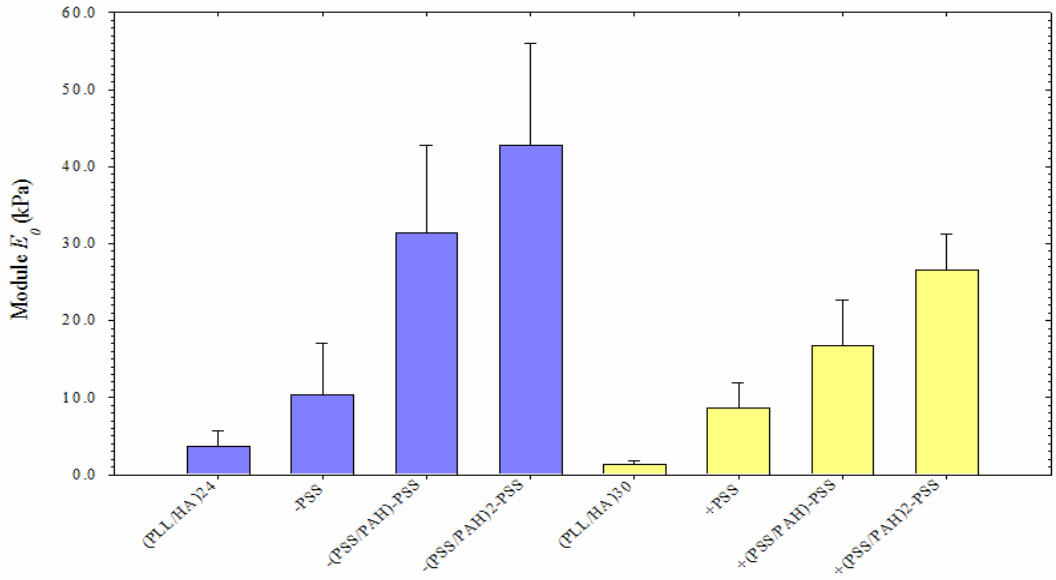


Figure 4.1.4-2 Module de Young des films $(PLL/HA)_n$-$(PSS/PAH)_i$-PSS.
Les modules de Young présentés ici sont les moyennes des modules calculés pour toutes les vitesses d'approche avec n = (24 en bleu ; 30 en jaune) et i = (0 ; 1 ;2).

Le module de Young de ces films a été déterminé par la technique de nanoindentation, et les courbes de force (AFM) traitées par le modèle de Dimitriadis corrigée par la fonction $g(\delta)$. La figure 4.1.4-2 montre que le module de Young des films $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_i$-PSS et des constructions $(PLL/HA)_{30}$-$(PSS/PAH)_i$-PSS augmente avec le nombre *i* de bicouches (PSS/PAH) déposées. On not aussi que le module de Young des films $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_i$-PSS est supérieur à celui des films $(PLL/HA)_{30}$-$(PSS/PAH)_i$-PSS pour un nombre *i* fixé de paires de couches (PSS/PAH) déposées (cf. annexe 2). Ces résultats soulignent que le fait de recouvrir les films (PLL/HA) par quelques paires de couches de (PSS/PAH) rigidifie l'ensemble du système.

Forts de ces résultats, nous avons incorporé du Taxol™ dans ces films (strate (PLL/HA)) afin de créer une fonction « réservoir » et de tester par la suite le comportement des cellules HT29. L'activité de la phosphatase acide mesurée pour les films-réservoirs ne contenant pas de Taxol™ sert de contrôle. Les mesures de viabilité obtenues quand les réservoirs contiennent du Taxol™, sont normalisées par rapport aux contrôles établis dans la figure 4.1.4-1. Dans la figure 4.1.4-3, pour un film donné, l'activité de la phosphatase acide des cellules HT29 diminue avec la durée de culture, donc d'exposition au Taxol™. Par contre, cette activité augmente avec le nombre de couches de (PSS/PAH) constituant le « couvercle » du réservoir

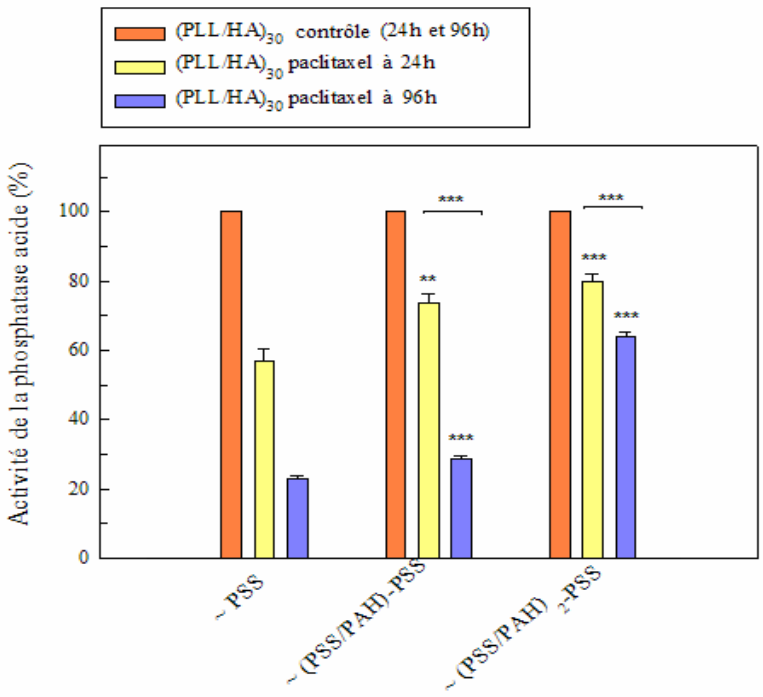


Figure 4.1.4-3 Mesure de viabilité des cellules HT29 avec paclitaxel (Taxol™).
*La valeur 100% a été attribuée respectivement aux activités mesurées pour les cellules ensemencées sur le films $(PLL/HA)_{30}$-(PSS/PAH)i-PSS, avec i =0,1 et 2, ne contenant pas de taxol à 24h et 96 h. Test de Student, * p < 0,05 ; **p < 0,01 et ***p < 0,001).*

Les résultats obtenus suggèrent que la strate de (PSS/PAH) déposée sur le film $(PLL/HA)_{30}$ agit comme une barrière imperméable au Taxol™ pour les cellules HT29. En outre, la modulation de l'épaisseur du « couvercle » (PSS/PAH) permet d'accentuer l'effet de barrière.

4.2 Etude de la construction $(PLL/HA)_{24}$–$(PLL/PGA^{sucre})_6$

4.2.1 Construction du système

Les films $(PLL/HA)_{24}$–$(PLL/PGA)_n$ ont été construits par trempage dans une solution saline (150 mM en NaCl) tamponnée par du TRIS 20 mM à pH 6,5. Les polyélectrolytes ont été dissous dans la solution tampon à raison de 1 mg/mL. Les temps de trempage sont de 10 minutes pour les rinçages, 10 minutes pour l'adsorption de PLL, PGA et HA. La réticulation du film $(PLL/HA)_{24}$–$(PLL/PGA)_6$ a été effectuée avec un mélange EDC/NHS pour une concentration de 37,5 mg/mL en EDC et 11 mg/mL pour NHS. Les protocoles de rinçage et de conservation sont les mêmes que ceux exposés dans le sous-chapitre 2.1. Le PGA a été modifié par glycosylation afin de greffer des « sucres » sur la chaîne principale.

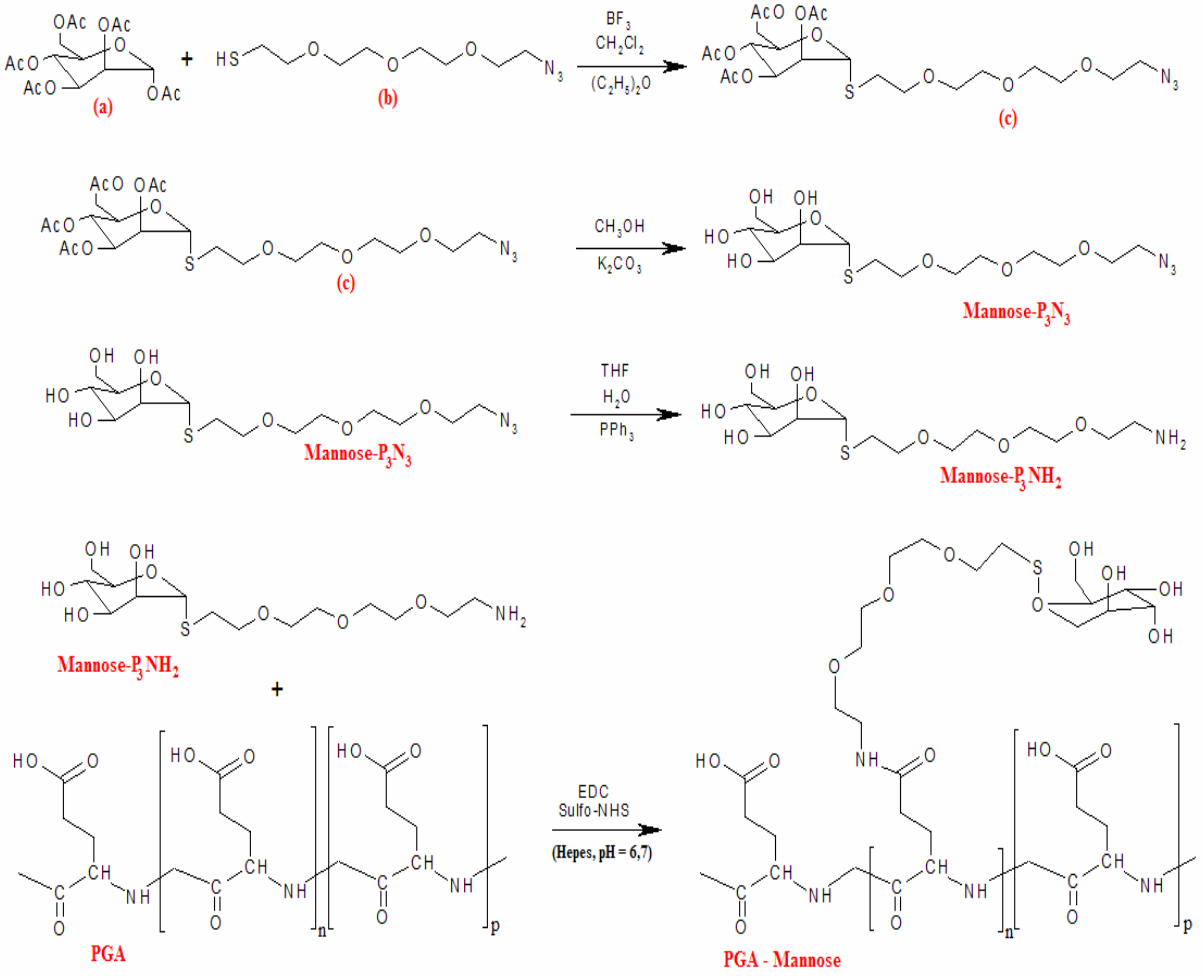


Figure 4.2.1-1 Greffage du mannose sur le PGA par glycosylation.

Le greffage des « sucres », mannose ou lactose, sur une molécule de PGA s'effectue par glycosylation. Le greffage se déroule en quatre étapes :

- 1) Les fonctions hydroxyles des sucres (mannose et lactose) sont préalablement substituées par des groupements acétates afin de les protéger d'éventuelles réactions parasites. Le sucre modifié (a) va réagir avec le bras espaceur (b) pour former un pont sulfure (c). La réaction est catalysée par un mélange de BF_3 et de $(C_2H_5)_2O$.
- 2) L'étape suivante est la « déprotection » des fonctions alcools et consiste à substituer les groupements acétates de la molécule (c) par des groupements hydroxyles. On obtient alors du mannose-P_3N_3 ou du lactose-P_3N_3 où P_3N_3 correspond au bras espaceur greffé sur le sucre. La réaction a lieu en présence de méthanol et de carbonate de potassium.
- 3) La fonction azide des molécules de mannose-P_3N_3 ou lactose-P_3N_3 est réduite afin d'obtenir une fonction amine à l'extrémité du bras espaceur (mannose-P_3NH_2 ou lactose-P_3NH_2).
- 4) La dernière étape, consiste à fixer le mannose-P_3NH_2 ou le lactose- P_3NH_2 sur la chaîne de PGA par la formation d'un pont amide réalisée entre une fonction acide carboxylique du PGA et la fonction amine du mannose-P_3NH_2 ou lactose-P_3NH_2. Il s'agit de la même réaction décrite pour la réticulation d'un film (PLL/HA).

Enfin, on peut souligner que le taux de greffage est environ de 10%, c'est-à-dire que la chaîne PGA modifiée possède 10% de charges négatives de moins qu'une chaîne de PGA non modifiée.

4.2.2 Evolution du module de Young en fonction de la nature du sucre

Nous avons construit cinq films bi-domaines $(PLL/HA)_{24} – (PLL/X)_n$ où X correspond à quatre types de PGA, dont trois ont été chimiquement modifiés (greffage de mannose, de lactose et de maléimide). Le module de Young de ces films a été mesuré par nanoindentation à l'aide d'un AFM (tableau 4.2.2-1). Les courbes de force obtenues (annexe 2) ont été traitées par le modèle de Dimitriadis corrigé par la fonction de correction $g(\delta)$ introduite au chapitre 3 pour le traitement des courbes de force obtenues pour films (PLL/HA) réticulés. Les résultats présentés dans la figure 4.2.2-1 montre l'évolution du module de Young en fonction de la vitesse d'approche de la sonde colloïdale pour nos cinq films bi-domaines :

- $(PLL/HA)_{24} – (PLL/PGA)_6$ (réticulé et non réticulé),

- $(PLL/HA)_{24}$ – $(PLL/PGA^{mal})_6$ où PGA^{mal} correspond au PGA sur lequel des groupements maléimides ont été greffés,
- $(PLL/HA)_{24}$ – $(PLL/PGA^{man})_6$ où PGA^{man} correspond au PGA glycosylé par du mannose,
- $(PLL/HA)_{24}$ – $(PLL/PGA^{lac})_6$ où PGA^{lac} correspond au PGA glycosylé par du lactose.

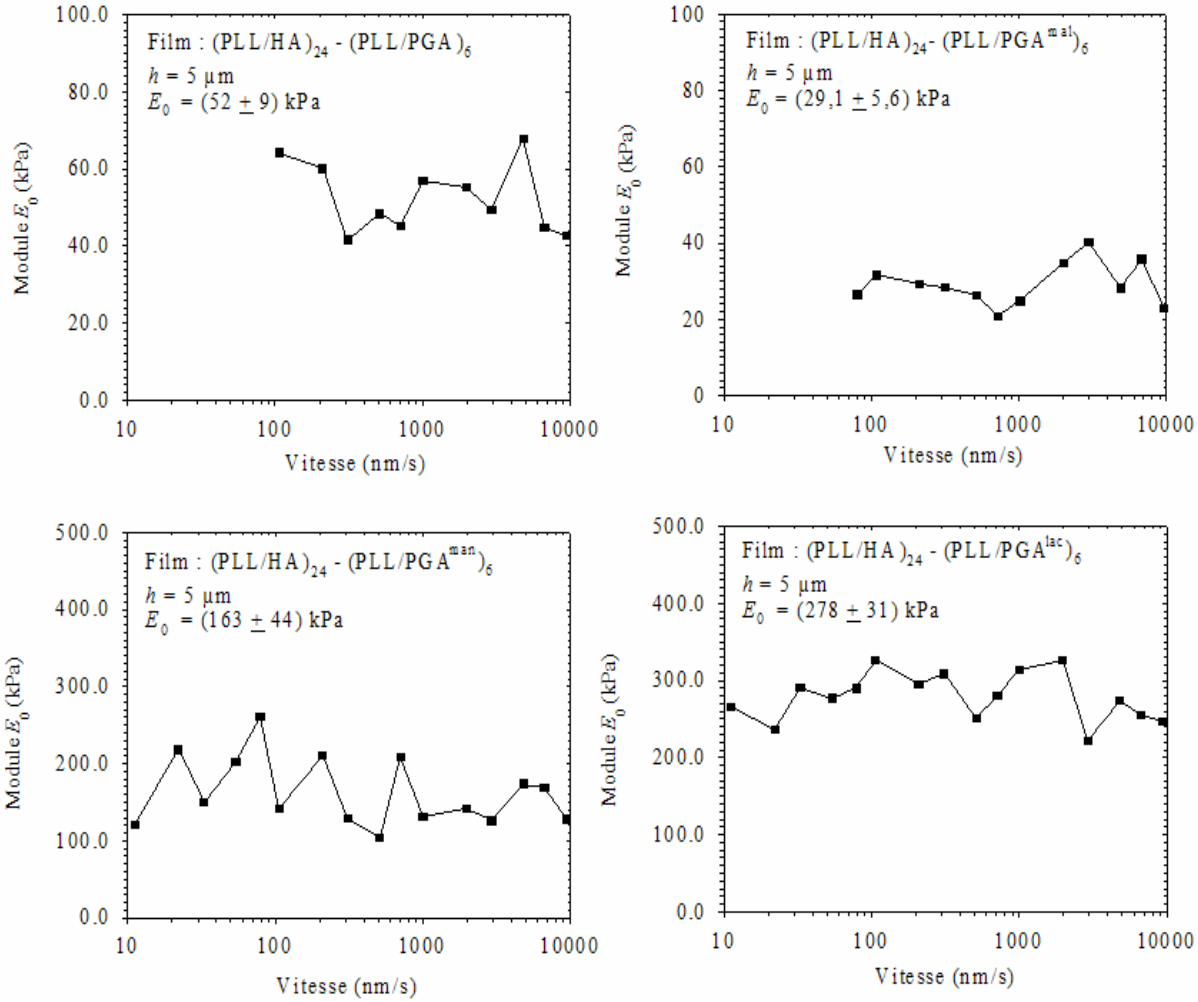


Figure 4.2.2-1 Module de Young des films $(PLL/HA)_{24}$- $(PLL/X)_6$ en fonction de la vitesse.

Les différentes courbes présentées mettent en évidence la caractéristique élastique des films bi-domaines. En effet, les modules de Young mesurés ne dépendent pas de la vitesse d'impact de la sonde colloïdale. Par ailleurs, le module de Young, moyenné pour toutes les vitesses (figure 4.2.2-2) est compris entre 150 et 300 kPa pour les films glycosylés alors qu'il est de l'ordre de 50 kPa pour un film natif où le PGA n'a subi aucune modification chimique. Quand tout le film est réticulé avec un mélange EDC à 37,5 mg/mL et de sulfo-NHS à 11 mg/mL, le module est d'environ 200 kPa. Cette valeur est proche de celle qui a été déterminée pour un film $(PLL/HA)_{24}$ réticulé avec le même mélange EDC/NHS (~200-250 kPa).

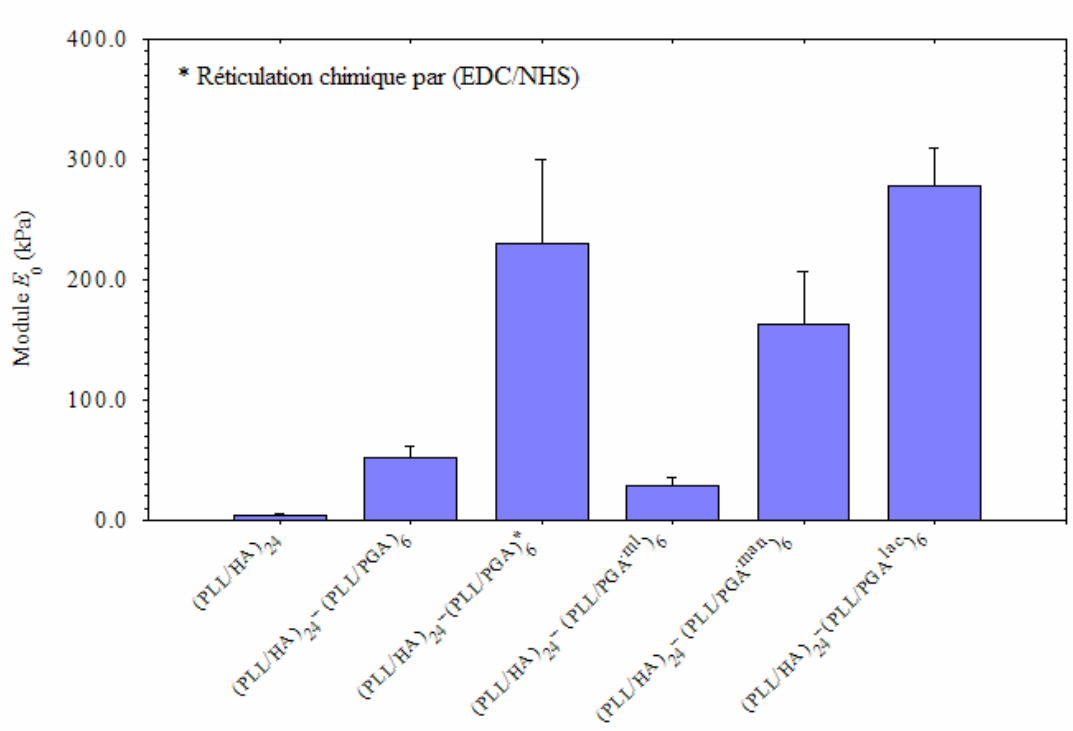


Figure 4.2.2-2 Evolution du module de Young en fonction de la nature chimique de la 2ème strate.

Les résultats obtenus démontrent que le recouvrement des films $(PLL/HA)_{24}$ par un film plus mince et plus dense tel que (PLL/PGA) entraîne un durcissement global du film bi-domaine à l'instar des films $(PLL/HA)_{24}$–$(PSS/PAH)_n$–PSS. Le module de Young de ces films est supérieur à celui des films non couverts (de 1 à 2 ordres de grandeur par exemple, pour 6 paires de couches déposées). Par ailleurs, il peut se produire des phénomènes d'échange entre polyélectrolytes[254, 255] durant le dépôt de la seconde strate. Ces échanges peuvent être responsables de changements profonds dans la structure du film[216, 239] (conformation des chaînes, densité de charge, liaisons hydrogènes…).

4.2.3 Applications biologiques

Le recouvrement de la surface de biomatériaux par des films multicouches de polyélectrolytes peut être employé pour améliorer la biocompatibilité, mais aussi pour contrôler les propriétés adhésives ou anti-adhésives des surfaces[256] vis-à-vis des cellules. Le contrôle de la composition chimique de tels revêtements et de leurs propriétés physicochimiques est primordial, car ces facteurs peuvent influencer les réponses biologiques. Par exemple, il a été montré que la charge de surface, le pH lors de la construction[96], l'hydrophobicité ou l'hydrophilie ainsi que le taux de gonflement des films[192] peuvent affecter

l'adhésion cellulaire. De plus, certains films de polysaccharides peuvent présenter des propriétés antimicrobiennes[24] et être employés comme réservoirs de molécules bioactives, telles que des drogues antitumorales[253] . D'un autre côté, il a été démontré que les propriétés mécaniques des films (par exemple la dureté) permettent de moduler l'adhésion cellulaire[56]. Cette dernière propriété a été mis en évidence pour un grand nombre de types cellulaires, tels que les chondrosarcomes, les chondrocytes primaires, les ostéoblastes et les neurones[257].

En termes d'applications biologiques, il est essentiel de vérifier l'influence des modifications des propriétés de surface des revêtements multicouches sur le comportement des cellules. Ainsi, dans le domaine de l'implantologie, plusieurs équipes de recherche travaillent au développement de surfaces fonctionnalisées capables d'un côté d'induire sélectivement la colonisation par les cellules et, d'un autre côté de limiter la réaction inflammatoire et la fibrose[28]. On note d'ailleurs un intérêt grandissant pour les interactions cellules-substrat pour optimiser les applications en ingénierie tissulaire[258]. Par exemple, le rôle de surfaces modifiées, par des peptides adhésifs tels que le RGD sur le comportement cellulaire a été largement étudié[259]. Cependant, on remarque aussi que peu d'études se focalisent sur les propriétés adhésives des surfaces modifiées par des hydrates de carbone. Récemment, Donati *et al.* (2005) ont étudié le comportement des chondrocytes mis en culture sur un hydrogel de chitosan modifié par du lactose[259]. Ils ont observé que les cellules tendent à former des agrégats et à produire des quantités plus élevées de protéines, notamment de la matrice extracellulaire. Parallèlement, ils ont observé une augmentation du nombre de glycoprotéines membranaires. Par conséquent, l'association polyélectrolyte-sucre peut constituer une alternative aux peptides synthétiques pour favoriser l'adhésion des cellules au substrat. En outre, le coût, la toxicité et la difficulté de greffer des molécules de « sucres » sont moindres que dans le cas du greffage de peptides.

Dans ce travail, l'objectif est d'évaluer s'il était possible de moduler l'adhésion de chondrocytes primaires et des chondrosarcomes sur des films multicouches en présence d'une couche de polyélectrolytes glycosylés déposés à la surface de la construction. Des expériences ont été menées sur des multicouches de (PLL/PGA) où des molécules de mannose ou de lactose ont été fixées sur le PGA. Le choix du PGA au lieu de la PLL repose sur de précédentes études d'adhésion cellulaire conduites sur les films (PLL/PGA). Elles ont montré que le PGA en couche terminale est préférable à la PLL en terme de viabilité cellulaire[260, 261]. Des films multicouches de polyélectrolytes glycosylés ont été comparés aux films (PLL/PGA) réticulés, qui sont également connus pour favoriser les propriétés adhésives des cellules[23, 35].

Les chondrosarcomes et les chondrocytes primaires ont été cultivés séparément sur des films glycosylés $(PLL/PGA^{sucres})_6$, non glycosylés $(PLL/PGA)_6$, dits natifs, et sur des films $(PLL/PGA)_6$ non glycosylés mais réticulés. La culture de ces mêmes cellules sur du verre nous a permis de disposer d'un témoin pour les mesures de viabilité ultérieures. Les cellules ensemencées sur les films ont été observées par microscopie photonique après quatre heures et quarante huit heures après le dépôt (figure 4.2.3-1).

Les différentes observations montrent que les chondrosarcomes présentent des formes plus ou moins rondes, quel que soit le substrat (figures 4.2.3-1 et 4.2.3-2). Ils paraissent toutefois plus étalés et plus nombreux sur le verre (e) que sur les autres substrats (a-d). Par ailleurs, sur les films natifs (a), les cellules sont peu nombreuses et regroupées en amas, alors que sur le film réticulé (b), elles sont très nombreuses et peu étalées. On remarque aussi que ces cellules sont plus étalées sur les films glycosylés (c et d) mais en moins grand nombre que sur le film réticulé (b).

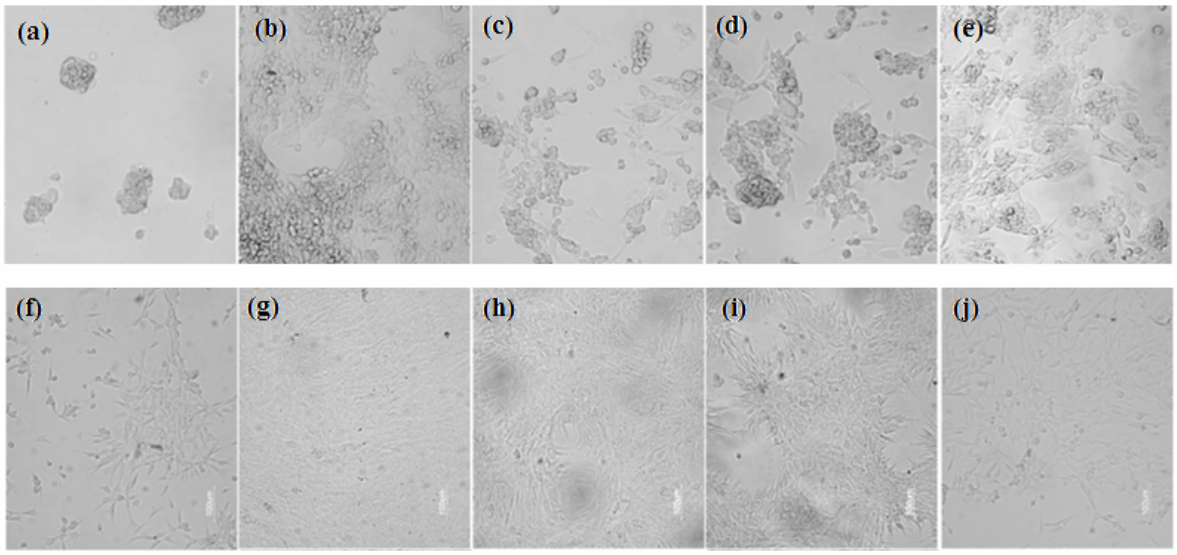


Figure 4.2.3-1 Observation par microscopie photonique de chondrosarcomes (a-e) et de chondrocytes (f-j). *Les cellules ont été cultivées pendant cinq jours sur des films natifs (a, f), des films réticulés (b, g), des films couverts par PGA-mannose (c,h), des films couverts par PGA-lactose (d, i) et du verre (e, j).*

Les chondrocytes primaires sont nombreux et adoptent une forme très allongée sur tous les substrats. On ne relève pas de grandes différences entre la numération et l'étalement cellulaire sur le verre (j) et sur le substrat natif (f). En outre, on observe que les cellules sont beaucoup plus nombreuses sur les films glycosylés (h et i) et sur le film réticulé (g) que sur le verre (j). Ces résultats sont confirmés en termes d'étalement par la détermination du facteur de forme des cellules (figure 4.2.3-2)

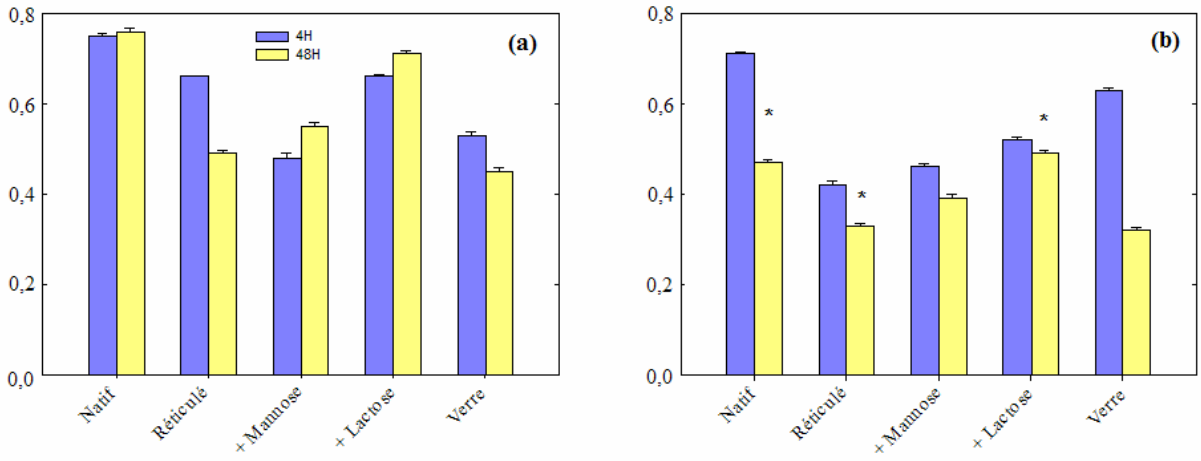


Figure 4.2.3-2 Facteurs de forme à 4h et 48h des chondrosarcomes (a) et chondrocytes (b).
*Facteurs de forme (sans dimensions) pour les chondrosarcomes (a) et pour les chondrocytes primaires (b) après 4 heures (barres bleues) et 48 heures (barres jaunes). Les cellules ont été mises en cultures sur les différents films * statistiquement différent du verre par test de Kruskal-Wallis à sens unique, * $p < 0.05$.*

La figure 4.2.3-2 présente les facteurs de forme des cellules après 4 et 48 heures de culture. Le facteur de forme caractérise l'étalement cellulaire : plus les cellules sont étalées, plus ce facteur tend vers 0. Dans le cas contraire, elles sont rondes et le facteur de forme tend vers 1. Les facteurs de forme déterminés pour les chondrosarcomes (a) et les chondrocytes (b) sur les différents substrats, corroborent les observations de microscopie photonique.

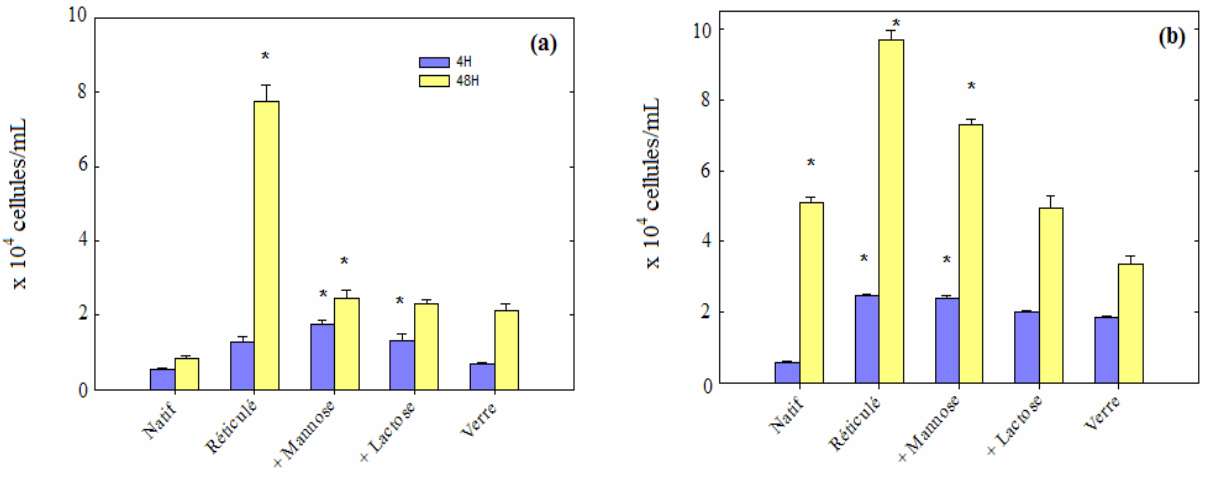


Figure 4.2.3-3 Viabilité cellulaire à 4h et 48h des chondrosarcomes (a) et chondrocytes (b).
*Test de viabilité au bleu de trypan pour les chondrosarcomes (a) et pour les chondrocytes primaires (b) mis en culture sur les différents films. L'adhésion cellulaire est statistiquement différente par rapport à celle sur le verre. Test de Kruskal-Wallis à sens unique, * $p < 0.05$.*

Les tests de viabilité effectués sur les chondrosarcomes après quatre heures (figure 4.2.3-3a) montrent que ces cellules ont une plus grande affinité pour les films glycosylés et réticulé que pour le verre ou le film natif avec un optimum pour le film glycosylé avec du mannose. Après 48 heures, le comportement des cellules est fortement modifié selon le type de substrat. Ainsi,

on constate que les chondrosarcomes ont peu proliféré sur les films glycosylés et natif. *A contrario*, on observe une forte augmentation de la population cellulaire dans le cas du film réticulé et du verre. Dans le cas des chondrocytes (figure 4.2.3-3b), après quatre heures de culture, le nombre de cellules viables présentes sur les substrats est à peu près identique (environ 2×10^4 cellules/mL) excepté sur le film natif. Après 48 heures, il est possible de déterminer une hiérarchie dans l'affinité des cellules pour les différents substrats. Dans l'ordre décroissant, on peut classer l'affinité cellulaire d'abord pour le film réticulé, puis la multicouche glycosylé avec du mannose, le film glycosylé avec du lactose, le film natif et enfin le verre. Ces observations suggèrent que les chondrocytes adhèrent mieux sur les films glycosylés et le film natif que les chondrosarcomes. Dans ce cas, on peut supposer que les films glycosylés inhibent la synthèse de protéines matricielles permettant l'adhésion des chondrosarcomes[259].

4.3 Conclusion

4.3.1 Propriétés physico-chimiques et mécaniques

Les études menées sur les films bi-domaines ont montré que les propriétés physicochimiques et mécaniques de ceux-ci se trouvent profondément modifiées par rapport aux films natifs non recouverts. En effet, lors du dépôt de la seconde strate, l'architecture du film est le siège de divers remaniements, notamment de processus de diffusion[239] et d'échange de polyélectrolytes[254]. D'autres phénomènes, comme la déconstruction du film peuvent également avoir lieu[216]. Les conséquences, en termes de propriétés mécaniques, du dépôt de la seconde strate ont été observées sur le module de Young des films bi-domaines. Ainsi, dans le cas où la seconde strate est constituée par un film (PSS/PAH) déposé sur le film $(PLL/HA)_{24}$, on observe une rigidification de l'ensemble du film, qui se traduit par l'augmentation du module de Young en fonction du nombre de dépôts de (PSS/PAH). Par exemple, le module de Young mesuré passe de 3 kPa pour un film $(PLL/HA)_{24}$ non couvert par (PSS/PAH) à environ 800 MPa pour un film $(PLL/HA)_{24}$ couvert par 24 bicouches de (PSS/PAH). Par ailleurs, nous avons montré que le module de Young des films bi-domaines dépend de la nature chimique des polyélectrolytes composant la seconde strate (figure 4.3.1-1).

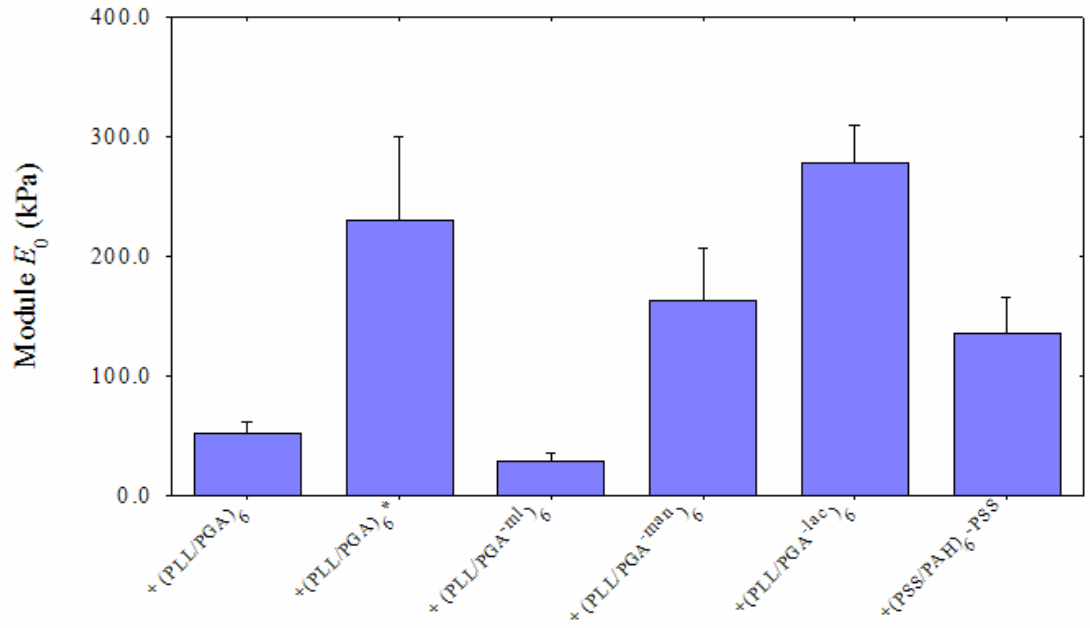


Figure 4.3.1-1 Variations du module de Young pour $(PLL/HA)_{24}$-$(X/Y)_6$.
*$(X/Y)_6$ correspond à la seconde strate, * représente le film totalement réticulé par un mélange de 37,5 mg/mL en EDC et 11 mg/mL en sulfo-NHS.*

Les travaux conduits montrent une grande disparité des modules de Young mesurés sur ces films. En effet, le module de Young est de 30 et 50 kPa respectivement pour $(PLL/PGA)_6$ et $(PLL/PGA^{mal})_6$, où PGA^{mal} correspond au PGA-maléimide, alors qu'il est de l'ordre de 150–250 kPa pour les paires $(PSS/PAH)_6$ et $(PLL/PGA^{sucre})_6$. On remarque aussi que le module de Young des films bi-domaines glycosylés est du même ordre de grandeur que le module de Young mesuré pour les films mono-domaines $(PLL/HA)_{24}$ réticulés (sous chapitre 3.2). Il ressort de cette étude, que le recouvrement d'un film « mou » de $(PLL/HA)_{24}$ par un film plus mince de (PSS/PAH) et (PLL/PGA) permet de durcir l'ensemble du film, et constitue une alternative à la réticulation chimique.

4.3.2 Contrôle de la réponse cellulaire

Dans la première partie de cette étude, nous avons conçu et analysé des films multicouches de polyélectrolytes contenant une drogue active, le paclitaxel (Taxol™). Nous avons notamment pu montrer que ces architectures pouvaient servir de réservoirs pour le Taxol™. De plus, nous avons démontré que la quantité de drogue incluse dans les films (PLL/HA) pouvait être finement ajustée[225]. S'il est vrai que les cellules HT29 adhèrent mal sur les films (PLL/HA) natifs, nous avons noté que le dépôt de multicouches de (PSS/PAH) sur la base (PLL/HA) améliore l'adhésion cellulaire. Par ailleurs, ces multicouches de (PSS/PAH) permettent d'ajuster l'accessibilité des cellules HT29 aux molécules de Taxol™[225]. Les constructions multicouches conçues dans cette étude constituent une voie originale pour contrôler et régler l'accessibilité des molécules de paclitaxel aux cellules HT29. En outre, cette nouvelle approche présente plusieurs avantages, comme la simplicité de sa mise en œuvre et la possibilité d'étendre la méthode à d'autres systèmes cellules/drogue.

Dans un deuxième volet nous avons étudiés des films multicouches recouverts par des polymères glycosylés, tels que le mannose et le lactose, qui peuvent être adsorbés sur les multicouches de polyélectrolytes constituées de PLL et de PGA. Les films multicouches glycosylés possèdent des propriétés intéressantes en terme d'adhésion cellulaire. Nous avons comparé ces films glycosylés à des films natifs non glycosylés et réticulés. Or, ces derniers sont connus pour changer considérablement les propriétés adhésives[23] de certaines cellules. Nous avons montré que les films contenant du PGA-mannose favorisaient particulièrement l'adhésion et la prolifération des chondrocytes alors qu'ils sont anti-adhérents pour les chondrosarcomes et limitent fortement la prolifération de ces cellules. On a observé un

comportement similaire pour des films contenant du PGA-lactose mais l'influence de ce polyélectrolyte glycosylé sur les cellules étudiées est moins important que celle qui a été observée pour le mannose. Dans ce cas, on peut supposer que l'adhésion cellulaire est non seulement liée à la modification de la dureté du film, mais dans certains cas elle peut aussi être fortement influencée par la nature chimique du substrat. Les résultats de cette deuxième partie de l'étude menée en collaboration avec le Docteur Aurore Schneider et le Professeur Catherine Picart[198], soulignent que le recouvrement d'un film multicouche par une strate de polyélectrolytes glycosylés pouvait améliorer considérablement les propriétés d'adhésion de l'architecture vis-à-vis de certains types cellulaires.

Chapitre 5 : Modélisation viscoélastique

Modélisation viscoélastique

5.1 Rappels sur le formalisme 171

5.2 Exemples de modélisations pour $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_8$-PSS 172

5.2.1 Modélisation par un ressort et une unité de Kelvin en série 172

5.2.2 Modélisation par un ressort et deux unités de Kelvin en série 174

5.2.3 Modélisation par un ressort, une unité de Kelvin et un piston en série 176

5.2.4 Modélisation par un ressort, deux unités de Kelvin et un piston en série 178

5.3 Modélisation viscoélastique des films $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$-PSS 181

5.3.1 Représentation des films (n = 0, 1, 2, 4, 6, 12, 15, 24) par le modèle RK_2P 181

5.3.2 Analyse des courbes de force mesurées sur le film $(PSS/PAH)_{210}$-PSS 182

5.4 Conclusion 183

Ce chapitre est complémentaire du chapitre 4. Nous y analyserons les courbes de force mesurées sur les films $(HA/PLL)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$-PSS, mais en faisant appel à une description viscoélastique des matériaux indentés (sous-chapitre 1.3.2). Nous avons en effet constaté au chapitre 4 que les courbes de force n'étaient pas invariantes par rapport à la vitesse d'approche (figure 4.1.2-1). Ce fait expérimental se traduisait par un module de Young (figure 4.1.2-4; voir aussi figure 3. dans l'annexe 2) qui variait lui aussi avec la vitesse et qui, de ce fait, n'était pas une caractéristique intrinsèque du matériau sondé. Il convient de rappeler que les courbes de force ont été analysées au chapitre 4 à l'aide d'un modèle hertzien qui ne comportait qu'un élément élastique pour modéliser le matériau. Les raffinements apportés au modèle de Hertz (au sens strict du terme) par la prise en compte de l'épaisseur finie du film (correction de Dimitriadis) et par l'introduction de la fonction empirique $g(\delta)$, destinée à étendre le domaine d'indentation, ne changeaient pas la nature de l'approche. Nous nous intéresserons donc à la transposition d'un modèle élastique à son équivalent viscoélastique conformément aux prescriptions données par exemple dans l'ouvrage de Johnson[50] qui ont été résumées dans le chapitre 1 de ce mémoire. Nous nous en tiendrons à la transposition de la solution élastique de Dimitriadis *et al.*[49] sans réintroduire la fonction de correction $g(\delta)$. En contrepartie, nous restreindrons le domaine d'indentation à 100 nm (soit 2% de l'épaisseur du film) pour limiter l'éventuel biais qu'introduirait la non linéarité des matériaux dans la comparaison de leurs propriétés mécaniques respectives.

Nous envisagerons quelques représentations d'un matériau viscoélastique faisant appel à des éléments élastiques et des éléments visqueux et à leurs associations sous la forme d'une ou de deux unités de Kelvin. Ainsi, nous analyserons les courbes de force en traitant l'un des films (n = 8) comme un matériau homogène se comportant comme un ressort et une unité de Kelvin en série (modèle RK_1), puis en y ajoutant un piston en série (modèle RK_1P). La même analyse sera reprise avec les modèles RK_2 et RK_2P. On notera que toutes ces représentations sont toutes des cas particuliers du schéma général donné au chapitre 1 (figure 1.3.2-3) puisqu'un ressort est une unité de Kelvin à viscosité nulle et qu'un piston est une unité de Kelvin à rigidité nulle. Par ailleurs, nous avons amorcé la modélisation des films par un grand nombre d'unités de Kelvin en série (train d'unités de Kelvin ou modèle K_N avec N égal à plusieurs dizaines; figure 1.3.2-3) en vue d'obtenir un spectre des temps de retard. Cependant, ce travail, loin d'être achevé, ne sera pas exposé ici.

Comme nous le constaterons ci-dessous, le modèle RK_1, bien que rudimentaire, permet une reproduction satisfaisante des courbes de force, vitesse par vitesse, du film $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_8$-PSS. Le modèle RK_2, possédant une unité de Kelvin supplémentaire, donc un paramètre libre supplémentaire, conduit à une reproduction quelque peu améliorée des courbes de force expérimentales. Toutefois, les modules de Young équivalents aux deux ressorts (RK_1) ou aux trois ressorts (RK_2) impliqués sont peu différents. Dans les deux cas, le fait marquant qui se dégagera sera la dérive du module équivalent avec la vitesse d'approche, comme déjà observé sur la figure 4.1.2-4. Ce constat motivera le recours aux représentations RK_1P et RK_2P. Nous appliquerons ensuite l'analyse à l'aide du modèle RK_2P aux autres films de la suite (n = 0, 1, 2, 4, 6, 12, 15, 18 et 24), ainsi qu'au film $(PSS/PAH)_{210}$-PSS, pour obtenir le module de Young équivalent aux éléments élastiques de cette représentation, en tant qu'évaluation de l'effet de l'adsorption alternée de PSS et de PAH sur la strate basale $(PLL/HA)_{24}$.

5.1 Rappels sur le formalisme

Dans les paragraphes suivants de ce chapitre, la fonction de fluage du milieu indenté sera donnée par l'équation (1.3-39) correspondant à N unités de Kelvin en série. Si l'on souhaite y faire apparaître explicitement un ressort seul (unité de Kelvin sans viscosité, module de Young E_1), on écrit :

$$J(t) = \frac{1}{E_1} + \sum_{k=2}^{N} \frac{1}{E_k}\left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_k}\right)\right] \tag{5.1-1}$$

Si de plus on souhaite y faire apparaître explicitement la présence d'un piston seul (unité de Kelvin sans élément élastique, viscosité η_N)[140], on écrit :

$$J(t) = \frac{1}{E_1} + \sum_{k=2}^{N-1} \frac{1}{E_k}\left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_k}\right)\right] + \frac{t}{\eta_N} \tag{5.1-2}$$

A une indentation maximale δ_{max}, fixée et effectivement atteinte au cours de la mesure, correspond un temps d'observation T, fini. Le terme correspondant au piston est obtenu pour $0 \le t \le T$ en faisant tendre E_N vers 0 donc τ_N vers l'infini dans l'expression de la fonction de fluage de la $N^{ème}$ unité de Kelvin où $\tau_N = \eta_N/E_N$. Les représentations RK_1 et RK_2 du milieu sondé correspondent à l'équation (5.1-1) avec $N = 2$ et 3, respectivement. Les représentations RK_1P et RK_2P du milieu sondé correspondent à l'équation (5.1-2) avec $N = 3$ et 4, respectivement.

La relation entre la force appliquée à la sonde et l'indentation qui en découle est exprimée par l'équation (1.3-30) que nous réécrivons ici pour mémoire :

$$X_m(t) = \frac{3(1-\nu^2)}{4R^{1/2}} \int_0^t J(t-t') \frac{dF(t')}{dt'} dt' \tag{5.1-3}$$

où, dans les applications décrites ci-dessous, $J(t)$ sera remplacée par (5.1-1) ou (5.1-2). La grandeur X_m sera comparée à sa contrepartie expérimentale X_e, définie de la même façon que X_m, mais en utilisant l'indentation expérimentale : $X_e = \delta_e^{3/2} f_D$, où f_D est le polynôme de Dimitriadis (chapitre 1).

Pour une courbe de force comportant n points de mesure répartis entre $\delta = 0$ et $\delta = \delta_{max}$, on cherchera les paramètres de la fonction de fluage qui minimisent l'indice de qualité de l'ajustement défini par :

$$q = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\left(X_m^{(i)} - X_e^{(i)}\right)^2} \qquad (5.1\text{-}4)$$

La recherche du minimum de q, ou en pratique de q^2, conduit à un système linéaire de N équations où les N inconnues sont les inverses des modules de Young et éventuellement l'inverse de la viscosité du piston. La résolution de ce système s'effectue sans difficulté par la méthode usuelle de Gauss[262]. Cependant, la solution mathématique ainsi obtenue n'est pas nécessairement une solution physique dans la mesure où le meilleur ajustement peut requérir des modules négatifs. Ce cas se produit si N dépasse une certaine valeur qu'il n'est pas possible de prédire. Il faut alors réduire progressivement N jusqu'à l'obtention d'une solution physique.

5.2 Exemples de modélisations pour $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_8$-PSS

5.2.1 Modélisation par un ressort et une unité de Kelvin en série (RK_1)

Les paramètres libres de la représentation RK_1 sont les modules de Young E_1 et E_2, ainsi que le temps de retard τ_2 de l'unité de Kelvin. Si l'on se donne ce temps, la minimisation de q^2 conduit à un système linéaire de deux équations à deux inconnues qui sont $J_1 = 1/E_1$ et $J_2 = 1/E_2$. On procède alors à un balayage systématique d'un domaine de temps de retard que l'on délimite à l'aide de quelques essais préliminaires. Pour le film considéré ici, ce domaine s'étend de 10^{-4} à 10 s. Le rapport entre deux temps de retard successifs a été fixé à $2^{1/16} \approx 1{,}044$. Pour chaque valeur de τ_2, on détermine le couple (E_1, E_2) et l'indice de qualité. Le triplet (E_1, E_2, τ_2) qui minimise cet indice est pris pour solution optimale correspondant à une vitesse d'approche et à un film donné. Par ailleurs, pour chaque vitesse et chaque film, le temps, T, nécessaire pour atteindre l'indentation maximale δ_{max} = 100 nm, est différent. Le module de Young E_{eq}, équivalent aux modules E_1 et E_2, défini par $E_{eq} = \left(E_1^{-1} + E_2^{-1}\right)^{-1}$ est donné sur la figure 5.2.1-1a ; le temps d'observation T et le temps de retard τ_2 sont donnés sur la figure 5.2.1-1b.

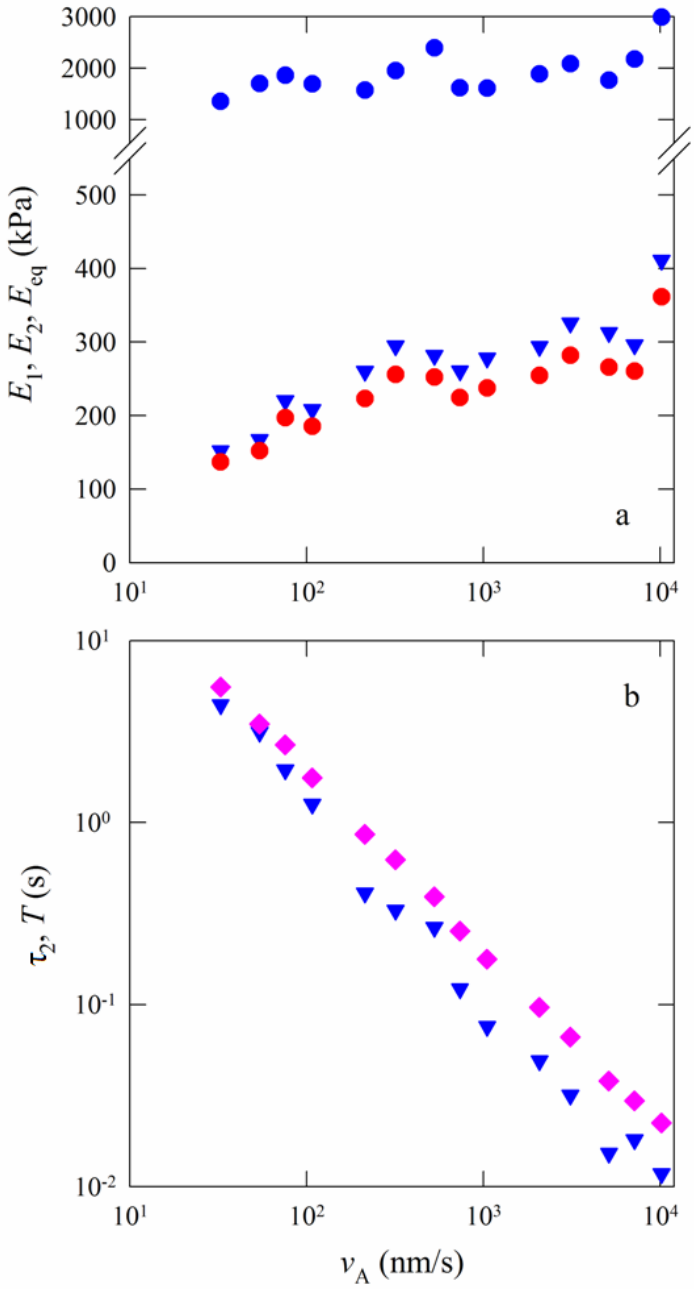


Figure 5.2.1-1 Représentation des modules et du temps de retard en fonction de la vitesse d'approche pour le modèle RK_1.

Modules de Young du ressort E_1 (disques bleus), de l'unité de Kelvin E_2 (triangles bleus), et équivalent E_{eq} (disques rouges) (a). Temps d'observation T (losanges roses), et temps de retard de l'unité de Kelvin τ_2 (triangles bleus). v_A représente la vitesse d'approche (b).

La figure 5.2.1-1a révèle que la dureté du ressort seul est nettement supérieure à celle du ressort qui fait partie de l'unité de Kelvin. La valeur du module équivalent est donc essentiellement due à la valeur de E_2. On notera surtout que le module équivalent reste dépendant de la vitesse d'approche. Ceci signifie que les éléments élastiques doivent prendre en charge, au moins en partie, la diminution de la dureté apparente du film à mesure qu'il est

indenté moins rapidement. Dans ces conditions, il est difficile de caractériser le film par la seule valeur moyenne de E_{eq}, soit 235 ± 57 kPa où l'incertitude correspond à l'écart type des 14 valeurs disponibles.

La figure 5.2.1-1b montre le temps d'observation en fonction de la vitesse d'approche. On notera que le produit $v_A T$ est approximativement constant, de l'ordre de 200 nm, soit deux fois la valeur de δ_{max} = 100 nm. On vérifie ainsi indirectement que la vitesse d'indentation est inférieure à la vitesse d'approche. L'égalité des deux vitesses ne pourrait être observée que si le milieu indenté n'opposait aucune résistance à la sonde. Le temps de retard présente une évolution moins régulière avec v_A ; néanmoins, il croît nettement (grossièrement comme v_A^{-1}) quand la vitesse d'approche diminue. Il est vraisemblable que le matériau déformé possède de multiples voies de réarrangement, chacune caractérisée par un temps spécifique. Si toutes les voies étaient rapides par rapport à la durée d'observation, le matériau paraîtrait purement élastique. Si au contraire elles étaient toutes lentes par rapport à la durée d'observation, le matériau paraîtrait figé et de fait presque indéformable. Dans nos expériences, le matériau se déforme à toutes les vitesses d'approche utilisées, donc sur des durées d'observation couvrant environ 2,5 ordres de grandeur. La déformation à toutes les vitesses pourrait signifier que le matériau est purement élastique. Dans ce cas, les modules E_1 et E_2 seraient indépendants de la vitesse et le temps de retard τ_2 serait virtuellement nul. Les résultats de la figure 5.2.1-1 montrent que cette hypothèse est fausse. Au contraire, le matériau est viscoélastique et à chaque vitesse d'approche, le modèle sélectionne le temps de retard le plus représentatif des phénomènes de réarrangement détectables dans le temps d'observation correspondant à cette vitesse. Le fait que ce temps de retard varie approximativement comme l'inverse de la vitesse accrédite l'hypothèse que les temps de réarrangement du matériau couvrent un domaine au moins aussi étendu que celui des temps de retard, c'est-à-dire plusieurs ordres de grandeur.

5.2.2 Modélisation par un ressort et deux unités de Kelvin en série (RK_2)

Nous allons à présent enrichir le modèle d'une deuxième unité de Kelvin (module de Young E_3, temps de retard τ_3). Le principe d'obtention des paramètres du modèle est le même qu'au paragraphe 5.2.1, mais il est nécessaire d'effectuer un double balayage sur les temps de retard afin d'obtenir le meilleur couple (τ_2, τ_3), les modules associés (E_1, E_2, E_3) et le module

équivalent $E_{eq} = \left(E_1^{-1} + E_2^{-1} + E_3^{-1}\right)^{-1}$. L'introduction dans le logiciel de deux boucles imbriquées augmente substantiellement les temps de calcul même si l'on impose $\tau_2 < \tau_3$, sans restreindre le nombre de configurations explorées. Ceci indique qu'il sera difficile de poursuivre la procédure d'ajouts successifs d'une unité de Kelvin en conservant l'algorithme mis en œuvre ici.

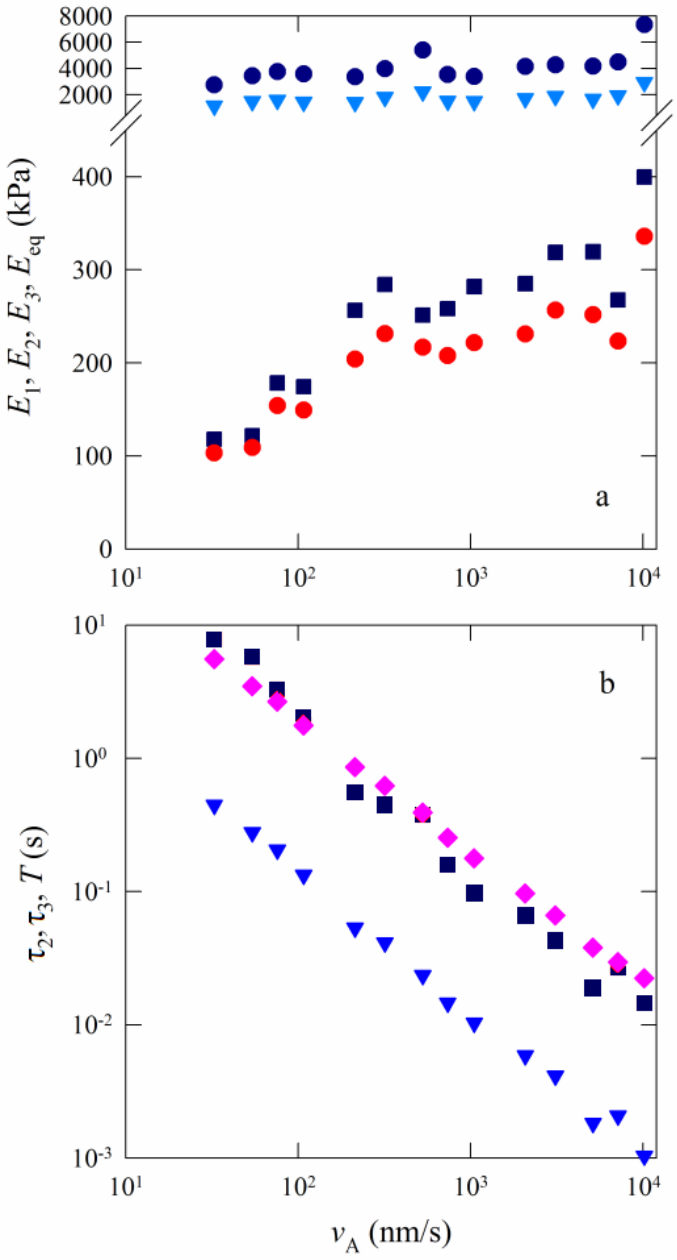


Figure 5.2.2-1 Représentation des modules et des temps de retard en fonction de la vitesse d'approche pour le modèle RK_2.

Modules de Young du ressort E_1 (disques bleus), des unités de Kelvin, E_2 (triangles bleus) et E_3 (carrés bleus), et équivalent E_{eq} (disques rouges) (a). Temps d'observation, T (losanges roses), et temps de retard des unités de Kelvin τ_2 (triangles bleus) et τ_3 (carrés bleus) (b). v_A représente la vitesse d'approche.

Les résultats issus de l'analyse des courbes de force sont donnés sur les figures 5.2.2-1a et 5.2.2-1b. On constate immédiatement que le module équivalent reste dépendant de la vitesse d'approche, au moins en dessous de 300 nm/s. Aux vitesses plus élevées, on pourrait supposer que le module reste constant si l'on exceptait sa valeur à 10000 nm/s. Cette remarque pouvait également être énoncée à propos du module équivalent déduit du modèle RK_1. Il reste donc pareillement difficile de caractériser le film par la seule valeur moyenne de E_{eq}, soit 207 ± 62 kPa, obtenue à partir du modèle RK_2.

5.2.3 Modélisation par un ressort, une unité de Kelvin et un piston en série (RK_1P)

Le modèle RK_1P (aussi appelé modèle de Burgers[44]) peut être construit soit en ajoutant un piston au modèle RK_1 (N passe ainsi de 2 à 3 et le nombre de paramètres libres augmente d'une unité), soit en transformant la deuxième unité de Kelvin du modèle RK_2 en piston (N reste alors égal à 3, mais le nombre de paramètres libres diminue d'une unité)**.** Ainsi, la troisième unité est seulement caractérisée par sa viscosité, alors que dans le modèle RK_2 elle était caractérisée par τ_3 et E_3. En forçant la troisième unité à se comporter comme un piston, on réduit certes le nombre de paramètres libres, mais on impose surtout à E_3 de tendre vers 0, donc à τ_3 de devenir très supérieur au temps d'observation T.

Les paramètres extraits du traitement des courbes de force sont les modules E_1 et E_2 et leur module équivalent $E_{eq} = \left(E_1^{-1} + E_2^{-1}\right)^{-1}$, le temps de retard τ_2, ainsi que la viscosité du piston η_3. Les résultats sont donnés sur la figure 5.2.3-1. On constate que le module équivalent fluctue autour d'une valeur moyenne (511 ± 99 kPa), autrement dit qu'il ne présente plus de dérive systématique avec la vitesse d'approche telle qu'elle apparaissait sur les figures 5.2.1-1a et 5.2.2-1a. Ce module équivalent peut donc jouer le rôle d'une caractéristique intrinsèque du film. La conclusion à laquelle nous venons d'aboutir atteste qu'une suite d'unités de Kelvin est en mesure de rendre compte des propriétés viscoélastiques d'un film. Cependant, il montre aussi qu'un modèle très simple tel que RK_2 ne permet pas nécessairement de détecter l'existence du fluage permanent dont rend compte le piston.

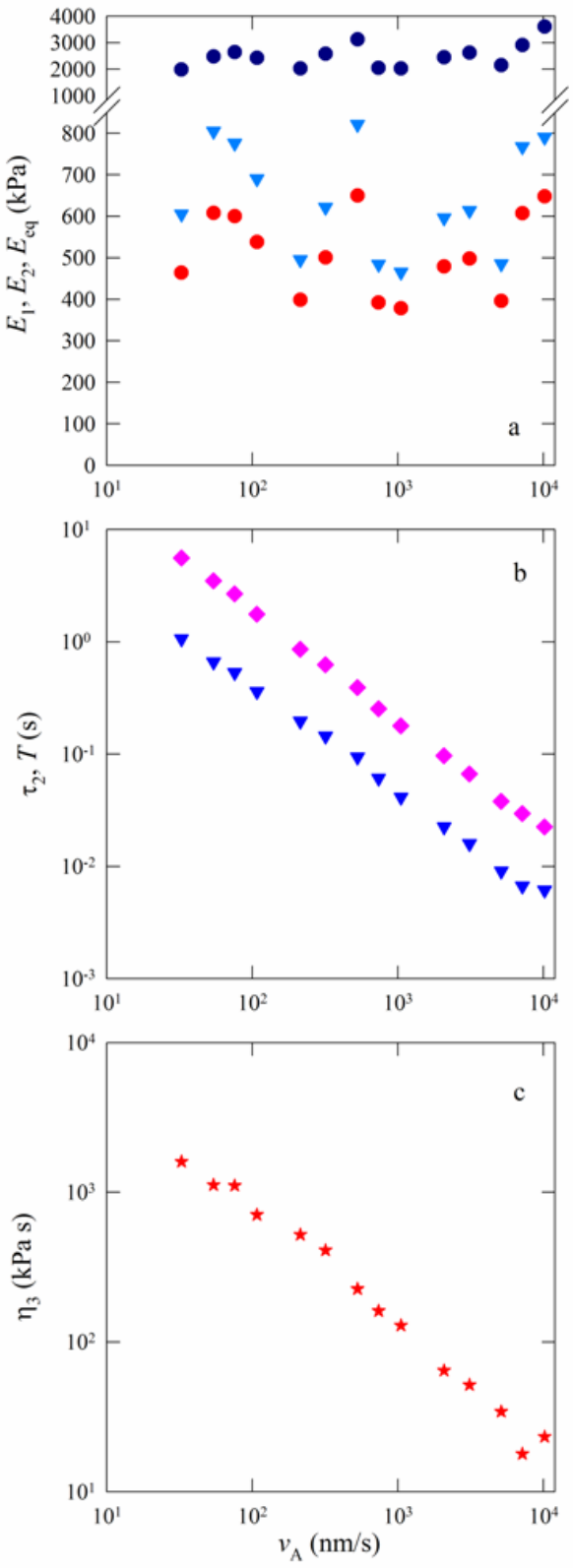


Figure 5.2.3-1 Représentation des modules et du temps de retard en fonction de la vitesse d'approche pour le modèle RK_1P.

Modules de Young du ressort E_1 (disques bleus), de l'unité de Kelvin E_2 (triangles bleus), et équivalent E_{eq} (disques rouges) (a). Temps d'observation T (losanges roses), et temps de retard de l'unité de Kelvin τ_2 (triangles bleus) (b). Viscosité du piston, η_3 (étoiles rouges) (c). v_A représente la vitesse d'approche.

On observera par ailleurs que l'évolution du temps de retard, τ_2, est très similaire à celle obtenue à partir du modèle RK_1, avec toutefois nettement moins de fluctuations (figure 5.2.3-1b). La figure 5.2.3-1c montre que la viscosité du piston suit, comme τ_2, une loi de puissance de la vitesse d'approche. Il est vraisemblable que l'hypothèse des multiples voies de réarrangement proposée ci-dessus pour expliquer la variation du (ou des) temps de retard de la (ou des) unité(s) de Kelvin avec la vitesse d'approche soit également valable pour comprendre la dépendance de la viscosité du piston seul.

5.2.4 Modélisation par un ressort, deux unités de Kelvin et un piston en série (RK_2P)

Pour confirmer que l'ajout d'un piston seul (en tant que cas particulier d'une unité de Kelvin) permet de définir un module de Young équivalent indépendant de la vitesse d'approche (aux fluctuations expérimentales près), nous donnons dans ce paragraphe les résultats du traitement des courbes de force en représentant le film par le modèle RK_2P (figure 5.2.4-1). L'examen de la figure 5.2.4-1a montre que le module équivalent ne révèle pas de dérive systématique avec la vitesse d'approche, mais seulement des fluctuations autour de la valeur moyenne (333 ± 61 kPa). Qualitativement on aboutit donc au même résultat qu'avec le modèle RK_1P, c'est-à-dire que l'on peut attribuer au film une valeur caractérisant sa dureté. On peut toutefois noter que l'estimation du module équivalent (333 kPa) est sensiblement différente de celle issue du modèle RK_1P (511 kPa). L'ajout d'une unité de Kelvin introduit deux paramètres libres supplémentaires (τ_3, E_3) dans l'analyse. Ces paramètres permettent un meilleur ajustement de la courbe de force modélisée à la courbe de force expérimentale, ce qui se traduit par une estimation en principe affinée du module équivalent. Dans ces conditions, il nous a paru judicieux d'examiner la conséquence de l'ajout d'une troisième unité de Kelvin (modèle RK_3P).

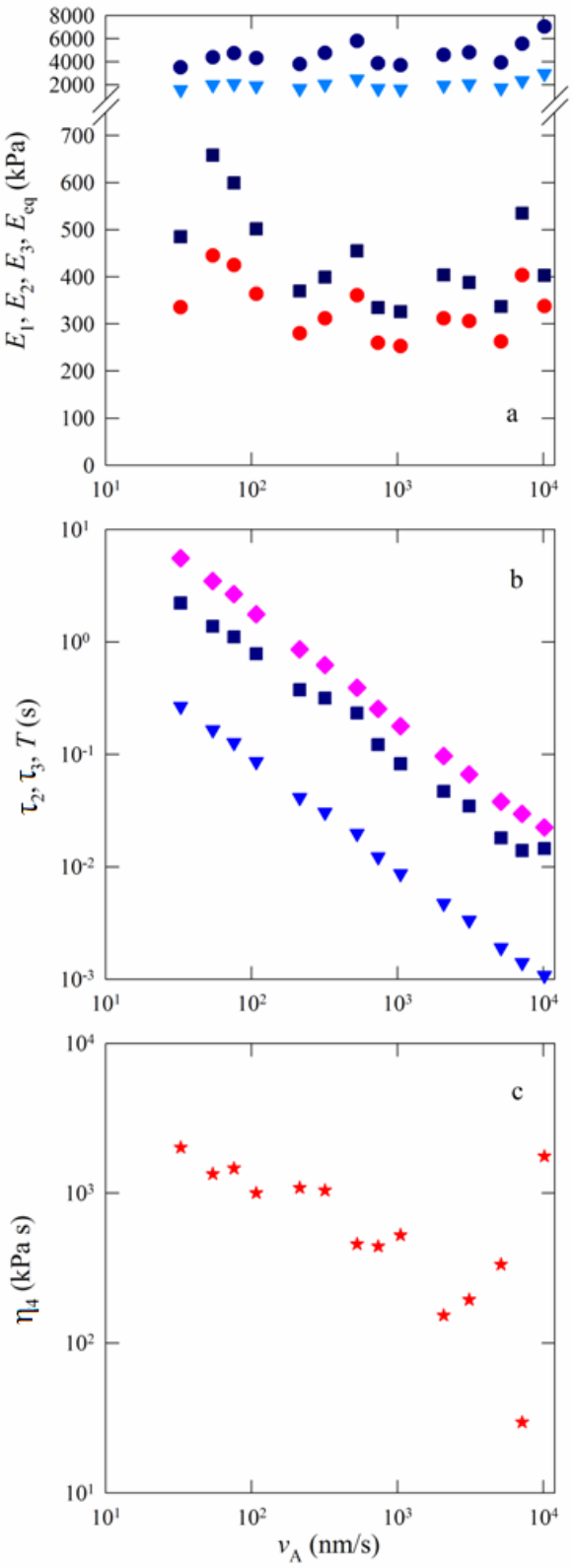


Figure 5.2.4-1 Représentation des modules et des temps de retard en fonction de la vitesse d'approche pour le modèle RK_2P.

Modules de Young du ressort E_1 (disques bleus), des unités de Kelvin E_2 (triangles bleus) et E_3 (carrés bleus), et équivalent E_{eq} (disques rouges) (a). Temps d'observation T (losanges roses), et temps de retard des unités de Kelvin τ_2 (triangles bleus) et τ_3 (carrés bleus) (b). Viscosité du piston η_4 (étoiles rouges) (c). v_A représente la vitesse d'approche.

Le module équivalent obtenu à l'aide du modèle RK_3P vaut 324 ± 110 kPa. Pour des raisons de temps de calcul nous n'avons pas poursuivi en testant le modèle RK_4P. Cependant, comme le suggère la figure 5.2.4-2, la diminution de E_{eq} engendrée par l'ajout de la troisième unité de Kelvin est faible par rapport à celle provoquée par l'ajout de la deuxième. Ceci permet de supposer que le modèle RK_2P donne le bon ordre de grandeur du module équivalent et peut être conservé pour le traitement de l'ensemble des films.

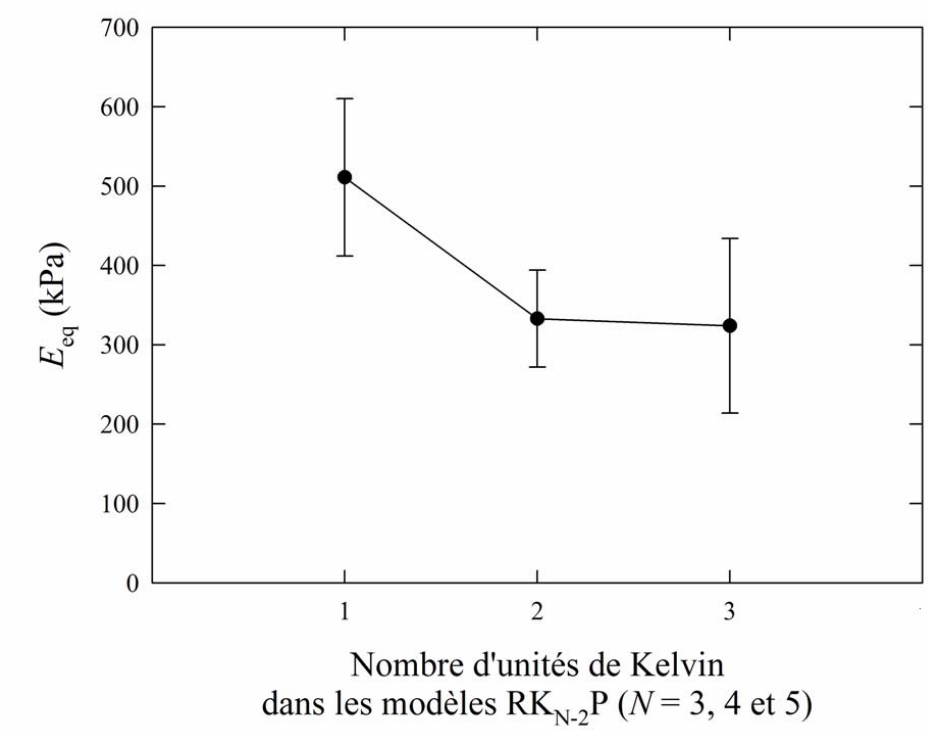


Figure 5.2.4-2 Evolution du module de Young équivalent E_{eq} suivant le modèle de matériau.

5.3 Modélisation viscoélastique des films $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$-PSS

5.3.1 Représentation des films par le modèle RK_2P

La représentation du film par le modèle RK_2P a été adoptée pour analyser les courbes de force mesurées sur l'ensemble des films $(PSS/PAH)_n$-PSS que nous avons construits. Bien qu'il eût sans doute été souhaitable de vérifier pour tous les films que les modèles RK_3P, voire RK_4P, n'eussent pas conduit à une estimation plus précise du module de Young équivalent, nous posons l'hypothèse que cette analyse permet au moins de comparer les films entre eux.

Le film $n = 0$ est un cas particulier dans cette suite de films car, surtout pendant la phase de retrait, on observe l'adhésion de la sonde au film, d'autant plus marquée que la vitesse de l'actuateur piézoélectrique est réduite. Il est donc possible que l'adhésion favorise la pénétration de la sonde dans le film pendant l'approche et biaise ainsi notre analyse. La valeur du module de Young équivalent doit donc être considérée avec quelque réserve.

Les estimations obtenues pour l'ensemble des films sont données dans le tableau 5.3.1-1 (voir aussi les figures 5.4-1 et 5.4-2). Malgré les incertitudes relativement élevées, il apparaît que l'adsorption successive de PSS et de PAH sur le film $(PLL/HA)_{24}$ provoque le durcissement du film au moins jusqu'au dépôt de la douzième paire (PSS/PAH) (figure 5.4-1). L'évolution ultérieure est moins nette. On peut aussi bien suggérer que le durcissement se poursuit qu'imaginer qu'il atteint un plateau. La figure 5.4-2, où le module équivalent est représenté sur une échelle logarithmique, pourrait mettre en évidence trois zones de durcissement relatif. Une augmentation rapide de la rigidité s'opérerait au cours des premiers dépôts ($n = 1$ et 2). De $n = 4$ à $n = 12$, l'effet relatif de l'apport de PSS et de PAH s'atténuerait progressivement. A partir de $n = 15$, on pourrait admettre que le film a atteint sa rigidité maximale. Cette analyse serait compatible avec la pénétration partielle de PSS dans le film $(PLL/HA)_{24}$ au cours des premières expositions au PSS et l'édification simultanée d'une barrière (PSS/PAH) à la surface de l'architecture. Cette dernière rendrait la pénétration de PSS de plus en plus difficile et conduirait d'abord au ralentissement de l'augmentation relative du durcissement puis au plateau de dureté.

n	E_{eq} (kPa)	domaine de vitesse d'approche (nm/s)	vitesses omises ou ne conduisant pas à une solution physique (nm/s)
0	3,3 ± 1,9	100 - 10000	500, 2000
1	8,9 ± 2,4	10 - 7000	
2	76 ± 20	10 - 10000	
4	143 ± 23	100 - 3000	
6	197 ± 22	30 - 7000	
8	333 ± 61	30 - 10000	
12	424 ± 105	20 - 10000	7000
15	813 ± 192	30 - 10000	
18	681 ± 257	30 - 10000	70, 100, 5000, 7000, 10000
24	889 ± 258	20 - 3000	100, 200, 500, 700, 2000

Tableau 5.3.1-1 Evolution du module E_{eq} en fonction du nombre *n* de dépôt (PSS/PAH).
Récapitulation des modules de Young équivalents des films $(HA/PLL)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$-PSS, déduits de l'analyse des courbes de force en représentant ces films par le modèle de matériau RK_2P. Pour chaque film on donne la moyenne des modules obtenus vitesse d'approche par vitesse d'approche et l'écart type. Ces résultats sont représentés sur les figures 5.4-1 et 5.4-2.

5.3.2 Analyse des courbes de force mesurées sur le film $(PSS/PAH)_{210}$-PSS

Le traitement des courbes de force mesurées sur le film $(PSS/PAH)_{210}$-PSS s'est révélé assez délicat en raison de la difficulté à localiser le point de contact sonde-film. Le traitement, en représentant le film par le modèle RK_2P, ne donne aucune solution physique, ce qui signifie que le modèle comporte trop de paramètres et que l'un d'eux au moins est négatif à toutes les vitesses. Ceci n'est pas très surprenant dans la mesure où l'analyse de ces courbes de force au chapitre 3 avait suggéré que ce film était essentiellement élastique. Nous avons donc, ici, réduit le modèle de matériau à un seul ressort (cas limite d'une seule unité de Kelvin sans viscosité). Le module de Young ainsi obtenu ne révèle en effet pas de dérive systématique avec la vitesse d'approche. Sa valeur moyenne s'établit à 519 ± 367 kPa (figures

5.4-1 et 5.4-2). L'incertitude est grande malgré l'élimination des courbes où le point de contact était le plus difficilement identifiable. Néanmoins, on retrouve une valeur comparable à celle indiquée dans le chapitre 3, soit 535 ± 188 kPa.

5.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons analysé les courbes de force mesurées sur les films $(HA/PLL)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$-PSS, en tentant compte de leur caractère viscoélastique. Cette étude a été motivée par le constat, rapporté au chapitre 4, que le module de Young de ces films dépendait de la vitesse d'approche de la sonde quand le modèle ne comportait qu'un élément élastique. Un modèle de matériau constitué d'un ressort, de deux unités de Kelvin et d'un piston a permis d'attribuer au module de Young de chacun de ces films une valeur indépendante de la vitesse de sondage. Nous avons ainsi pu comparer ces films entre eux et montré que l'adsorption successive de paires (PSS/PAH) provoquait leur durcissement.

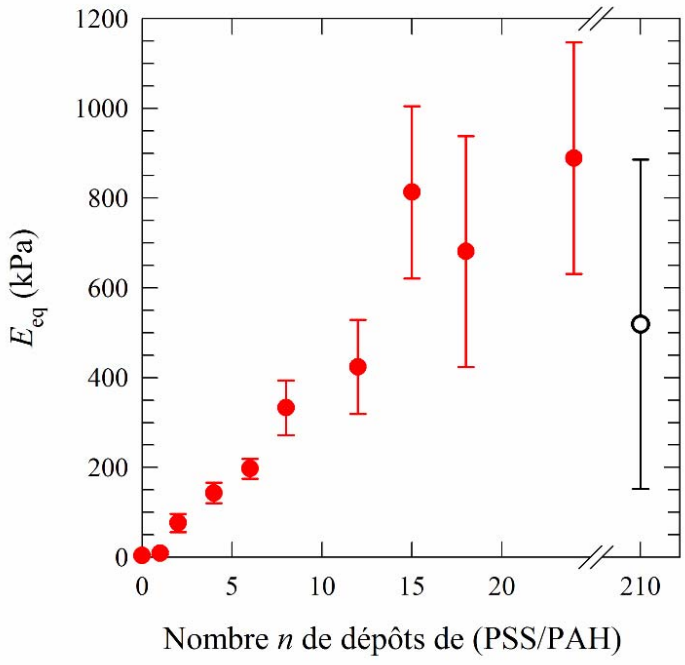


Figure 5.4 -1 Représentation du module de Young en fonction de *n* (échelle linéaire).
Module de Young équivalent des films $(HA/PLL)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$-PSS pour n = 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 15, 18 et 24 (disques rouges). La donnée placée à n = 210 correspond au film $(PSS/PAH)_{210}$-PSS (cercle noir).

Toutefois, les résultats obtenus ne permettent pas d'affirmer avec certitude que le module tendait vers un plateau à partir d'un certain nombre de dépôts de (PSS/PAH) dans le domaine que nous avons exploré ($n \leq 24$). Pour cette raison, il était intéressant de disposer de la mesure complémentaire du module d'un film construit avec PSS et PAH exclusivement. Compte tenu de ce résultat, il est vraisemblable que la dureté maximale d'un film $(HA/PLL)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$-PSS, construit en présence de NaCl à 0,15 M, est atteinte à partir d'environ 15 dépôts de (PSS/PAH) et se situe dans l'intervalle 600-800 kPa (figures 5.4-1 et 5.4-2).

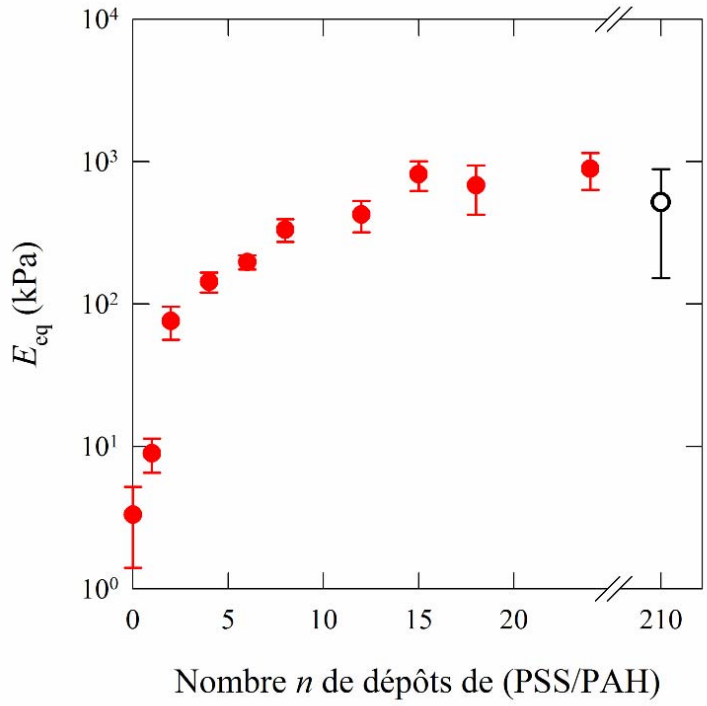


Figure 5.4 -2 Représentation du module de Young en fonction de *n* (échelle logarithmique).
Mêmes valeurs du module équivalent que dans la figure 5.4-1, mais représentées sur une échelle logarithmique.

Cependant, différentes questions restent ouvertes à l'issue de cette étude en grande partie exploratoire. Il serait intéressant de reprendre l'analyse des films (PLL/HA) réticulés (chapitre 3) avec le même type de modèle. Serait-il également possible d'obtenir un module indépendant de la vitesse ? Devrait-on supprimer le piston du modèle RK_2P sachant qu'en principe un film réticulé ne présente pas de fluage permanent ? Enfin, quel que soit le film considéré, nous envisageons de représenter le matériau par un train de plusieurs dizaines d'unités de Kelvin. Chaque unité serait caractérisée par un temps de retard propre et proche de celui de ses deux voisines, et l'ensemble permettrait de décrire le matériau par un spectre des temps de retard (« peigne de Dirac ») se rapprochant d'un spectre continu. Chaque temps serait pondéré par l'inverse du module de Young de l'unité de Kelvin. Une étude préliminaire

que nous avons réalisée a permis de montrer la faisabilité d'une telle approche. Cependant, elle mérite d'être approfondie puisqu'elle a conduit à un module équivalent non indépendant de la vitesse d'approche.

Enfin, le caractère éventuellement non linéaire des films, au-delà d'une certaine indentation, devrait être examiné. Cette problématique est à placer dans la perspective de l'application de la modélisation, notamment viscoélastique, proposée dans ce mémoire à la mesure du module de Young de cellules biologiques[111, 120, 125, 126, 263-269], ou de tendons[270-272].

Chapitre 6 : Caractérisation de films à base de mélanges de polyanions

Caractérisation de films à base de mélanges de polyanions

6.1 Etude des films par QCM-D et analyse morphologique 192

6.1.1 Construction des films (PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])$_n$ 192
6.1.2 Evolution de l'épaisseur des films (PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])$_n$ 194

6.2 Etude de la composition chimique et des propriétés mécaniques 197

6.2.1 Etude de la composition des films par spectroscopie infrarouge 197
6.2.2 Etude des propriétés mécaniques 202

6.3 Conclusion 204

6.3.1 Compétition entre HA et PSS 204
6.3.2 Propriétés mécaniques 205

Le dépôt des films multicouches[8-10, 273, 274] de polyélectrolytes sur des surfaces chargées est une méthode très simple permettant de contrôler les propriétés de ces surfaces. Cette méthode est maintenant largement répandue et employée pour des applications en électrophorèse[99], dans le domaine de la micro-électronique[275, 276],en optique[132, 277], dans le domaine des biomatériaux[26, 96, 97, 249, 261, 278], pour la libération progressive de molécules actives[253, 279] et dans l'élaboration de membranes spécifiques ou sélectives[280]. Le contrôle des propriétés physico-chimiques de ces films, comme leur épaisseur, leur perméabilité et leurs propriétés mécaniques est un enjeu majeur en vue de nouvelles applications.

Ces propriétés peuvent être modulées en modifiant les conditions physico-chimiques pendant la construction, comme la force ionique[181] ou le pH de la solution quand au moins l'un des polyélectrolytes utilisés est un polyélectrolyte faible[80]. D'autres paramètres tels que la masse moléculaire[281], la densité linéaire de charge du polyélectrolyte[282, 283] et la température[284-286] permettent également de contrôler les différentes propriétés du film.

L'utilisation d'une solution contenant un mélange de différents polyélectrolytes de même signe constitue une nouvelle possibilité de contrôler les propriétés des films multicouches. Ces films peuvent être constitués de couches alternées obtenues par adsorption d'un mélange de différents polyanions et d'un seul polycation[287-293]. Dans ce cas, un nouveau paramètre peut être modulé : la fraction massique (ou molaire) de chaque polyélectrolyte présent dans la solution contenant le mélange de polyélectrolytes. Dans de nombreux systèmes, il a été démontré que l'un des polyélectrolytes du mélange était incorporé préférentiellement à l'autre dans le film. En d'autres termes, sa fraction molaire dans le film était plus élevée que dans la solution employée pour construire le film. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a permis de montrer que dans un film construit à partir d'un mélange de poly acide L-glutamique (PGA) et de poly acide L-aspartique (Pasp) de masses moléculaires proches, et de poly-L-lysine (PLL), l'incorporation du Pasp est favorisée par rapport à celle du PGA[285]. Cependant, la conformation moyenne des chaînes de polymères dans le film est plus proche de celle observée pour un film (PGA/PLL), riche en feuillets β, que pour un film (Pasp-PLL), qui est riche en hélices α. Ces résultats sont surprenants *a priori* parce que les chaînes latérales de PGA et de Pasp diffèrent seulement par un groupement méthylène et leurs pKa sont légèrement différents (4,5 et 5,5 pour PGA et Pasp, respectivement).

Caruso *et al.* ont également observé, dans le cas de solutions contenant un mélange de poly-4-styrène sulfonate (PSS) et d'acide désoxyribonucléique (ADN), que PSS était incorporé préférentiellement à l'ADN lors de la construction d'un film $(PAH/[PSS/ADN])_n$[289]. Ils ont aussi montré que l'incorporation de l'ADN était favorisée par rapport à celle du PSS si l'on ajoutait de l'éthanol dans les solutions de polyélectrolytes utilisées pour réaliser les constructions. En utilisant un mélange de poly (4-vinyle pyridine) (P4VP) et de PAH lors de la construction de films $(PAA/[PAH/P4VP])_n$, le P4VP est aussi incorporé préférentiellement au PAH dans le film. Dans toutes ces études, on a constaté que l'épaisseur du film ou la masse déposée par unité de surface (calculée à partir de la valeur de l'absorbance obtenue par spectroscopie UV) était une fonction monotone de la fraction massique (ou molaire) d'un des composants du mélange de polyélectrolytes,

L'étude des propriétés des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$ (où *x* est la fraction molaire en monomères de HA présents en solution) devrait nous permettre de savoir dans quelle mesure les propriétés de l'architecture mixte sont liées aux propriétés des films construits à partir de chaque composant pur. Deux hypothèses peuvent être envisagées :

- les propriétés du film en termes d'épaisseur ou de morphologie sont une combinaison linéaire des propriétés correspondantes à chacun des films purs,
- les propriétés du film ne sont pas une fonction monotone de la composition du mélange de polyanions ou de polycations utilisée pour effectuer la construction couche par couche.

A priori, la première hypothèse est à privilégier quand les deux polyélectrolytes présents dans le mélange sont de nature chimique proche. Dans le cadre de la seconde hypothèse, plusieurs phénomènes tels que les processus d'échanges[239], de compétition entre polyélectrolytes[294] ou de déconstruction du film [216] peuvent fortement influencer les propriétés du film obtenu [254].

Les travaux présentés dans ce chapitre sont consacrés à l'étude des propriétés mécaniques, à l'évolution de l'épaisseur, à la morphologie et à la composition interne de films du type $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$, en fonction de la fraction massique, *x*, de HA en solution et de la fraction massique, ρ, de HA dans le film. Les propriétés physico-chimiques des films (PLL/HA)[12, 14] et (PLL/PSS)[238] sont très bien décrites dans la littérature. Pour une concentration en NaCl de 150 mM, les deux combinaisons de polyélectrolytes, PLL-PSS et PLL-HA conduisent à une croissance exponentielle de l'épaisseur des films avec le nombre de bicouches déposées. Toutefois, l'épaisseur atteinte après le dépôt de *n* bicouches est plus élevée dans le cas de la combinaison PLL-HA.

La présente étude porte sur l'architecture des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$ construits par nébulisation[71, 72, 141]. Les films obtenus par cette méthode de dépôt ont été comparés à ceux obtenus par la méthode traditionnelle (trempage) consistant à immerger le substrat alternativement dans la solution de polycations et dans la solution de polyanions. Dans le cas de l'adsorption à partir de solutions aqueuses, l'évolution de l'épaisseur des films en fonction du nombre d'étapes de dépôt a été étudiée par microbalance à cristal de quartz. L'étude de la morphologie a été réalisée par AFM et la composition chimique par spectroscopie infrarouge. Dans le cas des films déposés par nébulisation, les mesures d'épaisseur ont été effectuées par ellipsométrie et les valeurs obtenues ont été confrontées à celles obtenues par AFM sur des films ayant subi une rayure. Nous avons également étudié par la technique de nanoindentation[37, 41, 49](sous-chapitres 2.2 et chapitre 3), l'évolution du module de Young en fonction de la composition des solutions utilisées lors de la construction afin d'établir une corrélation entre les propriétés mécaniques et la composition chimique de ces films.

6.1 Etude des films par QCM-D et analyse morphologique

Avant de déposer les films par nébulisation, nous avons étudié par QCM-D la croissance des films à base de mélanges de polyanions (PLL/[HA_x/PSS_{1-x}]) (où *x* est la fraction molaire du hyaluronane dans la solution). Par la suite, nous avons déterminé la concentration des différents constituants dans le film (PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])$_n$ en fonction de la fraction molaire, *x*, et de la fraction massique, *X*, du hyaluronane en solution par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée.

6.1.1 Construction des films (PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])$_n$

La croissance des films (PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])$_n$ a été étudiée par QCM-D selon les protocoles décrits dans le chapitre 2.4. Nous avons construit cinq films comportant chacun n = 18 paires de couches (tableau 6.1-1), puis contrôlé les épaisseurs finales par imagerie AFM directement à la surface des cristaux de QCM-D.

X	0	0,90	0,95	0,97	1
Concentration massique de la PLL (mg/mL)	1	1	1	1	1
Concentration massique du PSS (mg/mL)	0,5	0,05	0,025	0,015	0
Concentration massique du HA (mg/mL)	0	0,90	0,95	0,97	1

Tableau 6.1.1-1 Concentrations des polyélectrolytes en solution.
Les concentrations notées dans ce tableau ont été utilisées pour les expériences de QCM-D et d'infrarouge.

Le traitement des décalages des fréquences de résonance et des dissipations mesurés par QCM-D montre que l'épaisseur des films (PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])$_{18}$ correspondant à $0,9 \leq x \leq 0,97$ est inférieure à celles des films (PLL/PSS)$_{18}$ et (PLL/HA)$_{18}$ (figure 6.1.1-1), si on admet

que la courbe correspondant à la construction de (PLL/HA) reste une fonction croissante jusqu'à n = 18. D'autres études réalisées au laboratoire montrent que la construction de films HA-PLL peut être poursuivie jusqu'à au moins 60 paires de couches (figure 6.1.1-1).

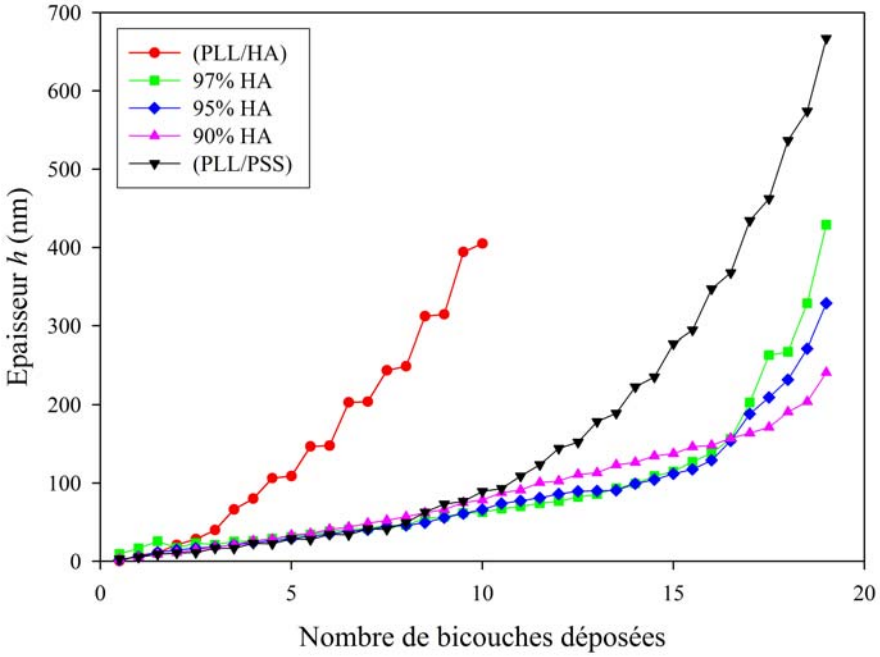


Figure 6.1.1-1 Evolution des épaisseurs des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$.
Les épaisseurs des films ont été calculées à l'aide du modèle de Voight[161] (cf. sous chapitre 2.4) à partir des expériences de QCM-D.

Ces résultats sont assez surprenants compte tenu de la faible teneur en PSS de la solution de polyanions. Ils suggèrent que la construction de ces films est fortement influencée par le PSS, même quand ce polyanion est largement minoritaire en solution. Par ailleurs, on peut supposer que des phénomènes liés à la plus grande affinité de la PLL pour le PSS induisent une incorporation plus favorable du PSS dans le film au détriment du HA. Ainsi, la croissance des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{18}$ pour $x < 0{,}95$ est proche de celle observée pour (PLL/PSS) alors que pour $x > 0{,}95$ la cinétique de construction se rapproche de celle d'un film (PLL/HA). Cependant, on peut noter que la croissance exponentielle pour $x > 0{,}95$ est retardée jusqu'à n = 15.

6.1.2 Evolution de l'épaisseur des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$

L'évolution de l'épaisseur des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$ a été étudiée pour n = 12, valeur pour laquelle les expériences de spectroscopie infrarouge en mode réflexion totale atténuée ont été effectuées. Ces films ont été construits par la méthode de nébulisation décrite dans le chapitre 2. Les épaisseurs ont été mesurées par ellipsométrie et par AFM, après séchage des films sous jet d'azote.

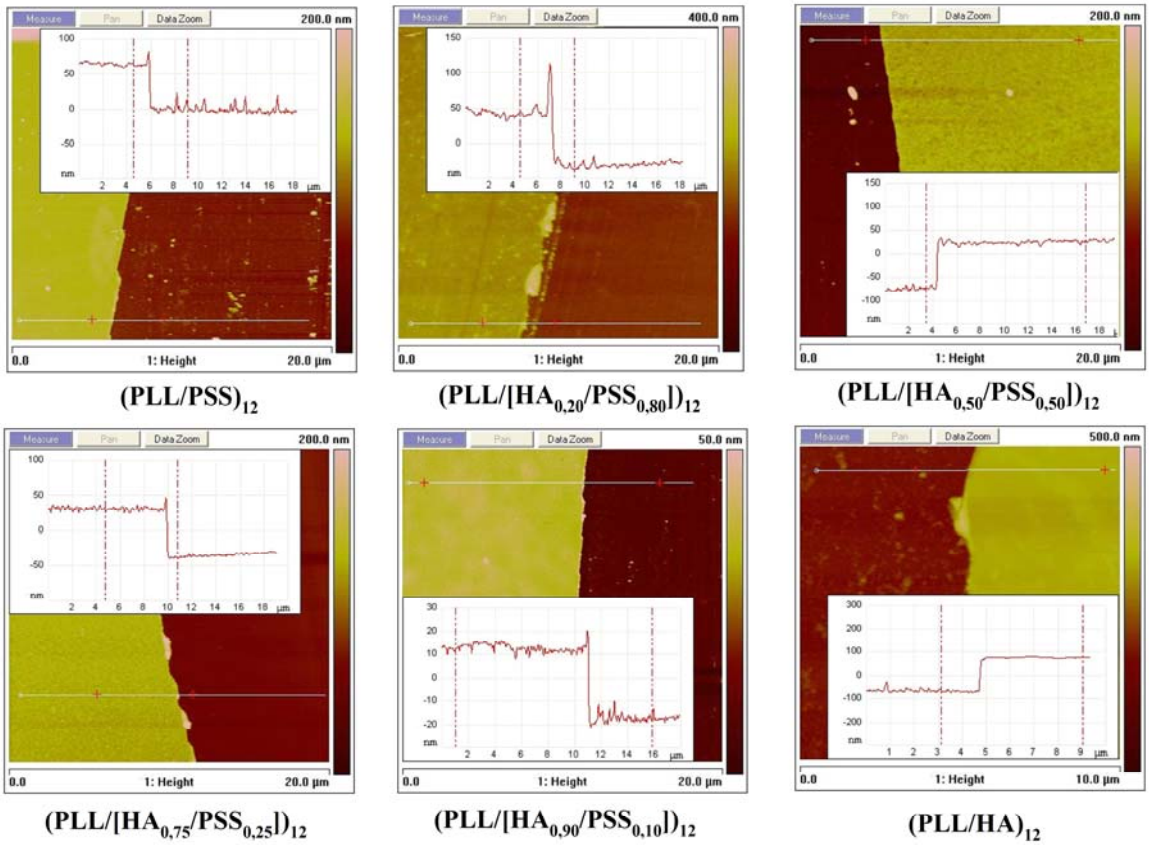


Figure 6.1.2-1 Images topographiques (AFM) des régions des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{12}$ rainurées.

La figure 6.1.2-1 montre les profils d'épaisseur des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{12}$ construits par la méthode de nébulisation pour $0 \leq x \leq 1$. Les images et les profils obtenus mettent en évidence que les films sont bien formés et continus lorsque 12 paires de couches ont été déposées. Ceci est vrai quelle que soit la composition du mélange $[HA_x/PSS_{1-x}]$ utilisée. Par ailleurs, elles confirment l'évolution de l'épaisseur des films, dont la mesure a été calculée par QCM-D et par AFM. En effet, l'épaisseur des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{12}$ est inférieure à celle d'un film $(PLL/PSS)_{12}$ pour $x < 0{,}95$ et converge vers une épaisseur proche de celle d'un film $(PLL/HA)_{12}$ pour $x > 0{,}95$ (figure 6.1.2-2). Ce résultat est confirmé par les mesures d'ellipsométrie sur les films obtenus par nébulisation alternée des solutions de

mélanges [HA_x/PSS_{1-x}] et de la solution de PLL (figure 6.1.2-2). Les épaisseurs mesurées par ellipsométrie sont effectivement très proches de celles déduites des profils d'épaisseur mesurés par AFM.

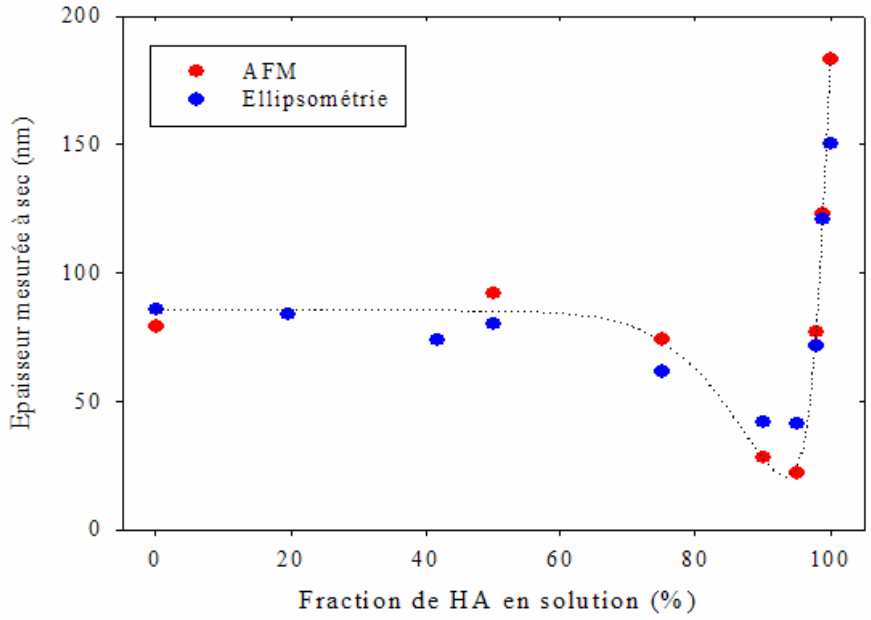


Figure 6.1.2-2 Variations de l'épaisseur des films (PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])$_{12}$.
Les films sont obtenus par nébulisation alternée de la solution de PLL et des mélanges [HA_x/PSS_{1-x}]. Les épaisseurs ont été mesurées par AFM et ellipsométrie en fonction de la fraction molaire de HA dans la solution de polyanions (cf. annexe 3).

On remarque aussi que la variation de l'épaisseur des films (PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])$_{12}$ présente un minimum pour $x \approx 0{,}95$. Cette valeur particulière de la fraction massique du HA en solution correspond à une fraction massique de l'ordre de 0,50 dans le film (figure 6.2.2-5). Cela signifie que le film le plus mince, c'est-à-dire (PLL/[$HA_{0,95}/PSS_{0,05}$])$_{12}$, contient des masses égales de HA et de PSS. On observe également que l'épaisseur des films (PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])$_{12}$ présente un plateau pour $0 \leq x \leq 0{,}70$. Dans cette région du diagramme de phase, la quantité de HA incorporée dans le film augmente très lentement alors que la quantité de PSS est largement majoritaire (Figure 6.1.2-3). Cette zone correspond à une prédominance du PSS dans le film, alors que la zone délimitée par $0{,}70 \leq x \leq 0{,}97$ représente une zone de transition où la quantité de PSS incorporé dans le film diminue plus rapidement. Enfin, la zone définie par $0{,}97 \leq x \leq 1$ correspond à la zone de prédominance du HA dans les films (PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])$_{12}$.

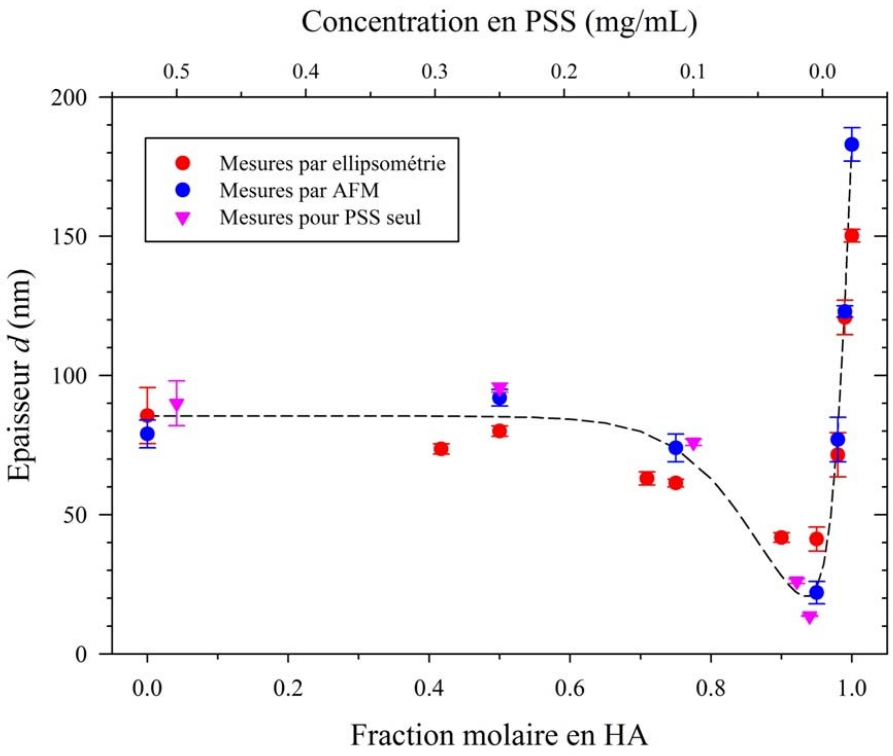


Figure 6.1.2-3 Variations de l'épaisseur des films (PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])$_{12}$ et du film (PLL/PSS) à concentration en PSS variable.

Les films sont obtenus par nébulisation alternée et les épaisseurs ont été mesurées par AFM et ellipsométrie en fonction de la fraction molaire de HA et de la concentration en PSS dans la solution de polyanions (cf. annexe 3)

La présence de zones de prédominance de chacun des polyanions présents en solution peut s'expliquer par la différence d'affinité entre d'une part, la PLL vis-à-vis du PSS et d'autre part de celle existant entre la PLL et le HA. L'affinité pour le PSS étant beaucoup plus importante, ce polyanion est incorporé de manière préférentielle dans le film même quand il est minoritaire en solution. Cette affirmation est corroborée par l'évolution de l'épaisseur d'un film (PLL/PSS) en fonction de la concentration du PSS en solution. La courbe mesurée dans ce cas précis se superpose à la courbe obtenue pour les mélanges pour une fraction molaire en HA comprise entre 0 et 0,95. Cela revient à dire que jusqu'à une fraction molaire de HA en solution de l'ordre de 0,95, ce sont les interactions entre la PLL et le PSS qui dominent la construction du film. Au-delà de cette concentration, les interactions avec le PSS sont suffisamment faibles pour que l'incorporation du HA soit privilégié d'où la présence d'un minimum d'épaisseur pour $x \approx 0{,}95$.

6.2 Etude de la composition chimique et des propriétés mécaniques

L'étude des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{12}$ par spectroscopie infrarouge a mis en évidence une plus grande affinité de la PLL pour le PSS que pour le HA. La suite de cette étude consiste d'une part à caractériser les propriétés mécaniques des films obtenus, et d'autre part à étudier leur morphologie en fonction de la fraction massique du HA en solution.

Les propriétés mécaniques des films ont été déterminées par la technique de nanoindentation. Les films comportant 24 paires de couches ont été construits à l'aide du robot par la méthode d'immersion alternée dans la solution de PLL et dans les mélanges $[HA_x/PSS_{1-x}]$. Les films utilisés pour l'étude morphologique ont été construits par la méthode de nébulisation.

6.2.1 Etude de la composition des films par spectroscopie infrarouge

L'étude de la composition chimique des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{18}$ est nécessaire pour savoir quel rôle joue le PSS dans la construction des films mixtes HA-PSS et sur leurs propriétés mécaniques et morphologiques. Nous avons eu recours à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée pour déterminer les proportions des polyélectrolytes dans les films.

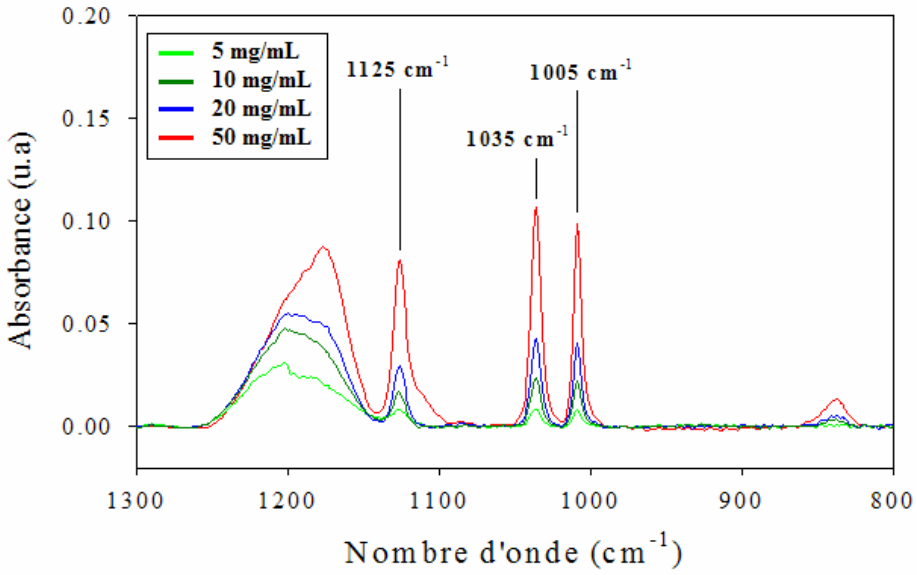


Figure 6.2.1-1 Spectres infrarouge de solutions de PSS à différentes concentrations massiques.

Les mesures ont été effectuées sur les différents films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{18}$ en suivant le protocole décrit dans le chapitre 2.3. Les films ont été construits *in situ* dans les mêmes conditions que celles qui ont été fixées pour la microbalance à cristal de quartz.

Nous avons d'abord déterminé une courbe d'étalonnage pour calculer la concentration en fonction de l'absorbance. Pour cela, nous avons mesuré l'absorbance des solutions de polyélectrolytes purs en fonction de leurs concentrations massiques, déterminées par pesée (figure 6.2.1-1).

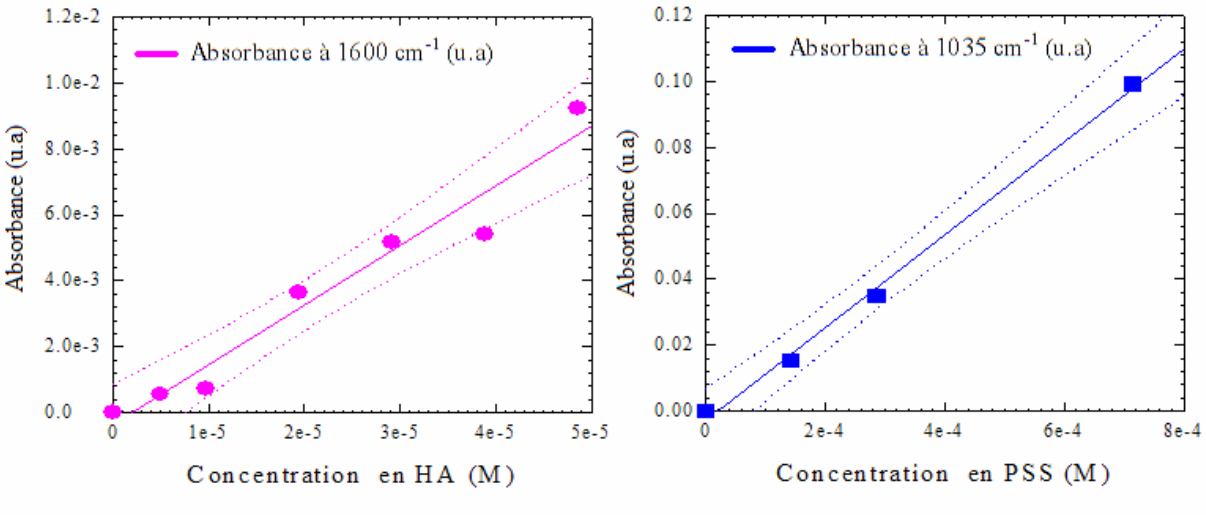


Figure 6.2.1-2 Courbe d'étalonnage pour le HA (1600 cm^{-1}) et pour le PSS (1035 cm^{-1}).
Les courbes en trait plein correspondent à la droite obtenue par régression linéaire et les courbes en pointillés correspondent à la limite des intervalles de confiance à 95%.

Les valeurs des absorbances nous ont permis de déterminer le coefficient d'extinction moléculaire des polyélectrolytes à une longueur d'onde donnée. Ces valeurs ont été déterminées pour le HA à 1600 cm^{-1} et pour le PSS à 1035 cm^{-1} et correspondent aux pentes des courbes d'étalonnage (figure 6.2.1-2). Les valeurs obtenues sont consignées dans le tableau 6.2.1-1.

A partir de la loi de Beer-Lambert et des coefficients d'absorption que nous avons déterminés, il sera possible de calculer les concentrations molaires des polyélectrolytes dans toute l'épaisseur de solution sondée par l'onde évanescente (sous-chapitre 2.3). Par la suite, on pourra comparer les concentrations molaires des polyélectrolytes en solution et dans le film afin d'évaluer le degré d'incorporation relatif de chacun des polyanions.

Polyélectrolytes	Coefficients d'absorbance ε.*l*	Coefficients *a*
HA	190 $mol^{-1}.L$	$5{,}3.10^{-3}$ $mol.L^{-1}$
PSS	105 $mol^{-1}.L$	$9{,}5.10^{-3}$ $mol.L^{-1}$

Tableau 6.2.1-1 Valeurs des coefficients d'extinction moléculaire des polyanions utilisés dans cette étude.
Les valeurs inscrites dans ce tableau ont été déduites des courbes d'étalonnage présentées dans la figure 6.1.2-2

Nous avons ensuite mesuré les spectres infrarouges des films purs $(PLL/HA)_{18}$, $(PLL/PSS)_{18}$ et des différents mélanges $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{18}$ (annexe 3). Ces spectres présentent plusieurs bandes d'absorption caractéristiques de chacun des polyélectrolytes. Nous avons focalisé notre étude sur les pics de PSS à 1005 et 1035 cm^{-1} (vibrations d'élongation des groupements $-SO_3^-$), de la PLL à 1645 cm^{-1} (bande amide I) et du HA à 1600 cm^{-1} (vibrations d'élongation des groupements COO^-). Nous avons mesuré le spectre infrarouge des films après chaque rinçage de la surface avec une solution exempte de polyélectrolytes durant la construction *in situ* du film (figure 6.1.2-3). Les spectres infrarouges montrent que les films contiennent toujours du PSS, même pour de très faibles concentrations de ce polyélectrolyte en solution.

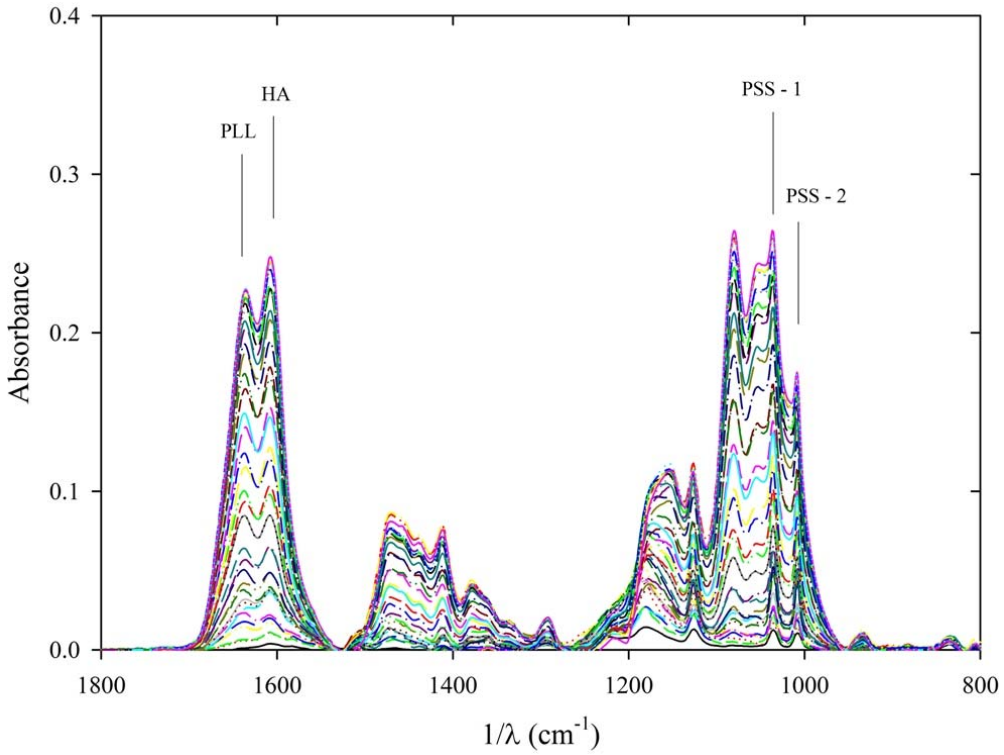


Figure 6.2.1-3 Spectre infrarouge d'un film $(PLL/[HA_{0,95}/PSS_{0,05}])_{18}$ au cours de sa construction.

L'évolution de l'absorbance d'un film $(PLL/[HA_{0,95}/PSS_{0,05}])_{18}$ en fonction du nombre de couches déposées (figures 6.2.1-3 et 6.2.1-4) montre que le PSS est incorporé dans le film tout au long de sa construction, dans des proportions importantes même lorsque la concentration de ce polyélectrolyte en solution est faible. Ce résultat est également obtenu pour d'autres compositions de la solution de polyanions et confirme que l'adsorption du PSS est privilégiée, autrement dit que l'interaction entre la PLL et le PSS est plus forte que celle entre la PLL et le HA.

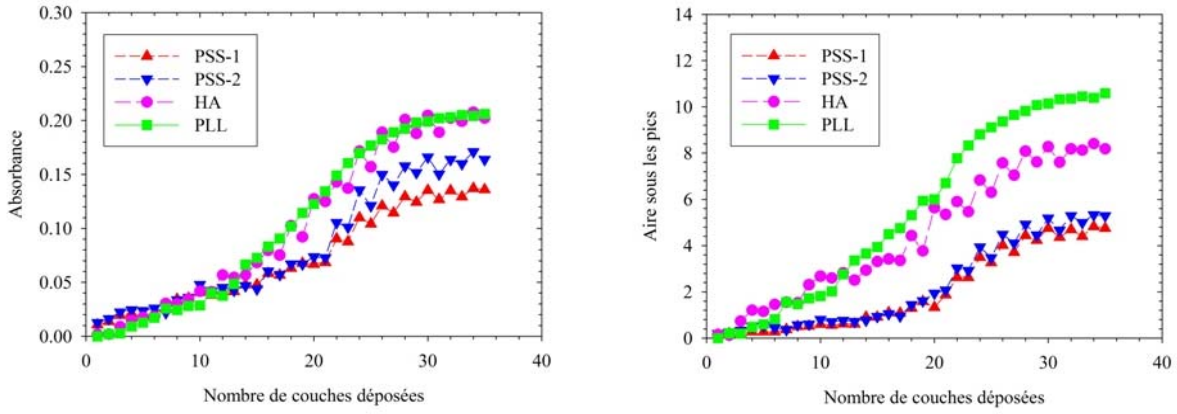


Figure 6.2.1-4 Evolution de l'absorbance des différents polyélectrolytes en fonction du nombre de dépôts pendant la construction du film $(PLL/[HA_{0,95}/PSS_{0,05}])_{18}$.

A partir des courbes identiques à celles de la Figure 6.2.1-4 pour d'autres compositions de la solution de polyanions, on peut tracer le diagramme de phase des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{18}$. Les fractions massiques des polyélectrolytes incorporés dans le film sont données par les relations suivantes :

$$\rho_{HA} = \frac{m_{HA}}{m_{HA} + m_{PSS}} \text{ et } \rho_{PSS} = \frac{m_{PSS}}{m_{HA} + m_{PSS}} \qquad (5.1\text{-}1)$$

De plus, les concentrations molaires C_{HA} et C_{PSS} peuvent se déduire des spectres infrarouges :

$$m_{HA} = C_{HA}\, M_{HA} \text{ et } m_{PSS} = C_{PSS}\, M_{PSS} \qquad (5.1\text{-}2)$$

où M_{HA} et M_{PSS} représentent les masses molaires respectives des monomères de HA et de PSS. En introduisant la relation 5.1-2 dans 5.1-1, les rapports massiques dans le film peuvent s'écrire :

$$\rho_{HA} = \frac{C_{HA}}{C_{HA} + \mu\, C_{PSS}} \text{ et } \rho_{PSS} = \frac{\mu\, C_{PSS}}{C_{HA} + \mu\, C_{PSS}} \qquad (5.1\text{-}3)$$

où $\mu = \frac{M_{PSS}}{M_{HA}} \approx 0{,}506$ est le rapport des masses molaires du PSS et du HA.

En utilisant les coefficients d'absorption $\varepsilon_{HA}.l$ et $\varepsilon_{PSS}.l$, la loi de Beer-Lambert et en posant $a_{HA} = (\varepsilon_{HA} \cdot l)^{-1}$ et $a_{PSS} = (\varepsilon_{PSS} \cdot l)^{-1}$, la relation précédente s'écrit :

$$\rho_{HA} = \frac{a_{HA}\ A_{HA}}{a_{HA}\ A_{HA} + \mu\ a_{PSS}\ A_{PSS}} \text{ et } \rho_{PSS} = \frac{\mu\ a_{PSS}\ A_{PSS}}{a_{HA}\ A_{HA} + \mu\ a_{PSS}\ A_{PSS}} \qquad (5.1\text{-}4)$$

où A_{HA} et A_{PSS} sont les absorbances dues au HA et au PSS. Les rapports peuvent alors se mettre sous la forme suivante :

$$\rho_{HA} = \frac{5{,}3.10^{-3}\ A_{HA}}{5{,}3.10^{-3}\ A_{HA} + 4{,}8.10^{-3}\ A_{PSS}} \text{ et } \rho_{PSS} = \frac{4{,}8.10^{-3}\ A_{PSS}}{5{,}3.10^{-3}\ A_{HA} + 4{,}8.10^{-3}\ A_{PSS}} \qquad (5.1\text{-}5)$$

Le diagramme de phase des films (PLL/[HA_x/PSS_{1-x}]) est obtenu en traçant les fractions massiques des polyélectrolytes dans le film, ρ_{HA} et ρ_{PSS}, en fonction des fractions massiques des polyélectrolytes en solution, X_{HA} ou X_{PSS} (figure 6.2.1-5).

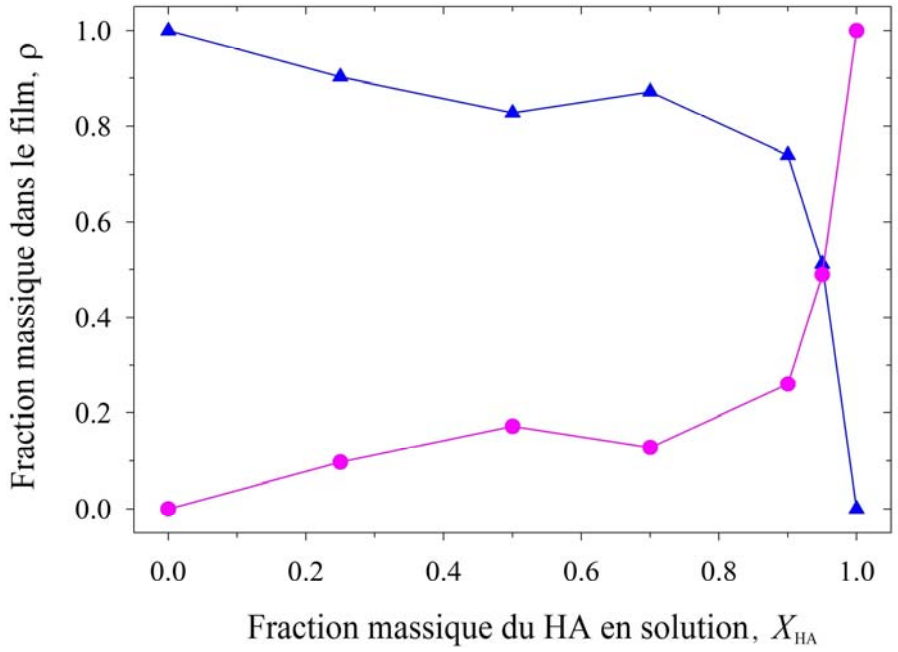


Figure 6.2.1-5 Diagramme de phase des films (PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])$_{12}$.
● *représente la fraction massique du HA et* ▲ *représente la fraction massique du PSS.*

Le diagramme de phase des films (PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])$_{12}$ présente deux régimes :

- le premier régime est caractérisé par une croissance lente de la fraction massique ρ_{HA} et une décroissance lente de la fraction massique ρ_{PSS} pour $0 \leq X_{HA} \leq 0{,}90$,
- le second régime est caractérisé par une croissance très rapide de la fraction massique ρ_{HA} et une décroissance très rapide de la fraction massique ρ_{PSS} pour $0{,}90 \leq X_{HA} \leq 1$.

On remarque que dans le premier régime, la fraction massique du PSS dans le film reste très élevée ($0{,}75 \leq \rho_{PSS} \leq 1$) pour des fractions massiques de HA en solution $X_{HA} \leq 0{,}90$.

Parallèlement, la fraction massique du HA dans le film croît très lentement et reste inférieure à 0,25 pour $X_{HA} \leq 0,90$. L'amorce du second régime est marqué par un point pour lequel les fractions massiques ρ_{PSS} et ρ_{HA} dans le film sont égales Ce point d'équiconcentration des deux polymères est obtenu pour une fraction massique en solution X_{HA} de l'ordre de 0,95.

6.2.2 Etude des propriétés mécaniques

Nous avons construit cinq films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{24}$, pour x = (0 ; 0,90 ; 0,95 ; 0,99 et 1) par la méthode d'immersion alternée, et déterminé leur module de Young par la technique de nanoindentation.

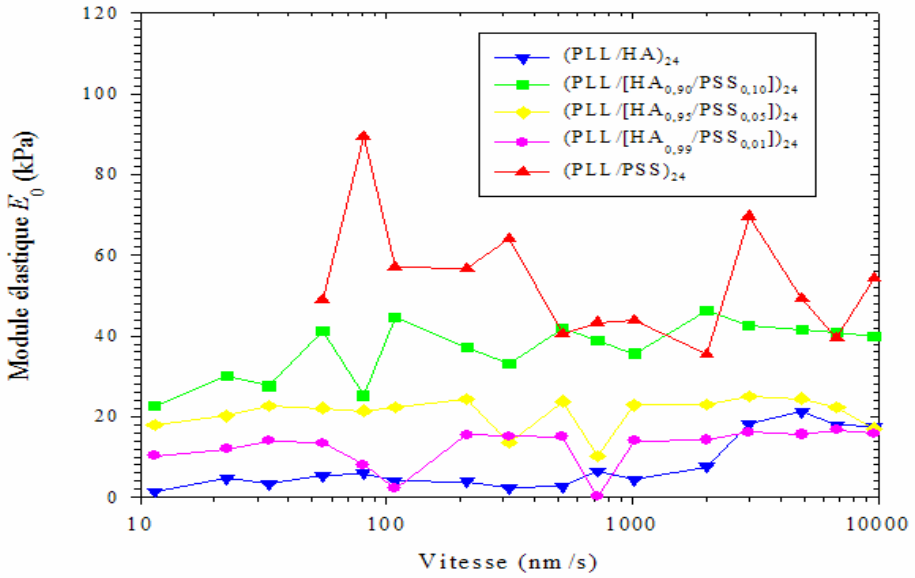


Figure 6.2.2-1 Modules élastiques des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{24}$ en fonction de la vitesse.

Le traitement des courbes de force pour des vitesses d'indentation comprises entre 10 et 10000 nm/s montre que ces films sont des matériaux dominés par leur composante élastique à l'exception du film $(PLL/HA)_{24}$ pour lequel nous avons montré dans le chapitre 3 qu'il s'agissait d'un matériau viscoélastique. On remarque que le module de Young des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{24}$ diminue quand x ou X_{HA} tend vers 1 (figure 6.2.2-2). De plus, les variations du module de Young en fonction de la fraction massique du HA en solution sont similaires à celles de la fraction massique du PSS dans le film (figure 6.2.2-1). Ces résultats suggèrent qu'il existe une corrélation entre le module de Young des films de type

$(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{24}$ et leur contenu en PSS. En effet, le module de Young des films augmente quand la quantité de PSS présent dans le film augmente.

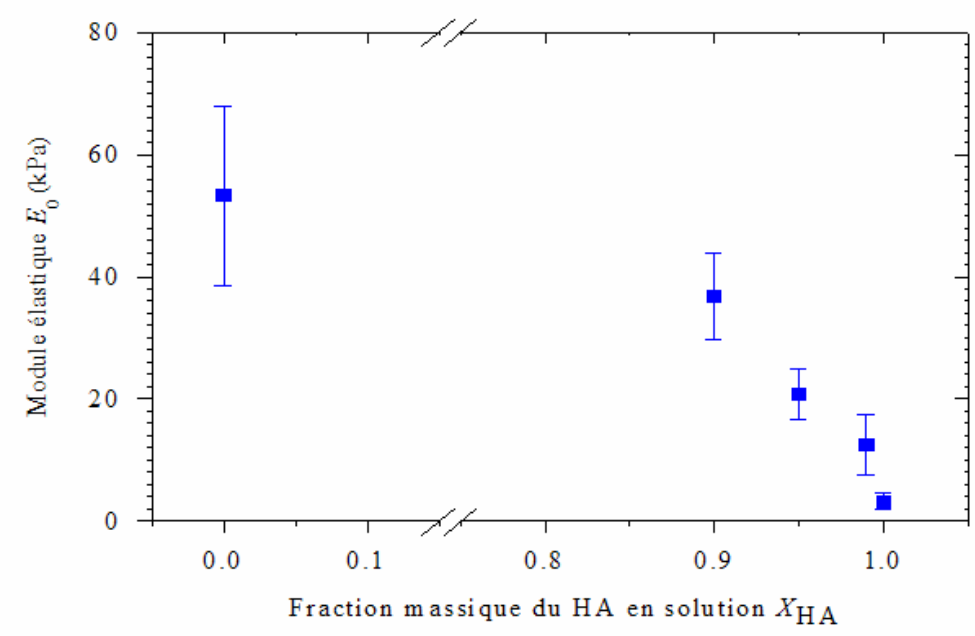


Figure 6.2.2-2 Variation du module de Young des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{24}$ en fonction de la fraction massique du HA en solution.

Outre les variations observées sur les propriétés mécaniques des films, on a également remarqué que l'épaisseur des films analysés par la technique de nanoindentation était très différente selon la fraction de PSS ajouté à la solution de polyanions. Dans le cas d'un film $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{24}$, l'épaisseur passe de 1,8 µm pour $x = 0,95$ à 2,8 µm pour $x = 0,90$ et à 4 µm pour $x = 0,99$. Au regard des résultats obtenus, l'étude de la morphologie et de la variation de l'épaisseur des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$ paraît nécessaire.

6.3 Conclusion

6.3.1 Compétition entre HA et PSS

Les études réalisées par spectroscopie infrarouge, par AFM et par ellipsométrie ont montré que les films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$ présentent une variation d'épaisseur non monotone, quelle que soit la méthode de dépôt (par immersion ou par nébulisation) utilisée. La présence d'un minimum d'épaisseur et d'un point de croisement des courbes de composition massique met en évidence une compétition entre le PSS et le HA lors de la construction des films. La figure 6.3.1-1 résume le comportement des deux polyanions lors de la construction de $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$.

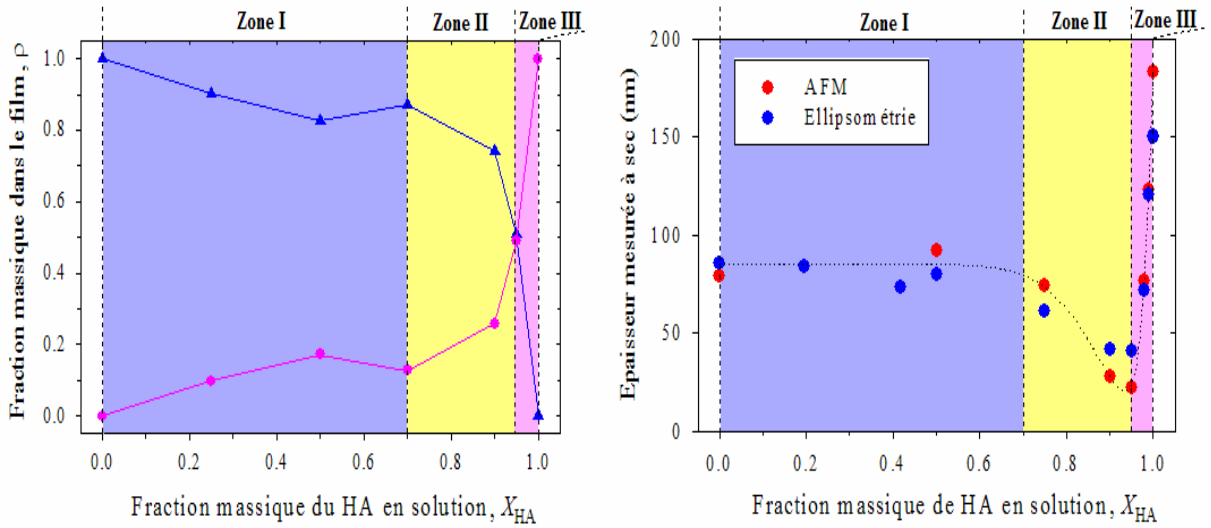


Figure 6.3.1-1 Zones de prédominance des polyanions et relation avec la variation de l'épaisseur des films pour des films comprenant 12 paires de couches.
● *correspond à la fraction massique du HA dans le film alors que* ▲ *correspond à la fraction massique du PSS dans le film.*

Ce comportement peut être décomposé en trois régimes :

- La zone I correspond à la zone de prédominance du PSS. Elle se caractérise par l'édification d'un film dont la structure est proche de celle de $(PLL/PSS)_n$. Cependant le film contient un peu de HA, cette quantité restant inférieure à 20% de la masse totale des polyanions présents dans le film. Dans cette zone du diagramme de phase, le HA constitue en quelque sorte une impureté.

- La zone II est une zone de transition caractérisée par le passage par un minimum de l'épaisseur du film. Ce minimum peut s'expliquer par le fait que la quantité de PSS disponible en solution diminue tandis que son incorporation est toujours privilégiée dans le film. Il en résulte que le film devient de plus en plus mince au fur et à mesure que la fraction de PSS diminue. Par conséquent, la fraction massique du PSS dans le film qui était supérieure à 80% chute brutalement. Pour des concentrations du PSS en solution encore plus faibles, c'est-à-dire quand le PSS est ultra minoritaire, ce sont les interactions avec le HA qui sont favorisées dans le film.
- La zone III correspond à la zone de prédominance du HA et se caractérise par l'édification d'un film dont la structure est proche de celle de $(PLL/HA)_n$. En effet, la quantité de PSS disponible et ses interactions avec la PLL sont trop faibles pour contre balancer la préférence de la PLL pour le HA. Par ailleurs, il subsiste une faible fraction de PSS dans le film (< 10% en masse), même quand la fraction de HA en solution atteint 99%. Dans ce cas, le PSS constitue une sorte d'impureté dans le film.

6.3.2 Propriétés mécaniques

L'étude des propriétés mécaniques de $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$ a mis en évidence une corrélation entre la composition chimique des films et leur module de Young.

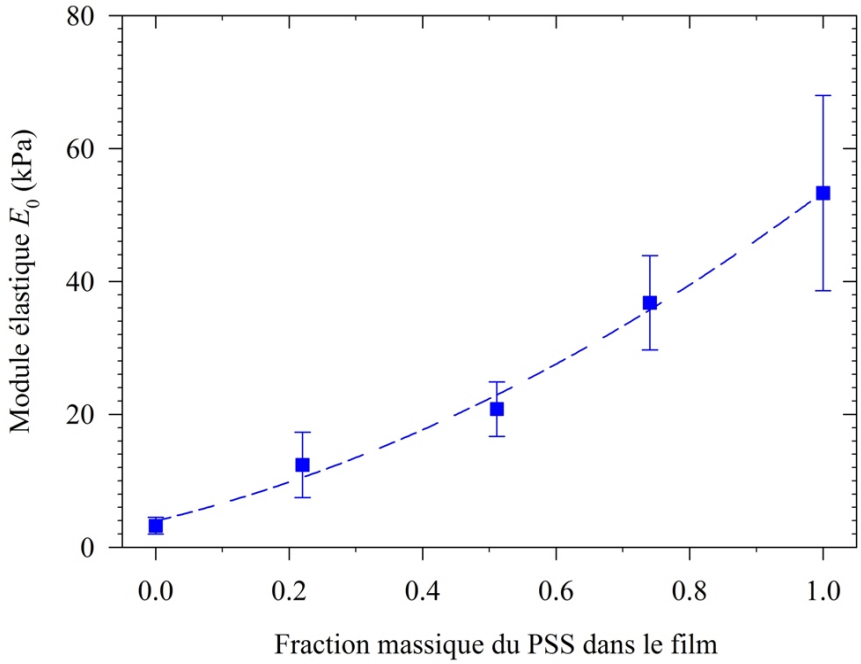


Figure 6.3.2-1 Corrélation entre le module de Young et la composition des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_{24}$.

En effet, la figure 6.3.2-1 montre que le module de Young diminue de manière pratiquement linéaire avec la fraction massique de HA présent dans le film. Le module de Young passe de 60 kPa pour $\rho = 0$ à environ 20 kPa pour $\rho = 0,5$ et 3 kPa pour $\rho = 1$. Ces résultats particulièrements intéressants démontrent que l'on peut contrôler le module de Young en jouant sur le dopage de films $(PLL/HA)_n$ avec du PSS. Cette méthode offre une nouvelle possibilité dans le contrôle des propriétés mécaniques des films multicouches et pourrait constituer une alternative intéressante à la réticulation chimique ou thermique des films. De plus, la présence du PSS dans le film, augmente la stabilité de ce dernier en solution. Néanmoins, la valeur du module de Young des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$ est inférieure aux valeurs obtenues pour les films $(PLL/HA)_n$ fortement réticulés ([EDC] > 3,5 mg/mL) ou même pour les films $(PLL/HA)_{24} – (PSS/PAH)_n – PSS$ ($n > 4$).

Conclusion & Perspectives

Conclusion & Perspectives

Conclusion générale **210**
Perspectives **215**

Références Bibliographiques **216**

Liste des publications **240**

Article 1 ..... **241**
Article 2 ..... **250**
Article 3 ..... **258**
Article 4 ..... **266**

Annexe 1 (chapitre 3) **273**
Annexe 2 (chapitre 4) **285**
Annexe 3 (chapitre 6) **288**

Conclusion générale

Les travaux présentés dans ce mémoire portent sur l'étude et la caractérisation des propriétés mécaniques de films multichouches de polyélectrolytes à l'aide de la microscopie à force atomique (AFM) selon la méthode de la nanoindentation[37, 49, 295]. Le but de ces investigations était de quantifier le module de Young de différents systèmes (polycation/polyanion) afin d'élaborer des films dont les propriétés mécaniques et physicochimiques sont modulables[34, 35, 119]. Ces films sont destinés à recouvrir la surface de biomatériaux (implants, prothèses, etc.) dans le but de contrôler certains comportements cellulaires tels que l'adhésion et la prolifération[35, 177] ainsi que certaines réactions biologiques[126, 266, 296] (inflammation, fibrose …). Nos travaux s'articulent autour de l'étude de trois types de films multicouches :

- les films multicouches mono-domaines constitués d'un seul couple (polycation/polyanion),
- les films multicouches bi-domaines constitués de deux couples (polcation/polyanion),
- les films multicouches à base de mélanges de polyélectrolytes.

Lors de ce travail, nous avons été amenés à développer un modèle élastique dérivé du modèle de Dimitriadis[34, 49] afin de traiter les courbes de force. Parallèlement, nous avons testé un modèle viscoélastique[142, 143] pour essayer d'extraire les propriétés mécaniques (viscosité et élasticité) des films. Cette approche a été appliquée à des films bi-domaines, bien que le film soit considéré comme un matériau homogène.

Nous avons d'abord étudié des systèmes simples de films multicouches mono-domaine caractérisés par des croissances exponentielle (par exemple : $(PLL/PSS)_n$, $(PLL/HA)_n$ et $(CHI/HA)_n$) et linéaire et de leur épaisseur (par exemple : $(PSS/PAH)_n$). Ces premiers travaux ont montré que les films à croissance exponentielle sont très mous par rapport aux films à croissance linéaire. En effet, les films $(PLL/HA)_{24}$, $(PLL/PSS)_{24}$ et $(CHI/HA)_{24}$ présentent des modules de Young respectivement de 3, 55 et 16 kPa, alors que pour un film à croissance linéaire comme $(PAH/PSS)_{210}$, il est de l'ordre de 1 MPa. Par ailleurs, l'étude du module de Young de ces films en fonction de la vitesse d'impact de la sonde a mis en évidence une dépendance entre ces deux paramètres dans le cas des films à croissance exponentielle de type $(PLL/HA)_n$ et $(CHI/HA)_n$. Ainsi, le module élastique de ces films croît avec la vitesse d'approche de la sonde. Ceci semble être la signature d'un milieu

viscoélastique. Néanmoins, dans le cas d'un film $(PLL/PSS)_n$ dont la croissance est exponentielle et d'un film $(PAH/PSS)_n$ dont la croissance est linéaire, il n'y a pas d'accroissement de la dureté apparente avec l'augmentation de la vitesse d'impact. Cela suggère que ces deux films présentent les caractéristiques d'un milieu purement élastique. Les résultats obtenus à l'aide de la microscopie à force atomique attestent d'une grande disparité entre les différents modules de Young mesurés (de quelques kPa à environ 1 MPa) et mettent aussi en évidence que les films, dont la croissance est fortement exponentielle, tel que $(PLL/HA)_n$, sont des milieux viscoélastiques (sous-chapitre 3.1).

Suite à notre étude préliminaire des films mono-domaines, nous avons cherché à contrôler le module de Young des films $(PLL/HA)_n$. Pour ce faire, nous avons eu recours à une réticulation chimique de ces films[23, 123, 297-299]. La réticulation chimique de ces films par un mélange (EDC/NHS) permet de stabiliser et rigidifier leur structure, mais aussi de les rendre adhésifs pour certains types cellulaires pour lesquels ces films sont anti-adhésifs à l'état natif[23, 56, 300]. La conséquence directe de la réticulation, en termes de propriétés mécaniques, est une augmentation du module de Young. Nous avons alors réticulé les films $(PLL/HA)_{24}$ avec différents mélanges (EDC/NHS) afin d'établir une corrélation entre le module de Young et le taux de réticulation des films. Les différentes mesures ont fait apparaître deux résultats fondamentaux. D'une part, le module de Young augmente avec la concentration en EDC et atteint un plateau (environ 400-500 kPa) à partir d'une concentration de 30-40 mg/mL en EDC[34]. D'autre part, les films $(PLL/HA)_{24}$ perdent leur caractéristique viscoélastique quand le taux de réticulation augmente, et présentent une caractéristique purement élastique pour une concentration de 5 mg/mL en EDC[34]. Nos travaux prouvent ainsi, qu'il est possible de contrôler les propriétés mécaniques des films (PLL/HA) par ajustement du degré de réticulation (sous-chapitre 3.2).

Ces résultats ont conduit à une collaboration avec le Professeur Catherine Picart de l'Université de Montpellier II et le Docteur Aurore Schneider[35, 198] de notre Unité de Recherche. Dans ce cadre, nous avons étudié le comportement d'un type cellulaire (chondrosarcomes HCS-2/8) mis en culture sur ces films, afin d'établir une éventuelle corrélation entre les propriétés mécaniques et le comportement cellulaire. Les tests de viabilité montrent, que plus le film $(PLL/HA)_{24}$ est rigide, plus les cellules prolifèrent et sont étalées sur le substrat. Nous avons pu ensuite corréler le comportement cellulaire (étalement et prolifération) aux propriétés mécaniques des films (module de Young). En effet, l'adhésion, la prolifération et l'étalement des chondrosarcomes sont favorisés par les surfaces les plus rigides (sous-chapitre 3.2).

Dans la suite de ce travail, nous avons étendu nos investigations à des films plus complexes. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les propriétés mécaniques et chimiques de films bi-domaines, c'est-à-dire composés de deux strates contenant chacune une paire de polyélectrolytes différents. Nous avons d'abord déterminé le module de Young des films $(PLL/HA)_{24}$ – $(PSS/PAH)_n$ – PSS en fonction du nombre n de dépôts. Les résultats obtenus montrent que le dépôt de la seconde strate entraîne une rigidification du film, caractérisée par une augmentation du module de Young (600-800 kPa) supérieure à celle qui a été mesurée pour des films $(PLL/HA)_{24}$ fortement réticulés (400 kPa), pour n = 24 (sous-chapitre 4.1). Afin de déterminer les phénomènes responsables de cette augmentation, nous avons construit dans les mêmes conditions, un film $(PLL/HA)_{24}$ – $(PSS/PAH)_n$ – PSS dans la cellule d'un spectromètre infrarouge pour $0 \leq n \leq 4$. Les spectres mesurés mettent en évidence la diffusion d'une faible quantité de PSS dans tout le film, ce qui n'a pas été observé par microscopie confocale à balayage laser. En effet, les observations photoniques par fluorescence des films bi-domaines doublement marqués (PLL^{fitc} et PSS^{Rho} sont les polyélectrolytes marqués) montrent l'existence d'une juxtaposition de deux strates distinctes (en vert (PLL/HA) et en rouge (PSS/PAH) : figure 4.1.1-1). Cependant, les observations photoniques ne nous permettent pas de vérifier s'il existe ou non une interface ou couche transitoire entre les deux strates. Pourtant, les mesures d'infrarouge ont montré la diffusion d'une faible quantité de PSS dans tout le film, non détectable par microscopie confocale à balayage laser. La mesure du spectre infrarouge des films $(PLL/HA)_{24}$ – $(PSS/PAH)_n$ – PSS pour $0 \leq n \leq 24$ serait nécessaire pour vérifier si la diffusion du PSS est stoppée à partir d'un certains nombre n de dépôts.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié d'autres types de films bi-domaines. Il s'agit des systèmes $(PLL/HA)_{24}$ – $(PLL/PGA)_n$ et $(PLL/HA)_{24}$ – $(PLL/PGA^{sucre})_n$. Ici, PGA^{sucre} correspond aux polyélectrolytes glycosylés, c'est-à-dire sur lesquels ont été greffées des molécules de mannose ou de lactose. La détermination du module de Young de ces films, pour n = 6, a montré que, comme dans le cas de $(PLL/HA)_{24}$ – $(PSS/PAH)_6$ – PSS, la présence de la seconde strate entraîne la rigidification de toute la structure. Les modules de Young mesurés sont également importants (150-250 kPa pour le PGA glycosylé et 60 kPa pour le PGA non glycosylé). Ces nouvelles données suggèrent qu'il est possible de rigidifier fortement les films $(PLL/HA)_n$ sans les réticuler. Cette méthode pourrait constituer une alternative intéressante à la réticulation chimique.

L'étude des films bi-domaines a abouti au développement de deux applications dans le domaine de la biologie. En effet, ces nouveaux systèmes constituent lune méthode originale

pour fonctionnaliser les films multicouches La première application a été conduite en collaboration avec le Docteur Constant Vodouhê du Centre Européen du Diabète de Strasbourg. Nous avons utilisé les films bi-domaines définis par la structure $(PLL/HA)_{30}$ – $(PSS/PAH)_n$ – PSS en tant que réservoir[301] de paclitaxel (Taxol™), une molécule anti-tumorale utilisée dans le traitement des cancers du sein et des ovaires. Le sytème étudié permet de contrôler, dans le temps, la libération d'une molécule active (Taxol™) qui est stockée dans une strate $(PLL/HA)_{30}$. Le couvercle du réservoir est constitué de la partie $(PSS/PAH)_n$ – PSS qui favorise l'adhésion des cellules HT29[225]. La seconde application à visée biologique, consiste à élaborer des films glyscosylés c'est-à-dire contenant des sucres et comportant des propriétés anti-tumorales. Ces travaux résultent d'une collaboration avec le Professeur Catherine Picart de l'Université de Montpellier II et le Docteur Aurore Schneider de notre Unité de Recherche[302]. Cette application fait suite à l'étude des films $(PLL/HA)_{24}$ – $(PLL/PGA^{sucre})_n$. Cette dernière avait permis de mettre en évidence la possibilité de fonctionnaliser les films $(PLL/PGA)_n$ en greffant chimiquement des sucres (mannose et lactose) sur les chaînes de PGA. Les chondrosarcomes et chondrocytes primaires ensemencés sur ces films ont montré un comportement, en termes d'étalement et de prolifération, dépendant en grande partie de la nature chimique des films et dans une moindre partie des propriétés mécaniques du revêtement multicouche.

La dernière étude que nous avons menée concerne les films multicouches à base de mélanges de polyélectrolytes. Nous avons élaboré des films de type $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$ où x représente la fraction molaire en monomères de HA en solution. L'évolution de l'épaisseur de ces films a été d'abord étudiée par microbalance à cristal de quartz. Elle a révélé que l'épaisseur des films à base de mélange est inférieure à l'épaisseur du film non mélangé le moins épais, c'est-à-dire (PLL/PSS). Cette observation est corroborée par l'étude, en ellipsométrie, de ces films (construits par nébulisation). De plus, on observe une épaisseur minimun pour x = 0,95. Ces résultats semblent indiquer qu'il existe des phénomènes physicochimiques (diffusion, déconstruction[216], échanges[254, 255], compétition[294]) responsables de la non-monotonie de l'épaisseur des films en fonction de la concentration en HA. Nous avons ensuite mesuré les spectres infrarouge des films $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$ afin de quantifier les proportions de chacun des polyélectrolytes dans le film, en fonction de x et X, respectivement la fraction molaire et la fraction massique. Ces mesures montrent que l'édification des films à base des mélanges $[HA_x/PSS_{1-x}]$ peut être décomposée en trois régimes (sous-chapitre 6.2):

- Le premier régime est caractérisé par la prédominance du PSS. En effet, pour $0 \leq x \leq 0,70$, les interactions entre la PLL et le PSS sont suffisamment fortes pour limiter l'incorporation de HA. Ce dernier constitue alors une impureté dans le film alors que la fraction massique du PSS dans le film est supérieure ou égale à 80%.
- Le second régime est caractérisé une zone de transition et le passage par un minimum de l'épaisseur du film pour $x = 0,95$. C'est à ce stade que HA et PSS sont en équiconcentration dans le film.
- Le dernier régime est caractérisé par la prédominance du HA. Ainsi, pour $0,97 \leq x \leq 1$, les interactions entre la PLL et le HA sont largement majoritaires par rapport à celles de la PLL et du PSS. En effet, le réservoir de PSS est rapidement épuisé et la fraction massique du PSS s'effondre en passant de 50% à moins de 5%. Le PSS constitue alors une impureté dans le film.

Enfin, nous avons mesuré le module de Young de ces films par la technique de nanoindentation (sous-chapitre 2.2). Les résultats obtenus indiquent une corrélation entre la dureté du film et la quantité de PSS incorporée. En effet, le module de Young augmente avec l'incorporation du PSS et passe ainsi de 3 kPa pour $x = 1$ à environ 60 kPa pour $x = 0$.

A l'évidence, les recherches conduites dans le cadre de ce travail de thèse soulignent l'importance du module de Young des films multicouches et complètent la connaissance que nous avons des multicouches de polyélectrolytes. Nous montrons aussi que ce paramètre (module de Young) dépend fortement de la nature chimique du ou des couples de polyélectrolytes employés. De plus, ces travaux démontrent la possibilité de moduler ce paramètre en jouant sur le taux de réticulation, sur l'incorporation d'un troisième polyélectrolyte lors de la construction du film ou en recouvrant l'architecture d'une ou plusieurs couches contenant une autre paire de polyélectrolytes. Or, la modification et l'adaptation du module de Young nous permet de contrôler le comportement cellulaire (adhésion), mais aussi de réguler l'activité biologique des cellules (prolifération) ; ce qui autorise d'envisager des applications prometteuses dans le domaine des biomatériaux.

Perspectives

En résumé, ce travail souligne l'originalité et la pertinence de la technique de nanoindentation dans la caractérisation des propriétés mécaniques des films multicouches de polyélectrolytes et les conséquences de ces propriétés sur le comportement de certains types cellulaires. Au regard de tous ces résultats, il apparaît la nécessité de poursuivre ce travail. La variabilité de paramètres tels que la nature chimique, la concentration, la force ionique, le pH ou le mélange de certains polyélectrolytes de même charge, donne accès à l'élaboration de nouveaux films et à des propriétés mécaniques intéressantes. L'étude du module de Young de systèmes complexes bi-structurés tels que $(PLL/HA)_{24}$ – $(PLL/PGA^{sucre})_n$ et $(PLL/HA)_{24}$ – $(PSS/PAH)_n$ – PSS a mis en évidence l'existence de phénomènes de diffusion et d'échanges, permettant une rigidification de l'ensemble des films.

La dureté résultante est dans certains cas supérieure à celle mesurée pour les films (PLL/HA) totalement réticulés. De plus, les films à base de mélanges de polyélectrolytes tels que $(PLL/[HA_x/PSS_{1-x}])_n$ constituent une nouvelle voie pour stabiliser les films (PLL/HA) tout en les rigidifiants faiblement.

L'extension de la technique employée pour caractériser les films multicouches à d'autres systèmes encore plus complexes (films multicouches poly-domaines, à base de plusieurs mélanges de polyélectrolytes) constitue une voie d'exploration très intéressante. De plus, l'élaboration de tels films peut aboutir à de nombreuses applications à la biologie, et permettrait de développer de nouveaux vecteurs de médication (films fonctionnalisés) et de nouveaux revêtements spécifiques à certains types cellulaires.

Références Bibliographiques

1. Pelham RJJ, Wang Y-L. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci USA* **1997,** 94, 13661-13665.

2. Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J* **2000,** 79, 144-152.

3. Gray DS, Tien J, Chen CS. Repositioning of cells by mechanotaxis on surfaces with micropatterned Young's modulus. *Journal of Biomedical Materials Research* **2003,** 66A, 605-614.

4. Wong JY, Velasco A, Rajagopalan P, Pham Q. Directed movement of vascular smooth muscle cells on gradient compliant hydrogels. *Langmuir* **2003,** 19, 1908-1913.

5. Discher DE, Janmey PA, Wang Y-L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* **2005,** 310, 1139-1143.

6. Wong JY, Leach JB, Brown XQ. Balance of chemistry, topography, and mechanics at the cell–biomaterial interface: Issues and challenges for assessing the role of substrate mechanics on cell response. *Surf Sci* **2004,** 570, 119-133.

7. Engler A, Bacakova L, Newman C, Hategan A, Griffin M, Discher DE. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophys J* **2004,** 86, 617-628.

8. Decher G, Hong JD, Schmitt J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyeletrolytes on charges surface. *Thin Solid Films* **1992,** 210, 831-835.

9. Decher G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* **1997,** 277, 1232-1237.

10. Hammond PT. Recent explorations in electrostatic multilayer thin film assembly. *Curr Opin Colloid In Sci* **1999,** 4, 430-442.

11. Ladam G, Schaad P, Voegel J-C, Schaaf P, Decher G, Cuisinier FJG. In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* **2000,** 16, 1249-1255.

12. Picart C, Lavalle P, Hubert P, Cuisinier FJG, Decher G, Schaaf P, Voegel J-C. Buildup mechanism for poly(L-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface. *Langmuir* **2001,** 17, 7414-7424.

13. Lavalle P, Gergely C, Cuisinier FJG, Decher G, Schaaf P, Voegel J-C, Picart C. Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime : An in situ atomic force microscopy study. *Macromol* **2002,** 35, 4458-4465.

14. Picart C, Mutterer J, Richert L, Luo Y, Prestwich GD, Schaaf P, Voegel J-C, Lavalle P. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002,** 99, 12531-12535.

15. Méndez Garza J, Schaaf P, Muller S, Ball V, Stoltz J-F, Voegel J-C, Lavalle P. Multicompartment films made of alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth. *Langmuir* **2004,** 20, 7298-7302.

16. Porcel CH, Lavalle P, Decher G, Senger B, Voegel J-C, Schaaf P. From exponential to linear growth in polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* **2006,** 22, 4376-4383.

17. Salomäki M, Vinokurov IA, Kankare J. Effect of Temperature on the Buildup of Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir* **2005,** 21, 11232(11240.

18. Michel M, Izquierdo A, Decher G, Voegel J-C, Schaaf P, Ball V. Layer by layer self-assembled polyelectrolyte multilayers with embedded phospholipid vesicles obtained by spraying: Integrity of the vesicles. *Langmuir* **2005,** 21, 7854-7859

19. Lavalle P, Vivet V, Jessel N, Decher G, Mesini PJ, Voegel J-C, Schaaf P. Direct evidence for vertical diffusion and exchange processes of polyanions and polycations in polyelectrolyte multilayer films. *Macromol* **2004,** 37, 1159-1162.

20. Jessel N, Atalar F, Lavalle P, Mutterer J, Decher G, Schaaf P, Voegel J-C, Ogier J. Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins. *Adv Mater* **2003,** 15, 692-695.

21. Benkirane-Jessel N, Schwinté P, Falvey P, Darcy R, Haïkel Y, Schaaf P, Voegel J-C, Ogier J. Buildup of polyelectrolyte multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxicam-cyclodextrin complexes. *Adv Funct Mater* **2004,** 14, 174-184.

22. Etienne O, Picart C, Taddei C, Haikel Y, Dimarcq JL, Schaaf P, Voegel J-C, Ogier JA, Egles C. Multilayer polyelectrolyte films functionalized by insertion of defensin: A new approach to protection of implants from bacterial colonization. *Antimicrob Agents Chemother* **2004,** 48, 3662-3669.

23. Richert L, Boulmedais F, Lavalle P, Mutterer J, Ferreux E, Decher G, Schaaf P, Voegel J-C, Picart C. Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking. *Biomacromol* **2004,** 5, 284-294.

24. Richert L, Lavalle P, Payan E, Stoltz J-F, Shu XZ, Prestwich GD, Schaaf P, Voegel J-C, Picart C. Layer-by-layer buildup of polysaccharide films : Physical chemistry and cellular adhesion aspects. *Langmuir* **2004,** 1, 284-294.

25. Benkirane-Jessel N, Lavalle P, Hübsch E, Holl V, Senger B, Haïkel Y, Voegel J-C, Ogier J, Schaaf P. Short-Time tuning of the biological activity of functionalized polyelectrolyte mutlilayers. *Adv Funct Mater* **2005,** 15, 648-654.

26. Etienne O, Gasnier C, Taddei C, Voegel J-C, Aunis D, Schaaf P, Metz-Boutigue MH, Bolcato-Bellemin A-L, Egles C. Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films. *Biomaterials* **2005,** 26, 6704-6712.

27. Lavalle P, Boulmedais F, Ball V, Mutterer J, Schaaf P, Voegel J-C. Free standing membranes made of biocompatible polyelectrolytes using the layer by layer method. *J Membr Sci* **2005,** 253, 49-56.

28. Schultz P, Vautier D, Richert L, Jessel N, Haikel Y, Schaaf P, Voegel J-C, Ogier J, Debry C. Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide, alpha-MSH, for coating a tracheal prosthesis. *Biomaterials* **2005,** 26, 2621-2630.

29. Zhang J, Senger B, Vautier D, Picart C, Schaaf P, Voegel J-C, Lavalle P. Buildup of collagen and hyaluronic acid polyelectrolyte multilayers. *Biomaterials* **2005,** 26, 2253-3361.

30. Vodouhê C, Schmittbuhl M, Boulmedais F, Bagnard D, Vautier D, Schaaf P, Egles C, Voegel J-C, Ogier J. Effect of functionalization of multilayered polyelectrolyte films on motoneuron growth. *Biomaterials* **2005,** 26, 545-554.

31. Liu XY, Bruening ML. Size-selective transport of uncharged solutes through multilayer polyelectrolyte membranes. *Chem Mater* **2004,** 16, 351-357.

32. Rundlof M, Wagberg L. Formation of multilayers on silica surfaces of a cationic polyelectrolyte and dissolved and colloidal substances originating from mechanical wood pulp - Adsorption and influence on adhesion. *Colloids Surf A* **2004,** 237, 33-47.

33. Schaaf P, Decher G, Voegel J-C. Des millefeuilles moléculaires à tout faire. *La Recherche* **2005,** 389, 56-58.

34. Francius G, Hemmerlé J, Ohayon J, Schaaf P, Voegel J-C, Picart C, Senger B. Effect of crosslinking on the elasticity of polyelectrolyte multilayer films measured by colloidal probe AFM. *Microsc Res Tech* **2006,** 69, 84-92.

35. Schneider A, Francius G, Obeid R, Schwinté P, Hemmerlé J, Frisch B, Schaaf P, Voegel J-C, Senger B, Picart C. Polyelectrolyte multilayers with a tunable Young's modulus: Influence of film stiffness on cell adhesion. *Langmuir* **2006,** 22, 1193-1200.

36. Yao KD, Liu WD, Lin Z, Qiu XH. In situ atomic force microscopy measurement of the dynamic variation in the elastic modulus of swollen chitosan/gelatin hybrid polymer network gels in media of different pH. *Polym Int* **1999,** 48, 794-798.

37. Pavoor PV, A B, Strom A, Yang D, Cohen RE. Mechanical characterization of polyelectrolyte multilayers using quasi-static nanoindentation. *Macromol* **2004,** 37, 4865-4871.

38. Hemmerlé J, Altmann SM, Maaloum M, Hörber JKH, Heinrich L, Voegel J-C, Schaaf P. Direct observation of the anchoring process during the adsorption of fibrinogen on a solid surface by force-spectroscopy mode atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999,** 96, 6705-6710.

39. Gergely C, Voegel J-C, Schaaf P, Senger B, Maaloum M, Hörber JKH, Hemmerlé J. Unbinding process of adsorbed proteins under external stress studied by AFM force spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* **2000,** 97, 10802-10807.

40. Gergely C, Senger B, Voegel JC, Hörber JKH, Schaaf P, Hemmerlé J. Semi-automatized processing of AFM force-spectroscopy data. *Ultramicroscopy* **2001,** 87, 67-78.

41. Domke J, Radmacher M. Measuring the elastic properties of thin polymer films with the atomic force microscope. *Langmuir* **1998,** 14, 3320-3325.

42. Mermut O, Lefebvre J, Gray DG, Barrett CJ. Structural and mechanical properties of polyelectrolyte multilayer films studied by AFM. *Macromol* **2003,** 36, 8819-8824.

43. Uricanu VI, Duits MHG, Nelissen RMF, Bennink M, Mellema J. Local structure and elasticity of soft gelatin gels studied with atomic force microscopy. *Langmuir* **2003,** 19, 8182-8194.

44. Yang G, Rao N, Zhu D-M. Probing the viscoelastic response of glassy polymer films using atomic force microscopy. *J Colloid Interface Sci* **2006,** 297, 104-111.

45. Hertz H. Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *Journal für die reine und angewandte Mathematik* **1881,** 92, 156-171.

46. Sneddon IN. The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *Int Journal Eng Sci* **1965,** 3, 47-57.

47. Heuberger M, Dietler G, Schlapbach L. Elastic deformations of tip and sample during atomic force microscope measurements. *J Vac Sci Technol B* **1996,** 14, 1250-1254.

48. Cappella B, Dietler G. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surf Sci Reports* **1999,** 34, 1-104.

49. Dimitriadis EK, Horkay F, Maresca J, Kachar B, Chadwick RS. Determination of Elastic Moduli of Thin Layers of Soft Material Using the Atomic Force Microscope. *Biophys J* **2002,** 82, 2798-2810.

50. Johnson KL, *Contact mechanics*. Cambridge University Press: Cambridge, 1985.

51. Tschoegl NW. Time dependence in material properties: An overview. *Mech Time-Depend Mat* **1997,** 1, 3-31.

52. Roylance D Engineering viscoelasticity. http://web.mit.edu/course/3/3.11/www/modules/visco.pdf

53. Lu H, Huang G, Wang B, Mamedov A, Gupta S. Characterization of the linear viscoelastic behavior of single-wall carbon nanotube/polyelectrolyte multilayer nanocomposite film using nanoindentation. *Thin Solid Films* **2006,** 500, 197-202.

54. Etienne S, David L. *Introduction à la physique des polymères* **2002**, Paris: Dunod

55. Mathur AB, Collinsworth AM, Reichert WM, Kraus WE, Truskey GA. Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. *J Biomechanics* **2001,** 34, 1545-1553.

56. Richert L, Engler AJ, Discher DE, Picart C. Elasticity of native and cross-linked polyelectrolyte multilayer films. *Biomacromol* **2004,** 5, 1908-1916.

57. Yang SY, Lee D, Cohen RE, Rubner MF. Bioinert Solution-Cross-Linked Hydrogen-Bonded Multilayers on Colloidal Particles. *Langmuir* **2004,** 20, 5978-5981.

58. Sun Y, Walker GC. Viscoelastic response of poly(dimethylsiloxane) in the adhesive interaction with AFM tips. *Langmuir* **2005,** 21, 8694-8702.

59. Pryse KM, Nekouzadeh A, Genin GM, Elson EL, Zahalak GI. Incremental mechanics of collagen gels: New experiments and a new viscoelastic model. *Ann Biomed Eng* **2003,** 31, 1287-1296.

60. Blodgett KB. Monomolecular Films of Fatty Acids on Glass *J Am Chem Soc* **1934,** 56, 495.

61. Blodgett KB, Langmuir I. Built-Up Films of Barium Stearate and Their Optical Properties. *Phys Rev* **1937,** 51, 964-982.

62. Cao G, Hong HG, Mallouk TE. Layered metal phosphates and phosphonates: from crystals to monolayers *Acc Chem Res* **1992,** 25, 420-427.

63. Netzer L, Sagiv J. A new approach to construction of artificial monolayer assemblies *J Am Chem Soc* **1983,** 105, 674-676.

64. Iler RK. Multilayers of colloidal particles *J Colloid Interface Sci* **1966,** 21, 569-594.

65. Fromherz P, Baumeister W, Vogell W. Assembling proteins at lipid monolayers. *Electron Microsc Mol Dim* **1980**, 338-349.

66. Gölander C-G, Arwin H, Eriksson J-C, Lundström I, Larsson RR. Heparin surface film formation by means of collodial adsorption studied by ellipsometry and SEM. *Colloids Surf* **1982,** 5, 1-16.

67. Decher GA, Lvov Y, Schmitt J. Proof of multilayer structural organization in self-assembled polycation-polyanion molecular films. *Thin Solid Films* **1994,** 244, 772-777.

68. Advincula R, Aust E, Meyer W, Knoll W. In Situ Investigations of Polymer Self-Assembly Solution Adsorption by Surface Plasmon Spectroscopy. *Langmuir* **1996,** 12, 3536-3540.

69. Ramsden JJ, Lvov YM, Decher G. Determination of optical constants of molecular films assembled via alternate polyion adsorption. *Thin Solid Films* **1995,** 254, 246-251.

70. Caruso F, Lichtenfeld H, Donath E, Mohwald H. Investigation of electrostatic interactions in polyelectrolyte multilayer films: Binding of anionic fluorescent probes to layers assembled onto colloids. *Macromol* **1999,** 32, 2317-2328.

71. Schlenoff JB, Dubas ST, Farhat T. Sprayed Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir* **2000,** 16, 9968-9969.

72. Porcel CH, Izquierdo A, Ball V, Decher G, Voegel J-C, Schaaf F. Ultrathin Coatings and (Poly(glutamic acid)/Polyallylamine) Films Deposited by Continuous and Simultaneous Spraying. *Langmuir* **2005,** 21, 800-802.

73. Chiarelli P, Johal MS, Casson JL, Roberts BL, Robinson JM, Wang HL. Controlled fabrication of polyelectrolyte multilayer thin films using spin-assembly. *Adv Mater* **2001,** 13, 1167-1170.

74. Guo TF, Chang SC, Pyo S, Yang Y. Vertically integrated electronic circuits via a combination of self-assembled polyelectrolytes, Ink-Jet printing, and electroless metal plating processes. *Langmuir* **2002,** 18, 8142-8147.

75. Chen KM, Jiang X, Kimerling LC, Hammond PT. Selective Self-Organization of Colloids on Patterned Polyelectrolyte Templates *Langmuir* **2000,** 16, 7825-7834.

76. Jiang X, Hammond PT. Selective Deposition in Layer-by-Layer Assembly: Functional Graft Copolymers as Molecular Templates *Langmuir* **2000,** 16, 8501-8509.

77. Caruso F, Möhwald H. Protein multilayer formation on colloids through a stepwise self- assembly technique. *J Am Chem Soc* **1999,** 121, 6039-6046.

78. Mendelsohn JD, Barrett CJ, Chan VV, Pal AJ, Mayes AM, Rubner MF. Fabrication of Microporous Thin Films from Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir* **2000,** 16, 5017-5023.

79. Shiratori SS, Rubner MF. pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes. *Macromol* **2000,** 33, 4213-4219.

80. Yoo D, Shiratori SS, Rubner MF. Controlling bilayer composition and surface wettability of sequentially adsorbed multilayers of weak polyelectrolytes. *Macromol* **1998,** 31, 4309-4318.

81. Salomäki M, Tervasmaki P, Areva S, Kankare J. The Hofmeister Anion Effect and the Growth of Polyelectrolyte Multilayers *Langmuir* **2004,** 20, 3679-3683.

82. Lvov Y, Decher G, Möhwald H. Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine). *Langmuir* **1993,** 9, 481-486.

83. Sukhorukov GB, Schmitt J, Decher G. Reversible swelling of polyanion/polycation multilayer films in solutions of different ionic strength. *Ber Bunsenges Phys Chem* **1996,** 100, 948-953.

84. Decher G. Layered nanoarchitectures via directed assembly of anionic and cationic molecules. *Comprehensive Supramol Chem, " Templating, Self-Assembly and self organization" (Sauvage, JP; Hosseini, MW, Eds), Pergamon Press: Oxford* **1996,** 9, 507-528.

85. Sukhishvili SA, Granick S. Polyelectrolyte adsorption onto an initially-bare solid surface of opposite electrical charge. *J Chem Phys* **1998,** 109, 6861-6868.

86. Wang LY, Cui SX, Wang ZQ, Zhang X, Jiang M, Chi LF, Fuchs H. Multilayer assemblies of copolymer PSOH and PVP on the basis of hydrogen bonding. *Langmuir* **2000,** 16, 10490-10494.

87. Delcorte A, Bertrand P, Wischerhoff E, Laschewsky A. Adsorption of Polyelectrolyte Multilayers on Polymer Surfaces *Langmuir* **1997,** 13, 5125-5136.

88. Losche M. Protein monolayers at interfaces. *Curr Opin Solid State Mat Sci* **1997,** 2, 546-556.

89. Decher G, Lehr B, Lowack K, Lvov Y, Schmitt J. New nanocomposite films for biosensors: layer-by-layer adsorbed films of polyelectrolytes, proteins or DNA. *Biosens Bioelectron* **1994,** 9, 677-684.

90. McAloney RA, Sinyor M, Dudnik V, Goh MC. Atomic force microscopy studies of salt effects on polyelectrolyte multilayer film morphology. *Langmuir* **2001,** 17, 6655-6663.

91. Ruths J, Essler F, Decher G, Riegler H. Polyelectrolytes I: Polyanion/Polycation Multilayers at the Air/Monolayer/Water Interface as Elements for Quantitative Polymer Adsorption Studies and Preparation of Hetero-superlattices on Solid Surfaces. *Langmuir* **2000,** 16, 8871-8878.

92. Elbert DL, Herbert CB, Hubbell JA. Thin polymer layers formed by polyelectrolyte multilayer techniques on biological surfaces. *Langmuir* **1999,** 15, 5355-5362.

93. Ladam G, Gergely C, Senger B, Decher G, Voegel J-C, Schaaf P, Cuisinier FJG. Protein Interactions with Polyelectrolyte Multilayers: Interactions between Human Serum Albumin and Polystyrene Sulfonate/Polyallylamine Multilayers. *Biomacromol* **2000,** 1, 674-688.

94. Ladam G, Schaaf P, Cuisinier FJG, Decher G, Voegel J-C. Protein Adsorption onto Auto-Assembled Polyelectrolyte Films. *Langmuir* **2001,** 17, 878-882.

95. Muller M, Rieser T, Dubin PL, Lunkwitz K. Selective interaction between proteins and the outermost surface of polyelectrolyte multilayers: Influence of the polyanion type, pH and salt. *Macromol Rapid Commun* **2001,** 22, 390-395.

96. Mendelsohn JD, Yang SY, Hiller J, Hochbaum AI, Rubner MF. Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films. *Biomacromol* **2003,** 4, 96-106.

97. Vautier D, Hemmerlé J, Vodouhe C, Koenig G, Richert L, Picart C, Voegel J-C, Debry C, Chluba J, Ogier J. 3-D surface charges modulate protrusive and contractile contacts of chondrosarcoma cells. *Cell Motil Cytoskel* **2003,** 56, 147-158.

98. Boura C, Menu P, Payan E, Picart C, Voegel J-C, Muller S, Stoltz J-F. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte mutlilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials* **2003,** 24, 3521-3530.

99. Graul TW, Schlenoff JB. Capillaries modified by polyelectrolyte multilayers for electrophoretic separations. *Anal Chem* **1999,** 71, 4007-4013.

100. Onda M, Lvov Y, Ariga K, Kunitake T. Sequential actions of glucose oxidase and peroxidase in molecular films assembled by layer-by-layer alternate adsorption. *Biotech Bioeng* **1996,** 51, 163-167.

101. Narvaez A, Suarez G, Popescu IC, Katakis I, Dominguez E. Reagentless biosensors based on self-deposited redox polyelectrolyte-oxidoreductases architectures. *Biosens Bioelectron* **2000,** 15, 43-52.

102. Onda M, Lvov Y, Ariga K, Kunitake T. Sequential reaction and product separation on molecular films of glucoamylase and glucose oxidas assembled on an ultrafilter. *J Ferment Bioeng* **1996,** 82, 502-506.

103. Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett* **1986,** 56, 930-933.

104. Binnig G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Phys Rev Lett* **1982,** 49, 57-61.

105. Young RD. Field Emission Ultramicrometer. *Rev Sci Instr* **1966,** 37, 275-278.

106. Young RD, Ward J, Scire F. The Topografiner: An Instrument for Measuring Surface Microtopography. *Rev Sci Instr* **1972,** 43, 999-1011.

107. Building and Fire Research Laboratory - National Institute of Standards and Technology. http://www.bfrl.nist.gov

108. Raghavan D, Van Landingham M, Gu X, Nguyen T. Charactization of heterogeneous regions in polymer systems using tapping mode and force mode atomic force microscopy. *Langmuir* **2000,** 16, 9448-9459.

109. Faucher KM, Fournier T, Pannetier B, Thirion C, Wernsdorfer W, Villegier JC, Bouchiat V. Nobium and nobium nitride SQUIDs based on anodised nanobridges made with an atomic force microscope. *Physica C* **2002,** 368, 211-217.

110. Gautier B, Thiebaud C, Charrault D, Labrune JC. Nanoscale investigation of the ferroelectric properties of sol-gel (Pb Zr-x Ti-x)O_3 films. *Ferroelectrics* **2002,** 269, 1067-1072.

111. Rico F, Rosa-Cusachs P, Gavara N, Farré R, Rotger M, Navajas D. Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips. *Phys Rev E* **2005,** 72, 021914.

112. Yeung T, Georges PC, Flanagan LA, Marg B, Ortiz M, Funaki M, Zahir N, Ming W, Weaver V, Janmey PA. Effects of substrat stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure and adhesion. *Cell Motil Cytoskel* **2005,** 60, 24-34.

113. Richter F, Brisson A. Characterization of lipid bilayers and protein assemblies supported on rough surfaces by atomic force microscopy. *Langmuir* **2003,** 19, 1632-1640.

114. Revenko I, Sommer F, Tran Minh D, Garrone R, Franc J-M. Atomic force microscopy study of the collagen fibre structure. *Biology of the Cell* **1994,** 80, 67-69.

115. Hemmerlé J, Picart C, Gergely C, Schaaf P, Stoltz J-F, Voegel J-C, Senger B. Modeling of the detachment of a molecule from a surface: Illustration of the "Bell-Evans effect". *Biorheology* **2003,** 40, 149-160.

116. Piétrement O, Pastré D, Fusil S, Jeusset J, David MO, Landousy F, Hamon L, Zozimr A, LeCam E. Reversible binding of DNA on $NiCl_2$ treated mica by varying the ionic strengh

Langmuir **2003,** 19, 2536-2539.

117. Burnham NA, Colton RJ. Measuring the nanomechanical properties and surface forces of materials using an atomic force microscope *J Vac Sci Technol* **1989,** A7, 2906-2913.

118. Engler A, Richert L, Wong JY, Picart C, Discher DE. Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels, and polyelectrolyte multilayer films : correlations between substrate stiffness and cell adhesion. *Surf Sci* **2004,** 570, 142-154.

119. Thompson MT, Berg MC, Tobias IS, Rubner MF, Van Vliet KJ. Tuning compliance of nanoscale polyelectrolyte multilayers to modulate cell adhesion. *Biomaterials* **2005,** 26, 6836-6845.

120. Radmacher M. Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope. *Method in Cell Biology* **2002,** 68, 67-90.

121. Arntz Y, Jourdainne L, Greiner-Wacker G, Rinckenbach S, Ogier G, Voegel J-C, Lavalle P, Vautier D. Immunogold detection of types I and II chondrocyte collagen fibrils: an in situ atomic force microscopic investigation. *Microsc Res Tech* **2006,** 69, 283-290.

122. Martinoty P, Hilliou L, Mauzac M, Benguigui L, Collin D. Side-chain liquid-crystal polymers: Gel-like behavior below their gelation points. *Macromol* **1999,** 32, 1746-1752.

123. Collin D, Lavalle P, Garza JM, Voegel J-C, Schaaf P, Martinoty P. Mechanical properties of cross-linked hyaluronic acid/poly-(L-lysine) multilayer films. *Macromol* **2004,** 37, 10195-10198.

124. Vinogradova OI. Mechanical properties of polyelectrolyte multilayer microcapsules. *J Phys: Condens Matter* **2004,** 16, 1105-1134.

125. Yuan Y, Verma R. Measuring microelastic properties of stratum corneum. *Colloids Surf B* **2006,** 48, 6-12.

126. Leporatti S, Gerth A, Köhler G, Kohlstrunk B, Hauschildt S, Donath E. Elasticity and adhesion of resting and lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Lett* **2006,** 580, 450-454.

127. Fang TH, Chang WJ, Tsai SL. Nanomechanical characterization of polymer using atomic force microscopy and nanoindentation. *Microelectronics Journal* **2005,** 36, 55-59.

128. Bressan JD, Tramontin A, Rosa C. Modeling of nanoindentation of bulk and thin film by finite element method. *Wear* **2005,** 258, 115-122.

129. Sun Y, Akhremitchev B, Walker GC. Using the adhesive interaction between atomic force microscopy tips and polymer surfaces to measure the elastic modulus of compliant samples. *Langmuir* **2004,** 20, 5837-5845.

130. Gillies G, Prestidge CA, Attard P. An AFM study of the deformation and nanorheology of cross-linked PDMS droplets. *Langmuir* **2002,** 18, 1674-1679.

131. Matzelle TR, Geuskens G, Kruse N. Elastic properties of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(acrylamide) hydrogels studied by scanning force microscopy. *Macromol* **2003,** 36, 2926-2931.

132. Nolte AJ, Rubner MF, Cohen RE. Determinig the Young's modulus of polyelectrolyte multilayer film via stress-induced mechanical buckling instabilities. *Macromol* **2005,** 38, 5367-5370

133. Vinckier A, Semenza G. Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. *FEBS Lett* **1998,** 430, 12-16.

134. Boussinesq J. Théorie des petits mouvements d'un point pesant sur une surface fixe décrite autour d'un axe de révolution vertical. *C R l'Academie Sci, Ser II Univers* **1877,** 85, 539-541.

135. Boussinesq J. Sur une loi intuitive, d'après laquelle se répartit le poids d'un disque circulaire solide, supporté par un sol horizontal élastique. *C R l'Academie Sci, Ser II Univers* **1878,** 87, 1077-1078.

136. Boussinesq J. Des déplacements que produit, à l'intérieur d'un sol élastique, une pression normale exercée en un point de sa surface. *C R l'Academie Sci, Ser II Univers* **1879,** 88, 741-743.

137. Landau L, Lifchitz E, *Théorie de l'élasticité*. Editions Mir: Moscou, 1967.

138. Gradshteyn IS, Ryzhik IM, *Table of integrals, series and products*. Academic Press: Orlando, 1980.

139. Abramowitz M, Stegun IA, *Handbook of mathematical functions*. Dover: New York, 1970.

140. Yang SY, Zhang Y-W, Zenk K. Analysis of nanoindentation creep for polymeric materials. *J Appl Phys* **2004,** 95, 3655-3666.

141. Izquierdo A, Ono SS, Voegel J-C, Schaaf P, Decher G. Dipping versus Spraying: Exploring the deposition conditions for speeding up layer-by-layer assembly. *Langmuir* **2005,** 21, 7558-7567.

142. Chen WT. Computation of stresses and displacements in a layered elastic medium. *Int Journal Eng Sci* **1971,** 9, 775-800.

143. Chen WT, Engel PA. Impact and contact stress analysis in multilayer media. *International Journal of Solids and Structures* **1972,** 8, 1257-1281.

144. Sader JE, Larson I, Mulvaney P, White LR. Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers. *Rev Sci Instr* **1995,** 66, 3789-3798.

145. Lévy R, Maaloum M. Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: thermal fluctuations and other methods. *Nanotechnology* **2002,** 13, 33-37.

146. Stark RW, Drobek T, Heckl WM. Thermomechanical noise of a free v-sharped cantilever for atomic-force microscopy. *Ultramicroscopy* **2000,** 86, 207-215.

147. Rutland MW, Tyrell JWG, Attard P. Analysis of atomic force microscopy data for deformable materials. *J Adh Sci Tech* **2004,** 18, 1199-1215.

148. Oliver WC, Pharr GM. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J Mat Res* **1992,** 7, 1564-1583.

149. Griffiths PR, De Haseth JA. Fourier Transform Infrare Spectrometry *Chem Anal Ser Monogram Anal Chem Appl* **1986,** 83.

150. Cooley JW, Turkey JW. An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series. *Mathematics of Computation* **1965,** 19, 297-301.

151. Harrick NJ, *Internal reflection spectroscopy*. London, 1967.

152. Pauling L, Corey RB, Branson HR. The Structure of Proteins: Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. *Proc Natl Acad Sci USA* **1951,** 37, 205-211.

153. Pauling L, Corey RB. Configurations of Polypeptide Chains with Favored Orientations Around Single Bonds: Two New Pleated Sheets. *Proc Natl Acad Sci USA* **1951,** 37, 729-740.

154. Arrondo JLR, Urbaneja MA, Goñi FM, Macarulla JM, Sarzala G. Protein conformational transitions in sarcoplasmic reticulum membranes *Biochem Biophys Res Com* **1985,** 128, 1159-1163

155. Cameron DG, Kauppinen JK, Moffat JK, Mantsch HH. Precision in Condensed Phase Vibrational Spectroscopy. *Appl Spectrosc* **1982,** 36, 245-250.

156. Sauerbrey G. Verwendung von Schwingquartzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Z Phys* **1959,** 155, 206-222.

157. Nomura T, Okuhara M. Frequency shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids *Anal Chim Acta* **1982,** 142, 281-284.

158. Rodahl M, Höök F, Krozer A, Brzezinski P, Kasemo B. Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments. *Rev Sci Instr* **1995,** 66, 3924-3930.

159. Mecea VM. Loaded vibrating quartz sensors *Sensors and Actuators A* **1993,** 40, 1-27.

160. Rodahl M, Kasemo B. On the measurement of thin liquid overlayers with the quartz-crystal microbalance. *Sensors and Actuators A* **1996,** 54, 448-456.

161. Voinova MV, Rodahl M, Jonson M, Kasemo B. Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces : continuum mechanics approach. *Phys Scr* **1999,** 59, 391-396.

162. Boulmedais F, Ball V, Schwinte P, Frisch B, Schaaf P, Voegel J-C. Buildup of exponentially growing multilayer polypeptide films with internal secondary structure. *Langmuir* **2003,** 19, 440-445.

163. Wong JY, Leach JB, Brown XQ. Balance of chemistry, topography, and mechanics at the cell-biomaterial interface: Issues and challenges for assessing the role of substrate mechanics on cell response. *Surface Science* **2004,** 570, 119-133.

164. Engler AJ, Griffin MA, Sen S, Bönnemann CG, Sweeney HL, Discher DE. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J Cell Biol* **2004,** 166, 877-887.

165. Oliver WC, Pharr GM. titre inconnu - demander article à INIST. *Journal of Materials Research* **1992,** 7, 1564-1583.

166. Balooch M, Wu-Magidi I-C, Balazs A, Lundkvist AS, Marshall SJ, Marshall GW, Siekhaus WJ, Kinney JH. Viscoelastic properties of demineralized human dentin measured in water with atomic force microscope (AFM)-based indentation. *J Biomed Mat Res* **1998,** 40, 539-544.

167. Attard P, Parker JL. Deformation and adhesion of elastic bodies in contact. *Phys Rev A* **1992,** 46, 7959-7971.

168. Attard P. Interaction and deformation of viscoelastic particles: nonadhesive particles. *Phys Rev E* **2001,** 63, 1-9.

169. Attard P. Interaction and deformation of viscoelastic particles. 2. Adhesive particles. *Langmuir* **2001,** 17, 4322-4328.

170. Attard P. Interaction and deformation of viscoelastic particles: Nonadhesive particles. *Physical Review E (Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics)* **2001,** 63, 061604.

171. Mahaffy RE, Shih CK, MacKintosh FC, Käs J. Scanning probe-based frequency-dependent microrheology of polymer gels and biological cells. *Phys Rev Lett* **2000,** 85, 880-883.

172. Mahaffy RE, Park SY, Gerde E, Käs J, Shih CK. Quantitative analysis of the viscoelastic properties of thin regions of fibroblasts using atomic force microscopy. *Biophys J* **2004,** 86, 1777-1793.

173. Tyrrell JWG, Attard P. Viscoelastic study using an atomic force microscope modified to operate as a nanorheometer. *Langmuir* **2003,** 19, 5254-5260.

174. Decher G, Schmitt J. Fine-tuning of the film thickness of ultrathin multilayer films composed of consecutively alternating layers of anionic and cationic polyelectrolytes. *Prog Colloids Polymers Sci* **1992,** 89, 160-164.

175. Dejeu J, Buisson L, Guth MC, Roidor C, Membrey F, Charraut D, Foissy A. Early steps of the film growth mechanism in self-assembled multilayers of PAH and PSS on silica: Polymer uptake, charge balance and AFM analysis *Colloids Surf A* **2006**, In Press.

176. Zimmerman E, Geiger B, Addadi L. Initial stages of cell-matrix adhesion can be mediated and modulated by cell-surface hyaluronan. *Biophys J* **2002,** 82, 1848-1857.

177. Hutter JL, Chen J, Wan WK, Uniyal S, Leabus M, Chan BMC. Atomic force microscopy investigation of the dependence of cellular elastic moduli on glutaraldehyde fixation. *J Microsc* **2005,** 219, 61-68.

178. Georges PC, Janmey PA. Cell type-specific response to growth on soft materials. *J Appl Physiol* **2005,** 98, 1547-1553.

179. Kuijpers AJ, Engbers GH, Krijgsveld J, Zaat SA, Dankert J, Feijen J. Cross-linking and characterization of gelatin matrices for biomedical applications. *J Biomat Sci - Polym E* **2000,** 11, 225-243.

180. Lösche M, Schmitt J, Decher G, Bouwman WG, Kjaer K. Detailed of structure of molecularly thin polyelectrolyte multilayer films on solid substrates as revealed by neutron reflectometry. *Macromol* **1998,** 31, 8893-8906.

181. Hoogeveen NG, Cohen Stuart MA, Fleer GJ, Böhmer MR. Formation and Stability of Multilayers of Polyelectrolytes. *Langmuir* **1996,** 12, 3675-3681.

182. Schlenoff J, Ly H, Li M. Charge and mass balance in polyelectrolyte multilayers. *J Am Chem Soc* **1998,** 120, 7626-7634.

183. Schlenoff JB, Dubas ST. Mechanism of Polyelectrolyte Multilayer Growth: Charge Overcompensation and Distribution. *Macromol* **2001,** 34, 592-598.

184. Castelnovo M, Joanny JF. Formation of Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir* **2000,** 16, 7524-7532.

185. Kim DK, Han SW, Kim CH, Hong JD, Kim K. Morphology of multilayers assembled by electrostatic attraction of oppositely charged model polyelectrolytes. *Thin Solid Films* **1999,** 350, 153-160.

186. Genes NG, Rowley JA, Mooney DJ, Bonassar LJ. Effect of substrate mechanics on chondrocyte adhesion to modified alginate surfaces. *Arch Biochem Biophys* **2004,** 422, 161-167.

187. Rowley JA, Mooney DJ. Alginate type and RGD density control myoblast phenotype. *J Biomed Mat Res* **2002,** 60, 217-223.

188. Benkirane-Jessel N, Schwinté P, Falvey P, Darcy R, Haïkel Y, Schaaf P, Voegel J-C, Ogier J. Build-up of polypeptide multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxicam-cyclodextrin complexes. *Advanced functional materials* **2004,** 14, 174-182.

189. Groth T, Lendlein A. Layer-by-layer deposition of polyelectrolytes--a versatile tool for the in vivo repair of blood vessels. *Angew Chem* **2004,** 43, 926-928.

190. Boura C, Muller S, Vautier D, Dumas D, Voegel J-C, Schaaf P, Stoltz J-F, Menu P. Endothelial cell-interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* **2005,** 26, 4568-4575.

191. Chluba J, Voegel J-C, Decher G, Erbacher P, Schaaf P, Ogier J. Peptide Hormone Covalently Bound to Polyelectrolytes and Embedded into Multilayer Architectures Conserving Full Biological Activity. *Biomacromol* **2001,** 2, 800-805.

192. Salloum DS, Olenych SG, Keller TCS, Schlenoff JB. Vascular smooth muscle cells on polyelectrolyte multilayers: Hydrophobicity-directed adhesion and growth. *Biomacromol* **2005,** 6, 161-167.

193. Berg MC, Yang SY, Hammond PT, Rubner MF. Controlling mammalian cell interactions on patterned polyelectrolyte multilayer surfaces. *Langmuir* **2004,** 20, 1362-1368.

194. Picart C, Elkaim R, Richert L, Audoin T, Arntz Y, Cardoso MD, Schaaf P, Voegel J-C, Frisch B. Primary cell adhesion on RGD-functionalized and covalently crosslinked thin polyelectrolyte multilayer films. *Adv Funct Mater* **2005,** 15, 83-94.

195. Koktysh DS, Liang X, Yun BG, Pastoriza-Santos I, Matts RL, Giersig M, Serra-Rodríguez C, Liz-Marzán LM, Kotov NA. Biomaterials by design: Layer-by-layer assembled ion-selective and biocompatible films of TiO2 nanoshells for neurochemical monitoring. *Adv Funct Mater* **2002,** 12, 255-265.

196. Richert L, Schneider A, Vautier D, Vodouhê C, Jessel N, Payan E, Schaaf P, Voegel J-C, Picart C. Imaging Cell Interactions With Native and Crosslinked Polyelectrolyte Multilayers *Cell Biochem Biophys* **2006,** 44, 273-286.

197. Tadmor R, Chen N, Israelachvili JN. Thin film rheology and lubricity if hyaluronic acid solutions at a normal physiological concentration. *J Biomed Mat Res* **2002,** 61, 514-523.

198. Schneider A. Modulation de l'adhésion cellulaire sur les films multicouches de polyélectrolytes. Université Henry Poincaré, Nancy (France), 2006.

199. Medina-Torres L, Brito-De La Fuente E, Torrestiana-Sanchez B, Alonso S. Mechanical properties of gels formed by mixtures of mucilage gum (Opuntia ficus indica) and carrageenans. *Carbohydr Polym* **2003,** 52, 143-150.

200. Belyakova LE, Antipova AS, Semenova MG, Dickinson E, Matia Merino L, Tsapkina EN. Effect of sucrose on molecular and interaction parameters of sodium caseinate in aqueous solution: relationship to protein gelation. *Colloids Surf B* **2003,** 31, 31-46.

201. Chiou BS, English RJ, Khan SA. Rheology and Photo-Cross-Linking of Thiol-Ene Polymers. *Macromol* **1996,** 29, 5368-5374.

202. Van Den Bulcke A, Bogdanov B, De Rooze N, Schacht EH, Cornelissen M, Berghmans H. Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels. *Biomacromol* **2000,** 1, 31-38.

203. Lvov YM, Thin film nanofabrication by alternate adsorption of polyions, nanoparticles, and proteins. In *Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials ; Vol 3: Nanostructures Materials, Micelles, and Colloids*, Nalwa, H. S., Ed. Academic Press: 2001.

204. Caruso F, Spasova M, Salgueirin-Maceira V, Liz-Marzan LM. Multilayer assemblies of silica-encapsulated gold nanoparticles on decomposable colloid templates. *Adv Mater* **2001,** 13, 1090-1094.

205. Michel M, Vautier D, Voegel J-C, Schaaf P, Ball V. Incorporation of liposomes into layer by layer self assembled polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* **2004,** 20.

206. Panchagnula V, Kumar CV, Rusling JF. Ultrathin Layered Myoglobin-Polyion Films Functional and Stable at Acidic pH Values. *J Am Chem Soc* **2002,** 124, 12515 - 12521.

207. Vuillaume PY, Jonas AM, Laschewsky A. Ordered Polyelectrolyte "Multilayers". 5. Photo-Cross-Linking of Hybrid Films Containing an Unsaturated and Hydrophobized Poly(diallylammonium) Salt and Exfoliated Clay. *Macromol* **2002,** 35, 5004-5012.

208. Harris JJ, DeRose P, Bruening M. Synthesis of passivating, nylon-like coatings through cross-linking of ultrathin polyelectrolyte films. *J Am Chem Soc* **1999,** 121, 1978-1979.

209. Chen J, Huang L, Ying L, Luo G, Zhao X, Cao W. Self-assembly ultrathin films based on diazoresins. *Langmuir* **1999,** 15, 7208 -7212.

210. Dai J, Jensen A, Mohanty D, Erndt J, Bruening M. Controlling the permeability of multilayered polyelectrolyte films through derivatization, cross-linking, and hydrolysis. *Langmuir* **2001,** 17, 931-937.

211. Arys X, Jonas A, Laschewsky A, Legras R, Supramolecular polyelectrolyte assemblies. In *Supramolecular Polymers*, Ciferri, A., Ed. Marcel Dekker: New York, 2000; pp 505-564.

212. Bertrand P, Jonas A, Laschewsky A, Legras R. Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: Suitable materials, structure, properties. *Macromol Rapid Commun* **2000,** 21, 319-348.

213. Decher G, Schlenoff JB, Eds. Multilayer Thin Films - Sequential Assembly of Nanocomposite Materials. *Wiley-VCH, Weinheim,* **2003**.

214. Kügler R, Schmitt J, Knoll W. The Swelling Behavior of Polyelectrolyte Multilayers in Air of Different Relative Humidity and in Water. *Macromol Chem Phys* **2002,** 203, 413-419.

215. Steitz R, Leiner V, Siebrecht R, Klitzing RV. Influence of the ionic strength on the structure of polyelectrolyte films at the solid/liquid interface. *Colloids Surf A* **2000,** 163, 63-70.

216. Dubas ST, Schlenoff JB. Polyelectrolyte Multilayers Containing a Weak Polyacid: Construction and Deconstruction. *Macromol* **2001,** 34, 3736.

217. Dubas ST, Schlenoff JB. Swelling and smoothing of polyelectrolyte multilayers by salt. *Langmuir* **2001,** 17, 7725-7727.

218. Wang TC, Cohen RE, Rubner MF. Metallodielectric photonic structures based on polyelectrolyte multilayers. *Adv Mater* **2002,** 14, 1534-1537

219. Kharlampieva E, Sukhishvili SA. Ionization and pH Stability of Multilayers Formed by Self-Assembly of Weak Polyelectrolytes. *Langmuir* **2003,** 19, 1235-1243.

220. Georgieva R, Moya S, Leporatti S, Neu B, Baumler H, Reichle C, Donath E, Möhwald H. Conductance and capacitance of polyelectrolyte and lipid polyelectrolyte composite capsules as measured by electrorotation. *Langmuir* **2000,** 16, 7075-7081.

221. Moya S, Donath E, Sukhorukov GB, Auch M, Baumler H, Lichtenfeld H, Möhwald H. Lipid Coating on Polyelectrolyte Surface Modified Colloidal Particles and Polyelectrolyte Capsules. *Macromol* **2000,** 33, 4538-4544.

222. Kügler R, Knoll W. Polyelectrolyte-supported lipid membranes *Bioelectrochem* **2002,** 56, 175-178.

223. Ai H, Jones SA, de Villiers MM, Lvov YM. Nano-encapsulation of furosemide microcrystals for controlled drug release. *J Control Release* **2003,** 86, 59-68.

224. Trau D, Renneberg R. Encapsulation of glucose oxidase microparticles within a nanoscale layer-by-layer film: immobilization and biosensor applications. *Biosensors & Bioelectronics* **2003,** 18, 1491-1499.

225. Vodouhê C, Le Guen E, Garza JM, Francius G, Déjugnat C, Ogier J, Schaaf P, Voegel JC, Lavalle P. Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* **2006,** 27, 4149-4156.

226. Ratner BD, Hoffman A, Schoen FJ, Lemons JE, *Biomaterials science : an introduction to materials in medecine*. Academic Press: 2004.

227. Kasemo B. Biological surface science. *Surf Sci* **2002,** 500, 656-677.

228. Jones FH. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Surf Sci Reports* **2001,** 42, 75-205.

229. Ito Y, Zheng J, Imanishi Y, Yonezawa K, Kasuga M. Protein-free cell culture on an artificial substrate with covalently immobilized insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996,** 93, 3598-3601.

230. Ito Y, Chen GP, Imanishi Y. Micropatterned immobilization of epidermal growth factor to regulate cell function. *Bioconj Chem* **1998,** 9, 277-282.

231. Murphy WL, Peters MC, Kohn DH, Mooney DJ. Sustained release of vascular endothelial growth factor from mineralized poly(lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **2000,** 21, 2521-2527.

232. Grayson ACR, Choi IS, Tyler BM, Wang PP, Brem H, Cima MJ, Langer R. Multi-pulse drug delivery from a resorbable polymeric microchip device. *Nature Materials* **2003,** 2, 767-772.

233. Benkirane-Jessel N, Lavalle P, Meyer F, Audouin F, Frisch B, Schaaf P, Ogier J, Decher G, Voegel J-C. Control of monocyte morphology on and response to model surfaces for implants equipped with anti-inflammatory agents. *Advanced Materials* **2004,** 16, 1507-1511.

234. Zhu YB, Gao CY, He T, Liu XY, Shen JC. Layer-by-layer assembly to modify poly(L-lactic acid) surface toward improving its cytocompatibility to human endothelial cells. *Biomacromol* **2003,** 4, 446-452.

235. Sukhishvili SA. Responsive polymer films and capsules via layer-by-layer assembly. *Curr Opin Colloid In Sci* **2005,** 10, 37-44.

236. Caruso F, Niikura K, Furlong DN, Okahata Y. 2. Assembly of Alternating Polyelectrolyte and Protein Multilayer Films for Immunosensing. *Langmuir* **1997,** 13, 3427-3433.

237. Caruso F, Schuler C. Enzyme multilayers on colloid particles: Assembly, stability, and enzymatic activity. *Langmuir* **2000,** 16, 9595-9603.

238. Tezcaner A, Hicks D, Boulmedais F, Sahel J, Schaaf P, Voegel J-C, Lavalle P. Polyelectrolyte multilayer films as substrates for photoreceptor cells. *Biomacromol* **2006,** 7, 86-94.

239. Boulmedais F, Frisch B, Etienne O, Lavalle P, Picart C, Ogier J, Voegel J-C, Schaaf P, Egles C. Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of antimicrobial protection for biomaterials. *Biomaterials* **2004,** 25, 2003-2011.

240. Fonseca C, Simoes S, Gaspar RE. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J Control Release* **2002,** 83, 273-286.

241. Gibbs JB. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science* **2000,** 287, 1969-1973.

242. Attawia MA, Borden MD, Herbert KM, Katti DS, Asrari F, Uhrich KE, Laurencin CT. Regional drug delivery with radiation for the treatment of Ewing's sarcoma: In vitro development of a taxol release system. *J Control Release* **2001,** 71, 193-202.

243. Ruan G, Feng SS. Preparation and characterization of poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid) (PLA-PEG-PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel. *Biomaterials* **2003,** 24, 5037-5044.

244. Soga O, van Nostrum CF, Fens M, Rijcken CJF, Schiffelers RM, Storm G, Hennink WE. Thermosensitive and biodegradable polymeric micelles for paclitaxel delivery. *J Control Release* **2005,** 103, 341-353.

245. Heldman AW, Cheng L, Jenkins GM, Heller PF, Kim DW, Ware M, Nater C, Hruban RH, Rezai B, Abella BS, Bunge KE, Kinsella JL, Sollott SJ, Lakatta EG, Brinker JA, Hunter WL, Froehlich JP. Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis. *Circulation* **2001,** 103, 2289-2295.

246. Park SJ, Shim WH, Ho DS, Raizner AE, Park SW, Hong MK, Lee CW, Choi DH, Jang YS, Lam R, Weissman NJ, Mintz GS. A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis. *New England Journal of Medicine* **2003,** 348, 1537-1545.

247. Liistro F, Stankovic G, Di Mario C, Takagi T, Chieffo A, Moshiri S, Montorfano M, Carlino M, Briguori C, Pagnotta P, Albiero R, Corvaja N, Colombo A. First clinical experience with a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system implantation for in-stent

restenosis - Immediate and long-term clinical and angiographic outcome. *Circulation* **2002,** 105, 1883-1886.

248. Morice M, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Hayashi EB, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *New England Journal of Medicine* **2002,** 346, 1773-1780.

249. Thierry B, Winnik FM, Merhi Y, Silver J, Tabrizian M. Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers. *Biomacromol* **2003,** 4, 1564-1571.

250. Guyomard A, Nysten B, Muller G, Glinel K. Loading and release of small hydrophobic molecules in multilayer films based on amphiphilic polysaccharides. *Langmuir* **2006,** 22, 2281-2287.

251. Luo Y, Prestwich GD. Synthesis and selective cytotoxicity of a hyaluronic acid-antitumor bioconjugate. *Bioconj Chem* **1999,** 10, 755-763.

252. Luo Y, Ziebell MR, Prestwich GD. A hyaluronic acid-taxol antitumor bioconjugate targeted to cancer cells. *Biomacromol* **2000,** 1, 208-218.

253. Thierry B, Kujawa P, Tkaczyk C, Winnik FM, Bilodeau L, Tabrizian M. Delivery platform for hydrophobic drugs: Prodrug approach combined with self-assembled multilayers. *J Am Chem Soc* **2005,** 127, 1626-1627.

254. Hübsch E, Fleith G, Fatisson J, Labbé P, Voegel J-C, Schaaf P, Ball V. Multivalent ion/polyelectrolyte exchange processes in exponentially growing multilayers. *Langmuir* **2005,** 21, 3664-3669.

255. Ball V, Hübsch E, Schweiss R, Voegel J-C, Schaaf P, Knoll W. Interactions between multivalent ions and exponentially growing multilayers: dissolution and exchange processes. *Langmuir* **2005,** 21, 8526-8531.

256. Fukuda J, Khademhosseini A, Yeh J, Eng G, Cheng J, Farokhzad OC, Langer R. Micropatterned cell co-cultures using layer-by-layer deposition of extracellular matrix components. *Biomaterials* **2006,** 27, 1479-1486.

257. Picart C, Mutterer J, Arntz Y, Voegel J-C, Schaaf P, Senger B. Application of fluorescence recovery after photobleaching to diffusion of a polyelectrolyte in a multilayer film. *Microsc Res Tech* **2005,** 66, 43-57.

258. Khademhosseini A, Suh KY, Yang JM, Eng G, Yeh J, Levenberg S, Langer R. Layer-by-layer deposition of hyaluronic acid and poly-L-lysine for patterned cell co-cultures. *Biomaterials* **2004,** 25, 3583-3592.

259. Donati I, Stredanska S, Silvestrini G, Vetere A, Marcon P, Marsich E, Mozetic P, Gamini A, Paoletti S, Vittur F. The aggregation of pig articular chondrocyte and synthesis of extracellular matrix by a lactose-modified chitosan. *Biomaterials* **2005,** 26, 987-998.

260. Tryoen-Toth P, Vautier D, Haïkel Y, Voegel J-C, Schaaf P, Chluba J, Ogier J. Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films. *J Biomed Mat Res* **2002,** 60, 657-667.

261. Vautier D, Karsten V, Egles C, Chluba J, Schaaf P, Voegel J-C, Ogier J. Polyelectrolyte multilayer films modulate cytoskeletal organization in chondrosarcoma cells. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2002,** 13, 713-732.

262. Press WH, Flannery BP, Tevkolsky SA, Vetterling WT, *Numerical Recipes in Pascal : The art of scientific computing*. Cambridg University Press: Cambridge, 1989.

263. Rotsch C, Radmacher M. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: An atomic force microscopy study. *Biophys J* **2000,** 78, 520-535.

264. Schäfer A, Radmacher M. Influence of myosin II activity on stiffness of fibroblast cells. *Acta Biomat* **2005,** 1, 273-280.

265. Touhami A, Nysten B, Dufrêne YF. Nanoscale mapping of the elasticity of microbial cells by atomic force microscopy. *Langmuir* **2003,** 19, 4539-4543.

266. Park S, Koch D, Cardenas R, Käs J, Shih CK. Cell motility and local viscoelasticity of fibroblasts. *Biophys J* **2005,** 89, 4330-4342.

267. Smith BA, Tolloczko B, Martin JG, Grütter P. Probing the viscoelastic behavior of cultured airway smooth muscle cells with atomic force microscopy: Stiffening induced by contractile agonist. *Biophys J* **2005,** 88, 2994-3007.

268. Alcaraz J, Buscemi L, Grabulosa M, Trepat X, Fabry B, Farré R, Navajas D. Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophys J* **2003,** 84, 2071-2079.

269. Walker GC, Sun Y, Guo S, Finlay JA, Callow ME, Callow JA. Surface mechanical properties of the spore adhesive of the Green Alga Ulva. *The Journal of Adhesion* **2005,** 81, 1101-1118.

270. Provenzano PP, Lakes R, Keenan T, Vanderby Jr R. Nonlinear ligament viscoelasticity. *Ann Biomed Eng* **2001,** 29, 908-914.

271. Provenzano PP, Lakes R, Corr DT, Vanderby Jr R. Application of nonlinear viscoelastic models to describe ligament behavior. *Biomechan Model Mechanobiol* **2002,** 1, 45-57.

272. Lakes RS, Vanderby R. Interrelation of creep and relaxation: A modeling approach for ligaments. *J Biomech Eng* **1999,** 121, 912-615.

273. Decher G, Hong JD. *Ber Bunsenges Phys Chem* **1991,** 95, 1430.

274. Schönhoff M. Self-assembled polyelectrolyte multilayers. *Curr Opin Colloid In Sci* **2003,** 8, 86-95.

275. Fou AC, Onitsuka O, Ferreira M, Rubner MF, Hsieh BR. Fabrication and properties of light-emitting diodes based on self-assembled multilayers of poly(phenylene vinylene). *J Appl Phys* **1996,** 79, 7501-7509

276. Eckle M, Decher G. Tuning the Performance of Layer-by-Layer Assembled Organic Light Emitting Diodes by Controlling the Position of Isolating Clay Barrier Sheets. *Nano Lett* **2001,** 1, 45-49.

277. Lukkari J, Salomäki M, Aaritalo T, Loikas K, Laiho T, Kankare J. Preparation of multilayers containing conjugated thiophene- based polyelectrolytes. Layer-by-layer assembly and viscoelastic properties. *Langmuir* **2002,** 18, 8496-8502.

278. Serizawa T, Yamaguchi M, Matsuyama T, Akashi M. Alternating Bioactivity of Polymeric Layer-by-Layer Assemblies: Anti- vs Procoagulation of Human Blood on Chitosan and Dextran Sulfate Layers. *Biomacromol* **2000,** 1, 306 -309.

279. Jewell CM, Zhang J, Fredin NJ, Lynn DM. Multilayered polyelectrolyte films promote the direct and localized delivery of DNA to cells. *J Control Release* **2005,** 106, 214-223.

280. Tieke B, Van Ackern F, Krasemann L, Toutianoush A. Ultrathin self-assembled polyelectrolyte multilayer membranes. *European Phys J E* **2001,** 5, 29-39.

281. Sui ZJ, Salloum D, Schlenoff JB. Effect of molecular weight on the construction of polyelectrolyte multilayers: Stripping versus sticking. *Langmuir* **2003,** 19, 2491-2495.

282. Steitz R, Jaeger W, Von Klitzing R. Influence of Charge Density and Ionic Strength on the Multilayer Formation of Strong Polyelectrolytes *Langmuir* **2001,** 17, 4471-4474.

283. Kolarik L, Furlong DF, Joy H, Struijik C, Rowe R. Building assemblies from high molecular weight polyelectrolytes. *Langmuir* **1999,** 15, 8265-8275.

284. Tan Q, Ji J, Barbosa MA, Fonseca C, Shen J. Constructing thromboresistant surface on biomedical stainless steel via layer-by-layer deposition anticoagulant. *Biomaterials* **2003,** 24, 4699-4705.

285. Debreczeny M, Ball V, Boulmedais F, Szalontai B, Voegel J-C, Schaaf P. Multilayers built from two component polyanions and single component polycation solutions: A way to engineer films with desired secondary structure. *J Phys Chem B* **2003,** 107, 12734-12739.

286. Büscher K, Ahrens H, Graf K, Helm CA. Influence of adsorption conditions on the structure of polyelectrolyte multilayers *Langmuir* **2002,** 18, 3585-3591.

287. Hübsch E, Ball V, Senger B, Decher G, Voegel J-C, Schaaf P. Controlling the Growth Regime of Polyelectrolyte Multilayer Films: Changing from Exponential to Linear Growth by Adjusting the Composition of Polyelectrolyte Mixtures. *Langmuir* **2004,** 20, 1980-1985.

288. Cho J, Quinn JF, Caruso F. Fabrication of polyelectrolyte multilayer films comprising nanoblended layers. *J Am Chem Soc* **2004,** 126, 2270-2271.

289. Quinn JF, Yeo JCC, Caruso F. Layer-by-Layer Assembly of Nanoblended Thin Films: Poly(allylamine hydrochloride) and a Binary Mixture of a Synthetic and Natural Polyelectrolyte *Macromol* **2004,** 37, 6537-6543

290. Sun J, Wang L, Gao J, Wang ZQ. Control of composition in the multilayer films fabricated from mixed solutions containing two dendrimers. *J Colloid Interface Sci* **2005,** 287, 207-212.

291. Leporatti S, Gao C, Voigt A, Donath E, Möhwald H. Shrinking of ultrathin polyelectrolyte multilayer capsules upon annealing: A confocal laser scanning microcopy and scanning force microscopy study. *European Phys J E* **2001,** 5, 13-20.

292. Sui Z, Schlenoff JB. Controlling electroosmotic flow in microchannels with pH-responsive polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* **2003,** 19, 7829-7831.

293. Li Q, Quinn JF, Caruso F. Nanoporous Polymer Thin Films Via Polyelectrolyte Templating. *Adv Mater* **2005,** 17, 2058-2062.

294. Malmsten M, Lassen B. Competitive adsorption at hydrophobic surfaces from binary protein systems. *J Colloid Interface Sci* **1994,** 166, 490-498.

295. Hayes SA, Goruppa AA, Jones FR. Dynamic nanoindentation as a tool for the examination of polymeric materials. *J Mat Res* **2004,** 19, 3298-3306.

296. Domke J, Dannohl S, Parak WJ, Muller O, Aicher WK, Radmacher M. Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy. *Colloids Surf B* **2000,** 19, 367-379.

297. Tomihata K, Ikada Y. Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *J Biomed Mater Res* **1997,** 37, 243-251.

298. Luo Y, Kirker KR, Prestwich GD. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. *J Control Release* **2000,** 69, 169-184.

299. Welsh ER, Schauer CL, Santos JP, Price RR. In Situ Cross-Linking of Alternating Polyelectrolyte Multilayer Films *Langmuir* **2004,** 20, 1807-1811.

300. Richert L, Lavalle P, Vautier D, Senger B, Stoltz J-F, Schaaf P, Voegel J-C, Picart C. Cell Interactions with Polyelectrolyte Multilayer Films. *Biomacromol* **2002,** 3, 1170-1178.

301. Garza JM, Jessel N, Ladam G, Dupray V, Muller S, Stoltz J-F, Schaaf P, Voegel J-C, Lavalle P. Polyelectrolyte multilayers and degradable polymer layers as multicompartment films. *Langmuir* **2005,** 21, 12372-12377.

302. Schneider A, Bolcato AL, Francius G, Jedrzejwska J, Schaaf P, Voegel J-C, Frisch B, Picart C. Glycosylated polyelectrolyte multilayer films: differential adhesion of primary versus tumor cells. *Biomacromol* **2006**, 7, 2882-2889.

Liste des publications

Effect of cross-linking on the elasticity of polyelectrolyte multilayer films measured by colloidal probe AFM, Francius G, Hemmerlé J, Ohayon J, Schaaf P, Voegel J-C, Picart C and Senger B. *Microscopy Research and Technique* **69** 84-92 (2006)

Polyelectrolyte multilayers with a tunable Young's modulus: Influence of film stiffness on cell adhesion, Schneider A, Francius G, Obeid R, Schwinté P, Hemmerlé J, Frisch B, Schaaf P, Voegel J-C, Senger B and Picart C. *Langmuir* **22** 1193-1200 (2006)

AFM force spectroscopy of the fibrinogen adsorption process onto dental implants, Boukari A, Francius G and Hemmerlé J. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A.* **78** 466-472 (2006)

Control of the drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films, Vodouhe C, Leguen E, Mendez Garza J, Francius G, Dejugnat C, Ogier J, Schaaf P, Voegel J-C and Lavalle P. *Biomaterials,* **22** 4149-4156 (2006)

Glycated polyelectrolyte multilayer films: differential adhesion of primary versus tumor cells, Schneider A, Bolcato AL, Francius G, Jedrzejwska J, Schaaf P, Voegel J-C, Frisch B and Picart C. *Biomacromolecules,* **7** 2882-2889 (2006)

Anomalous thickness evolution of multilayer films made from poly-L-lysine and mixture of hyaluronan and polystyrene sulfonate, Francius G, .Hemmerlé J, Voegel J-C, Schaaf P, Senger B and Ball V. *Langmuir,* Soumis (2006)

Article 1

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Grégory Francius, Joseph Hemmerlé, Jacques Ohayon, Pierre Schaaf, Jean-Claude Voegel, Catherine Picart & Bernard Senger.

Effect of crosslinking on the elasticity of polyelectrolyte multilayer films measured by colloidal probe AFM.

Microscopy Research and Technique 69, 84-92 (2006)

Pages 84-92 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur /

http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/112395463/PDFSTART

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

Article 2

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Aurore Schneider**, Grégory Francius**, Rodolphe Obeid, Pascale Schwinté, Joseph Hemmerlé, Benoît Frisch, Pierre Schaaf, Jean-Claude Voegel, Bernard Senger, and Catherine Picart.

Polyelectrolyte multilayers with a tunable Young's modulus : influence of film stiffness on cell adhesion.

Langmuir 22, 1193-1200 (2006)

Pages 1193-1200 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur /

http://pubs.acs.org/cgi-bin/article.cgi/langd5/2006/22/i03/pdf/la0521802.pdf

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

Article 3

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Constant Vodouhê, Erell Le Guen, Juan Mendez Garza, **Grégory Francius**, Christophe Déjugnat, Joëlle Ogier, Pierre Schaaf, Jean-Claude Voegel, Philippe Lavalle.

Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films.

Biomaterials 27, 4149-4156 (2006)

Pages 4149-4156 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur /

http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.024

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

Article 4

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Abdessamad Boukari, **Grégory Francius**, Joseph Hemmerlé.

AFM force spectroscopy of the fibrinogen adsorption process onto dental implants.

Journal of biomedical materials research Part A 78, 466-472 (2006)

Pages 466-472 :

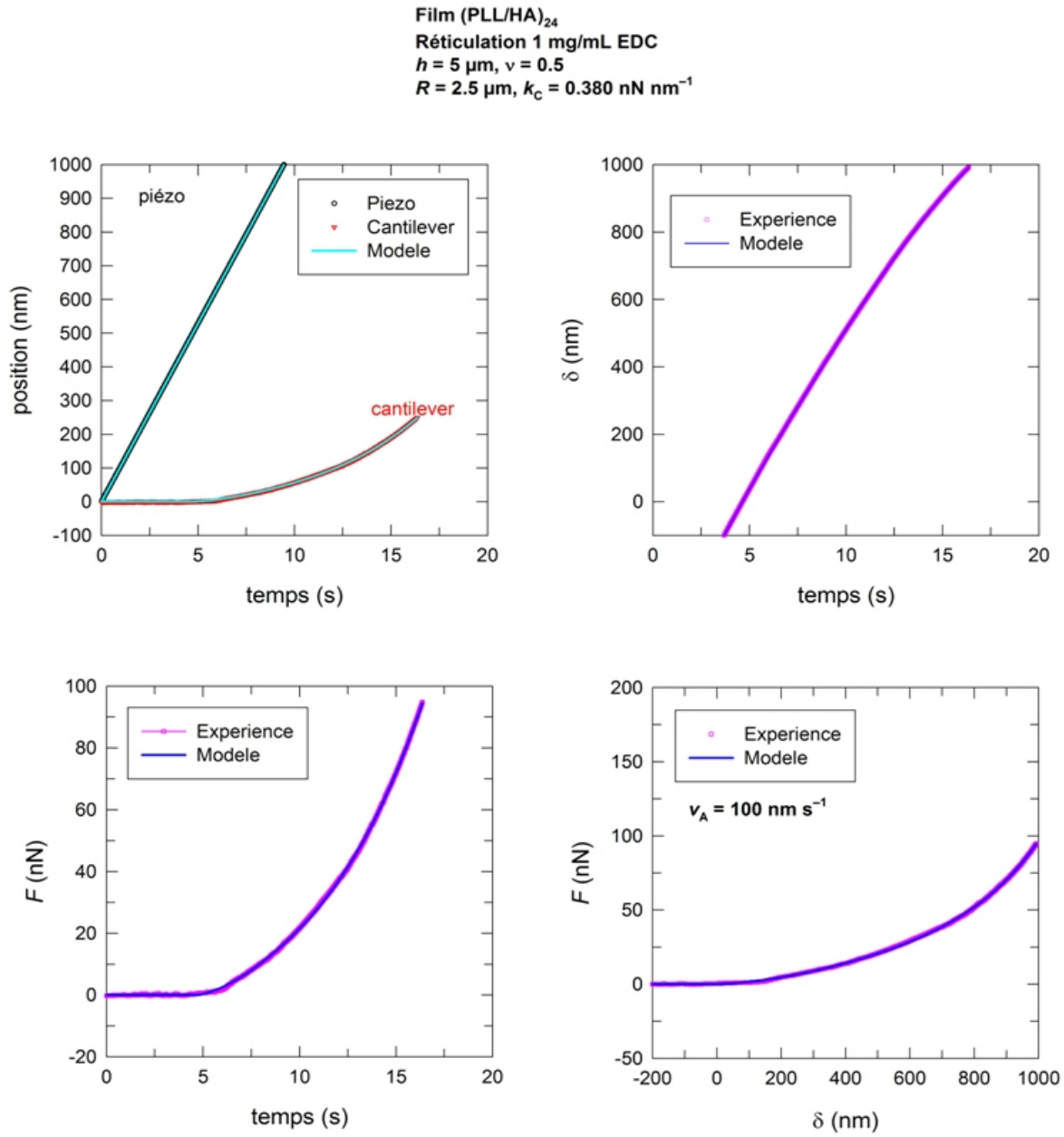
La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur /

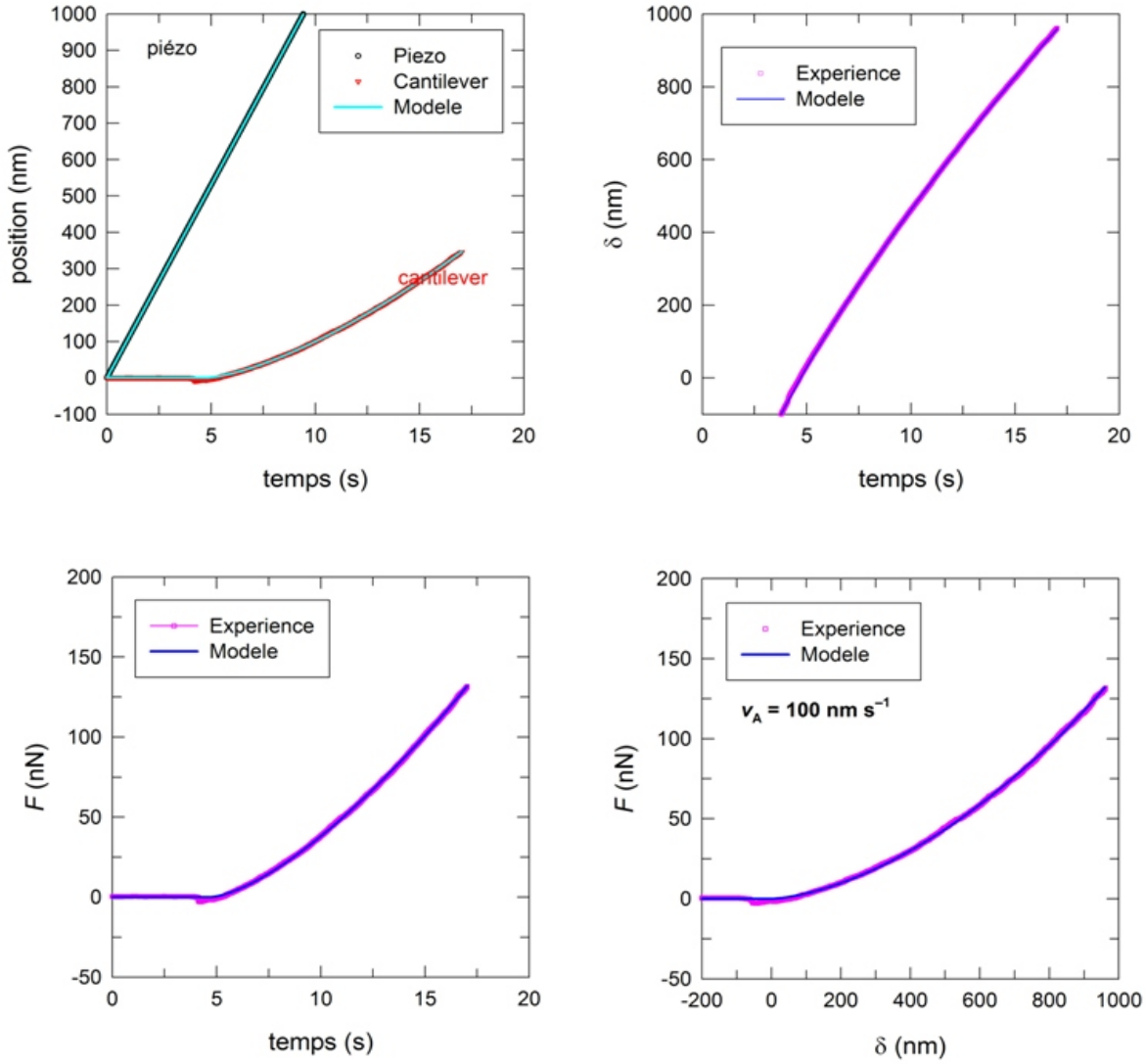
http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/112635860/PDFSTART

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

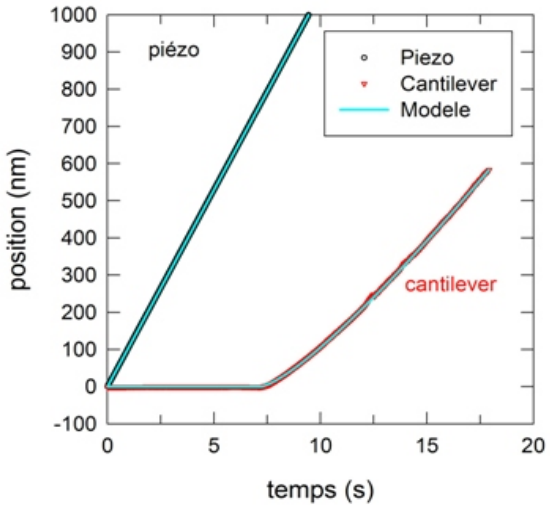
Annexe 1 (chapitre 3)

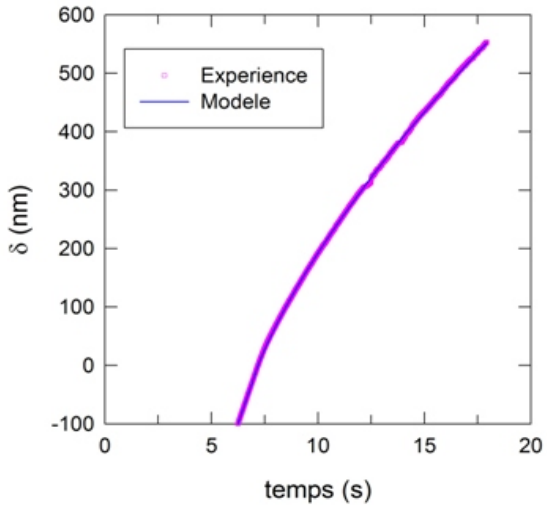


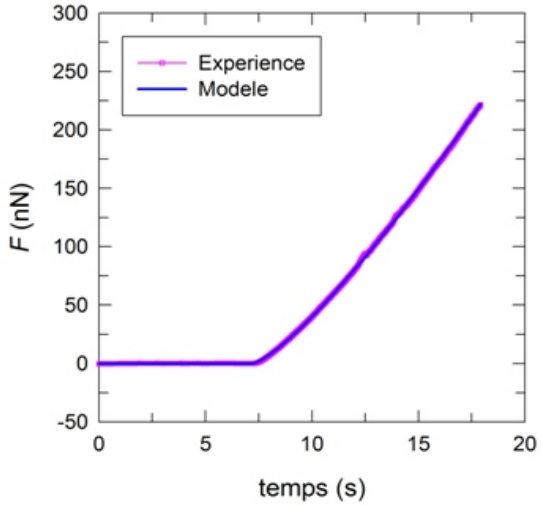
Film $(PLL/HA)_{24}$
Réticulation 2.5 mg/mL EDC
h = 5 µm, ν = 0.5
R = 2.5 µm, k_C = 0.380 nN nm^{-1}

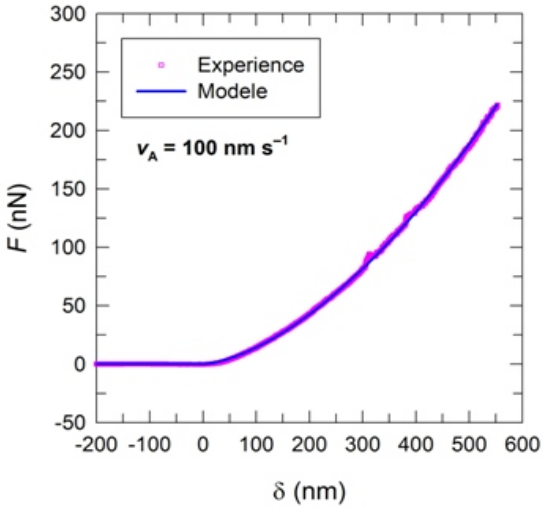


Film $(PLL/HA)_{24}$
Réticulation 5 mg/mL EDC
***h* = 5 µm, ν = 0.5**
***R* = 2.5 µm, k_C = 0.380 nN nm^{-1}**

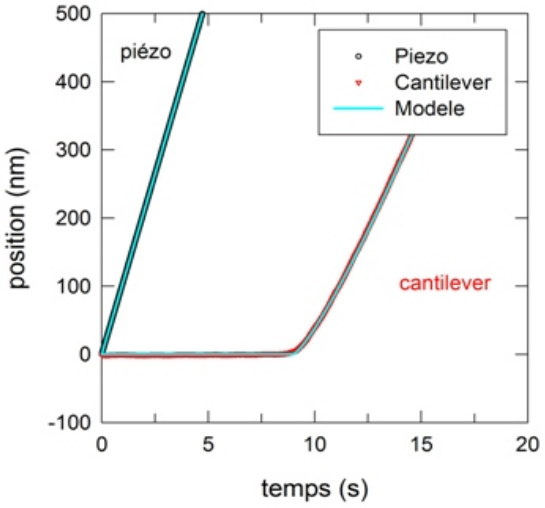


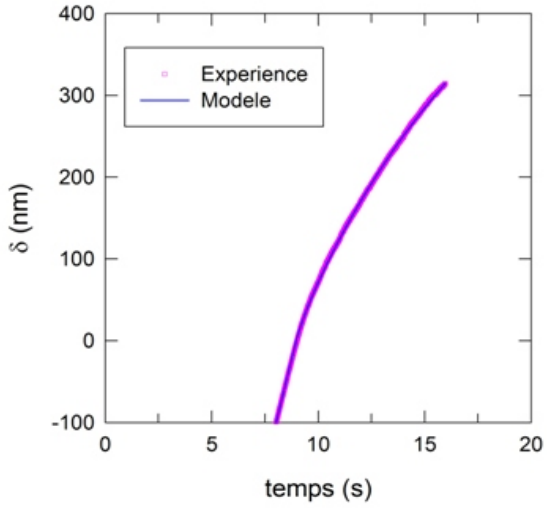


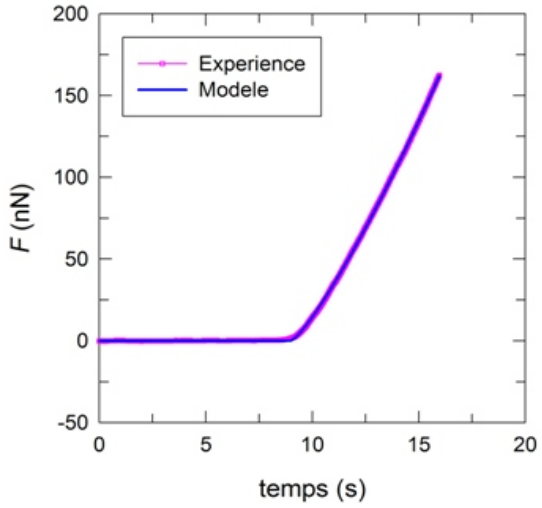


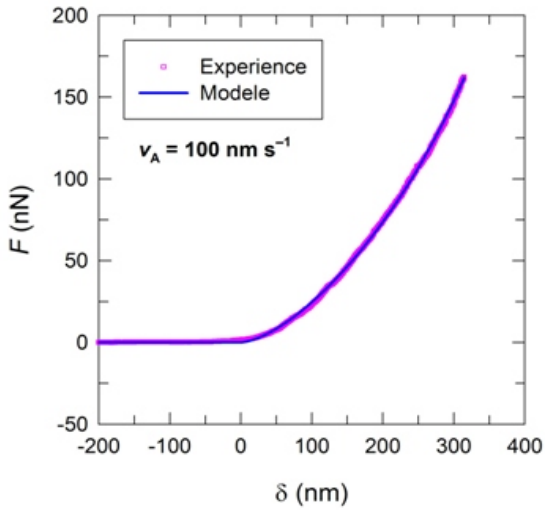


Film $(PLL/HA)_{24}$
Réticulation 10 mg/mL EDC
***h* = 5 µm, ν = 0.5**
***R* = 2.5 µm, k_c = 0.380 nN nm^{-1}**

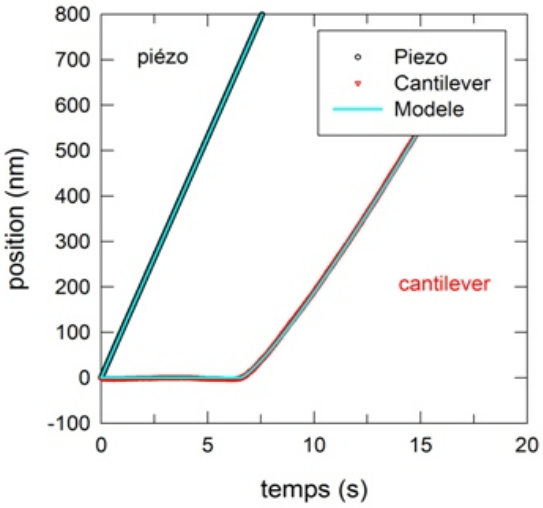


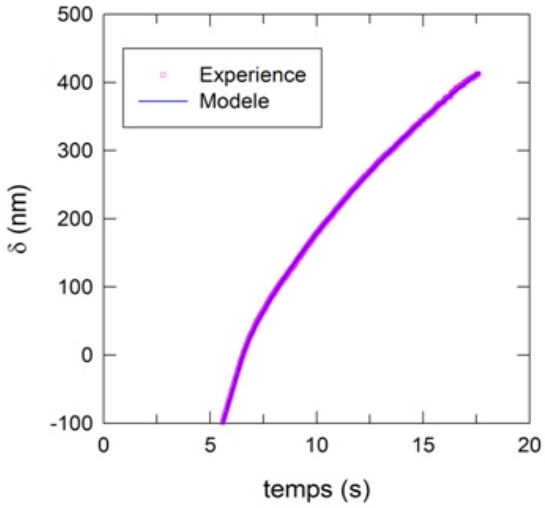


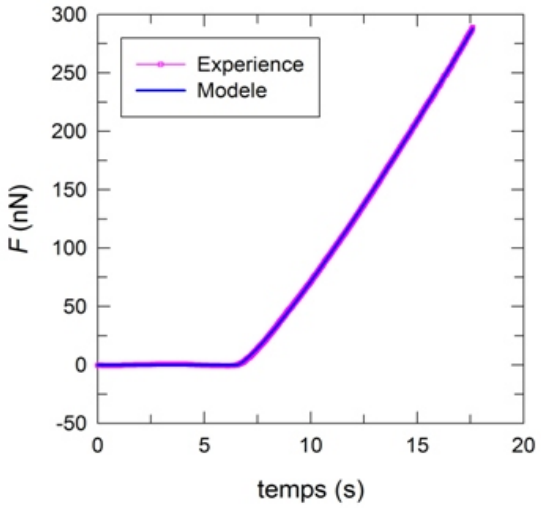


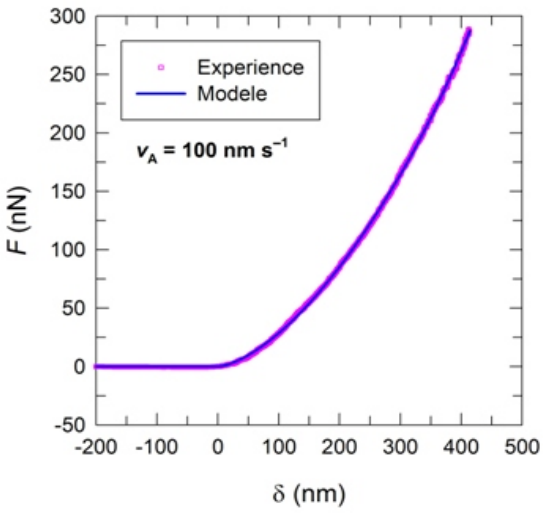


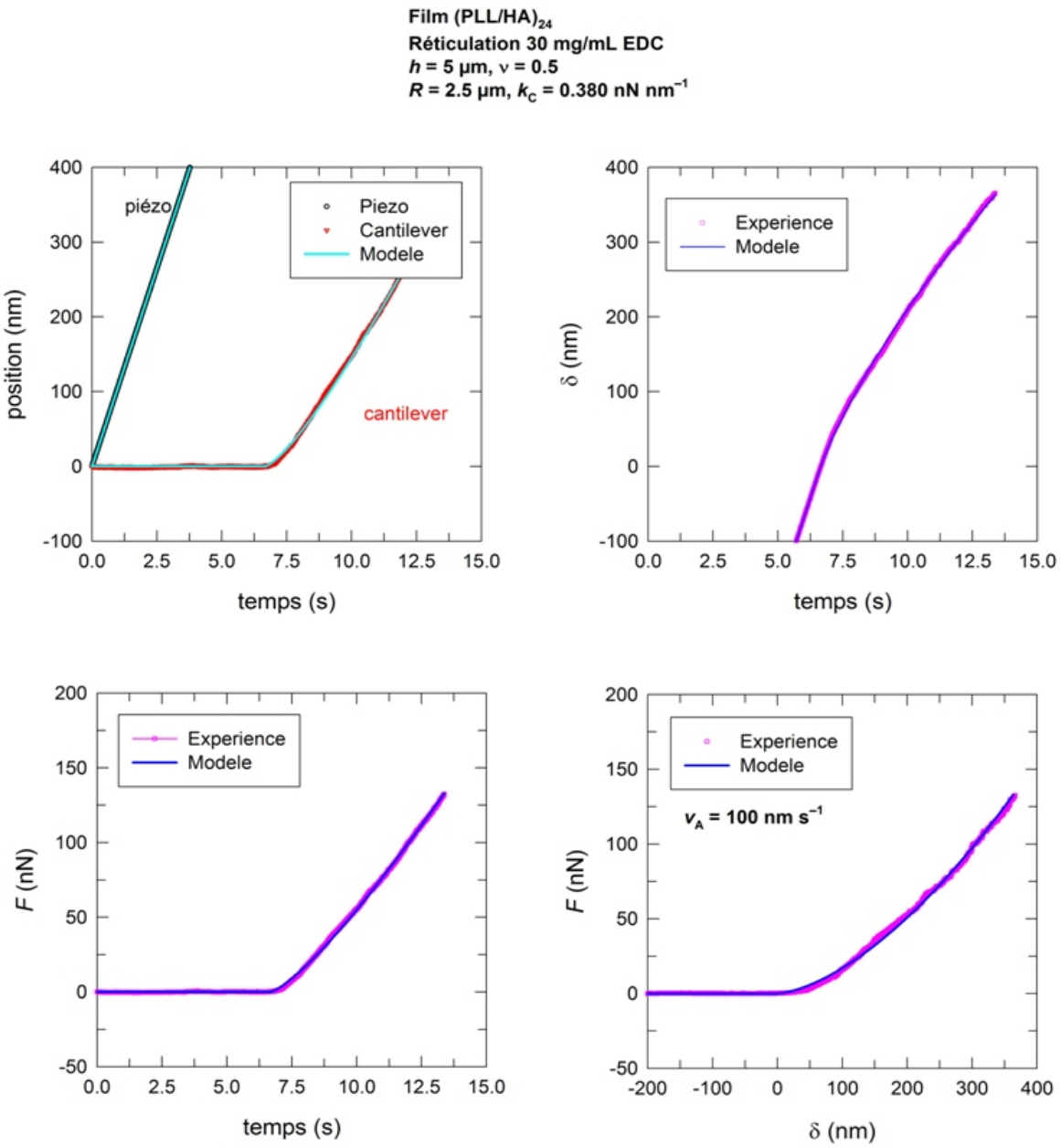
Film $(PLL/HA)_{24}$
Réticulation 20 mg/mL EDC
h = 5 µm, ν = 0.5
R = 2.5 µm, k_C = 0.380 nN nm^{-1}



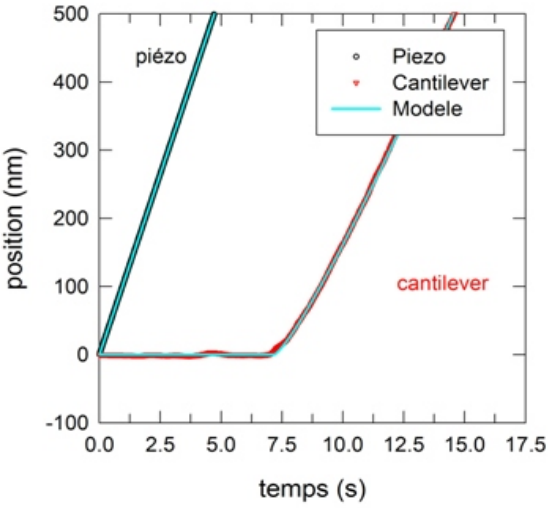


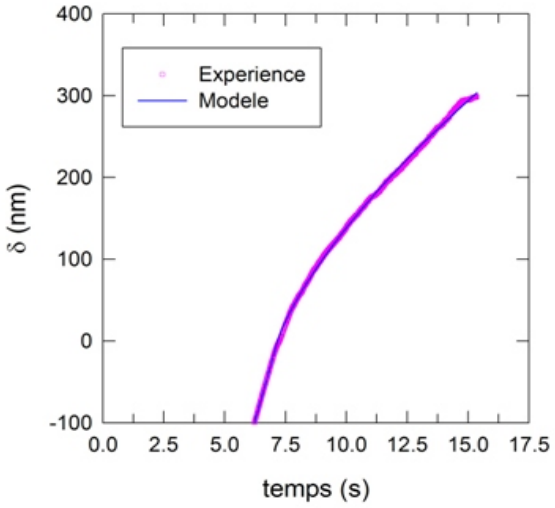


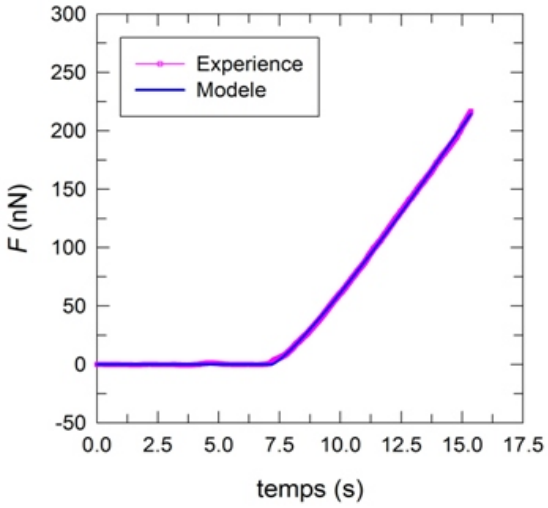


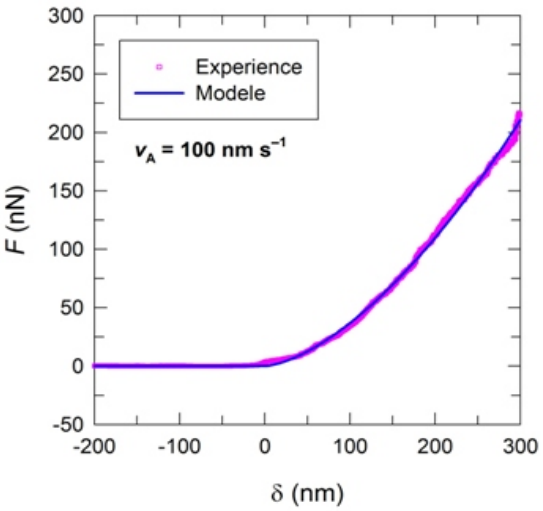

Film (PLL/HA)24
Réticulation 30 mg/mL EDC
h = 5 µm, ν = 0.5
R = 2.5 µm, kC = 0.380 nN nm−1
piézo
Piezo
Cantilever
Modele
cantilever
position (nm)
temps (s)
Experience
Modele
δ (nm)
temps (s)
Experience
Modele
F (nN)
temps (s)
Experience
Modele
vA = 100 nm s−1
F (nN)
δ (nm)

Film $(PLL/HA)_{24}$
Réticulation 40 mg/mL EDC
h = 5 µm, ν = 0.5
R = 2.5 µm, k_C = 0.380 nN nm^{-1}

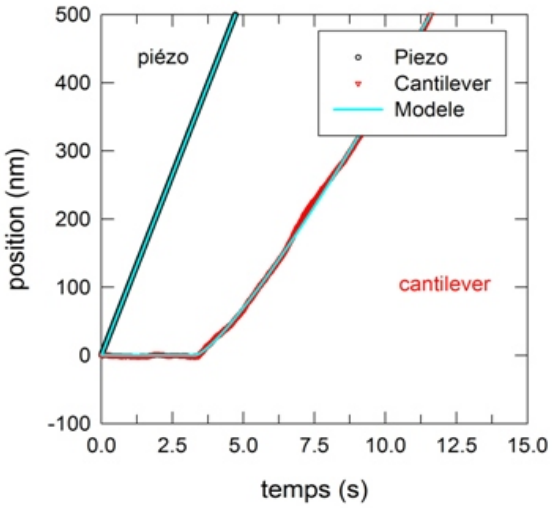


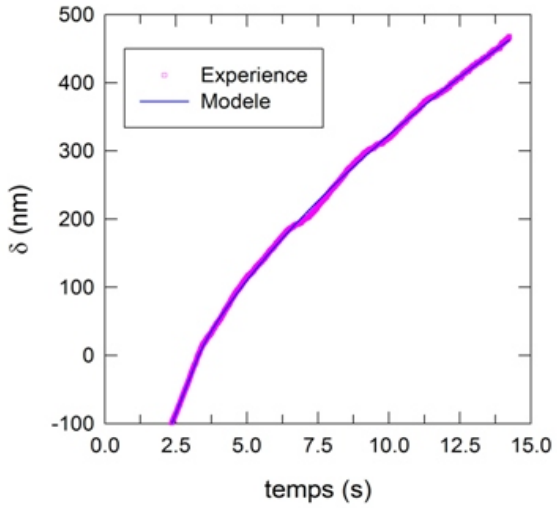


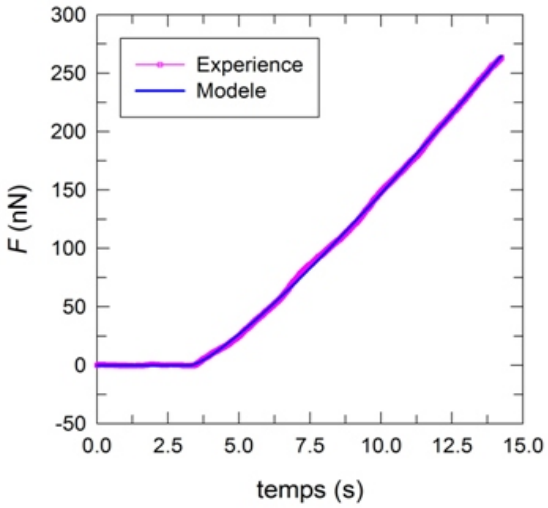


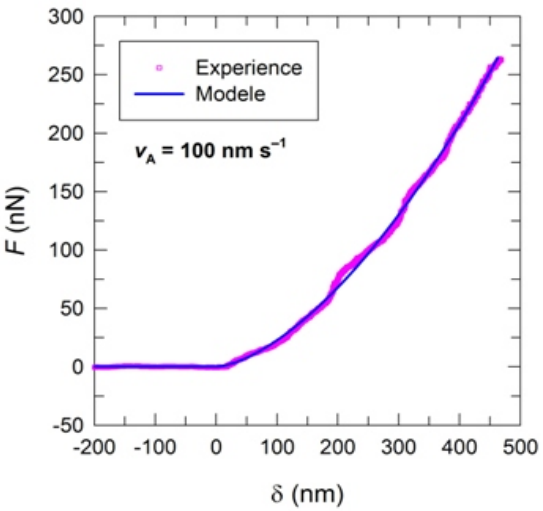


Film $(PLL/HA)_{24}$
Réticulation 50 mg/mL EDC
h = 5 µm, ν = 0.5
R = 2.5 µm, k_C = 0.380 nN nm^{-1}

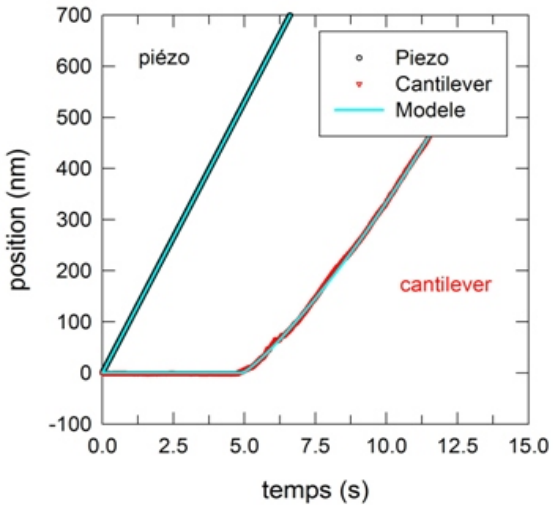


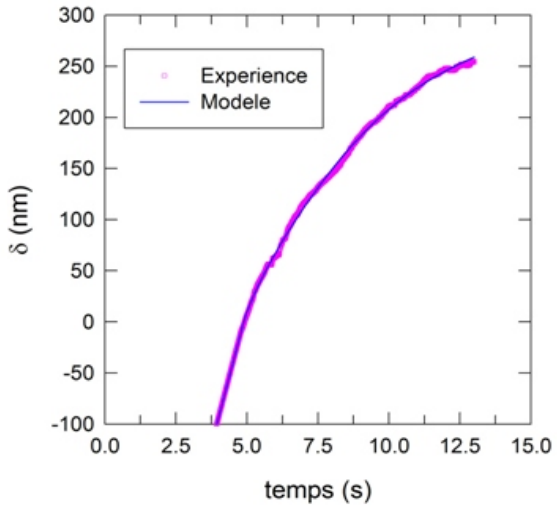


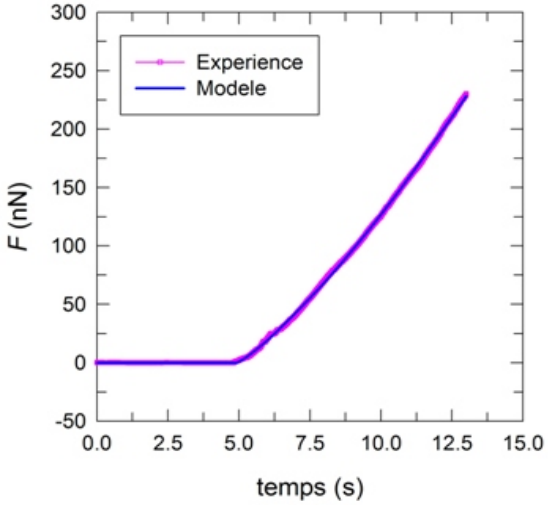


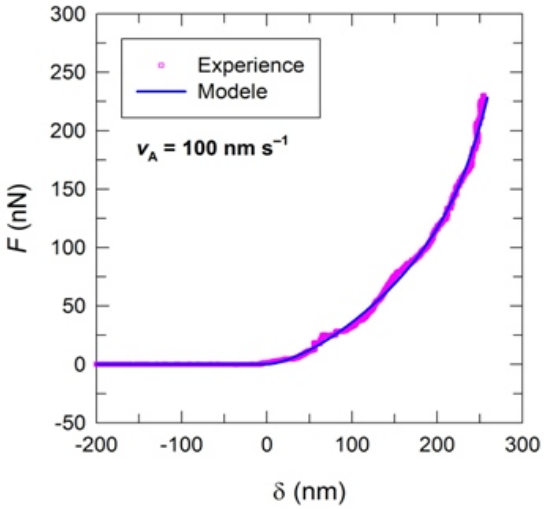


Film $(PLL/HA)_{24}$
Réticulation 60 mg/mL EDC
***h* = 5 µm, ν = 0.5**
***R* = 2.5 µm, k_C = 0.380 nN nm^{-1}**

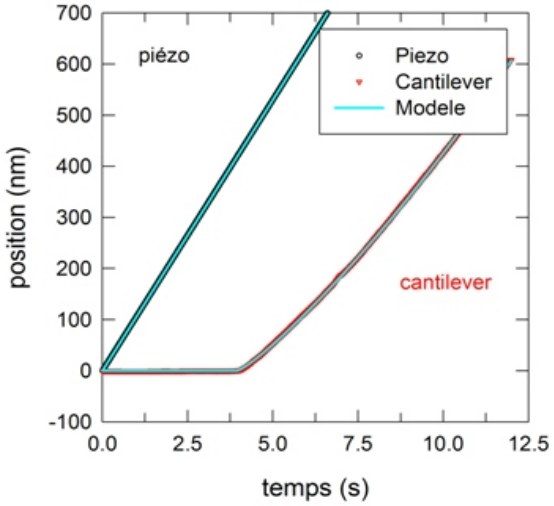


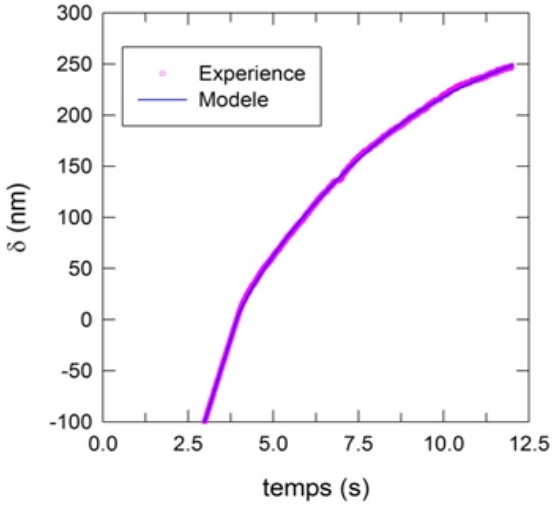


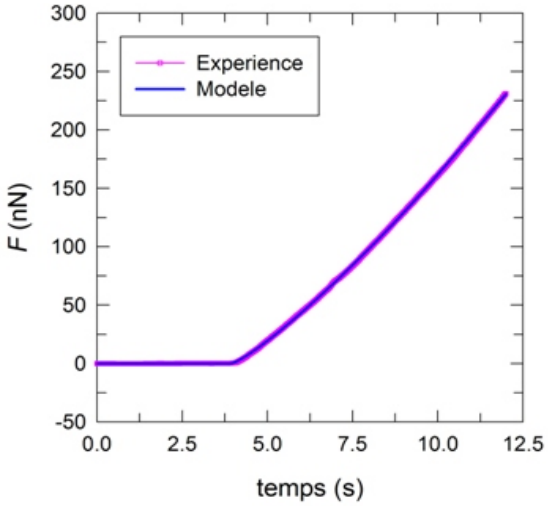


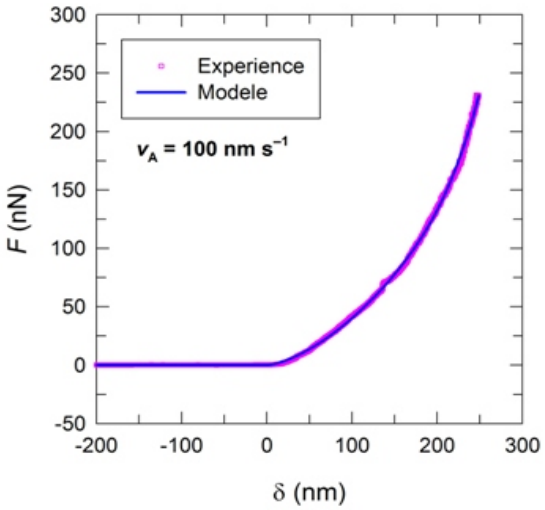


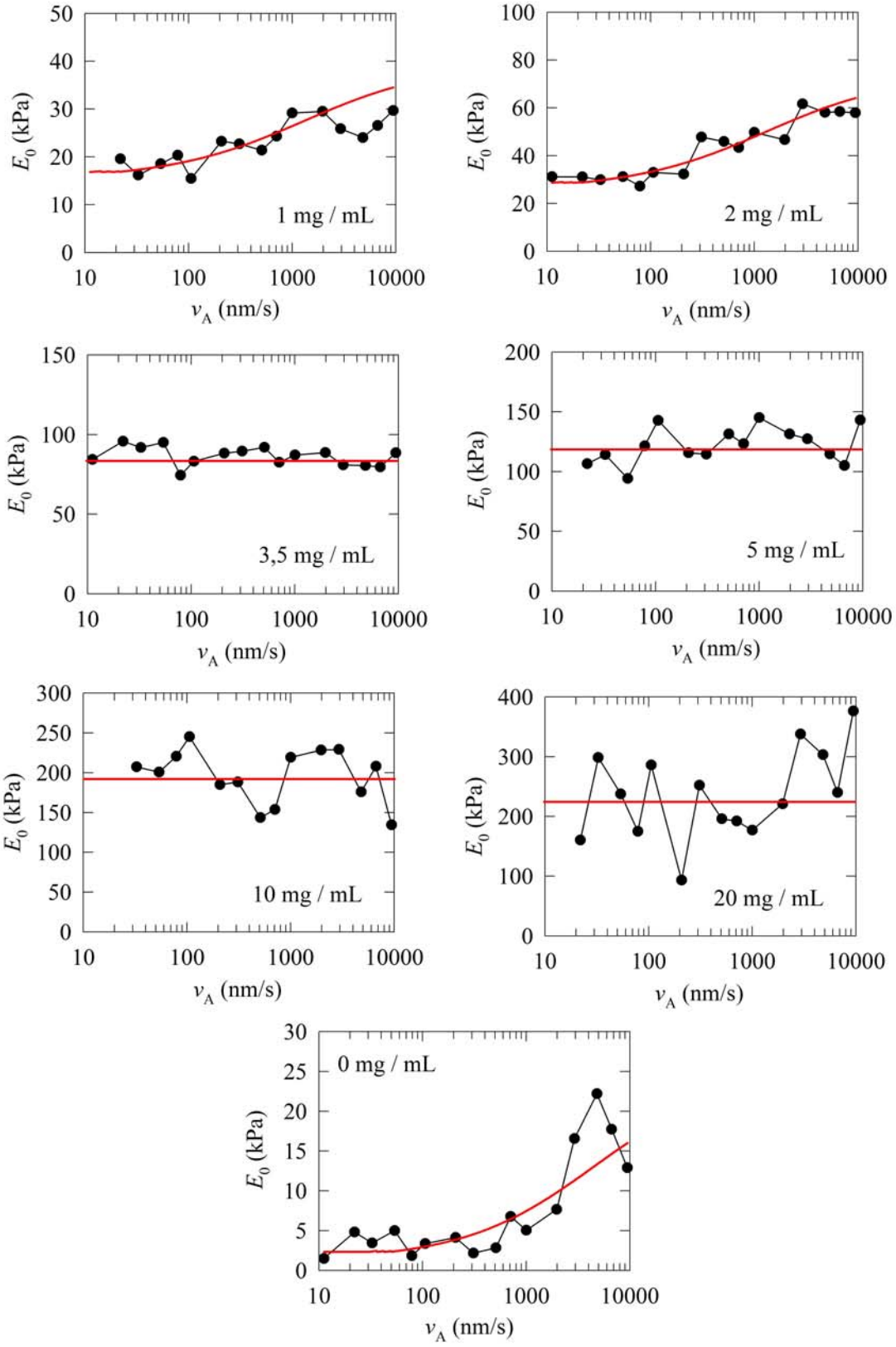
Film $(PLL/HA)_{24}$
Réticulation 75 mg/mL EDC
***h* = 5 µm, ν = 0.5**
***R* = 2.5 µm, k_C = 0.380 nN nm^{-1}**

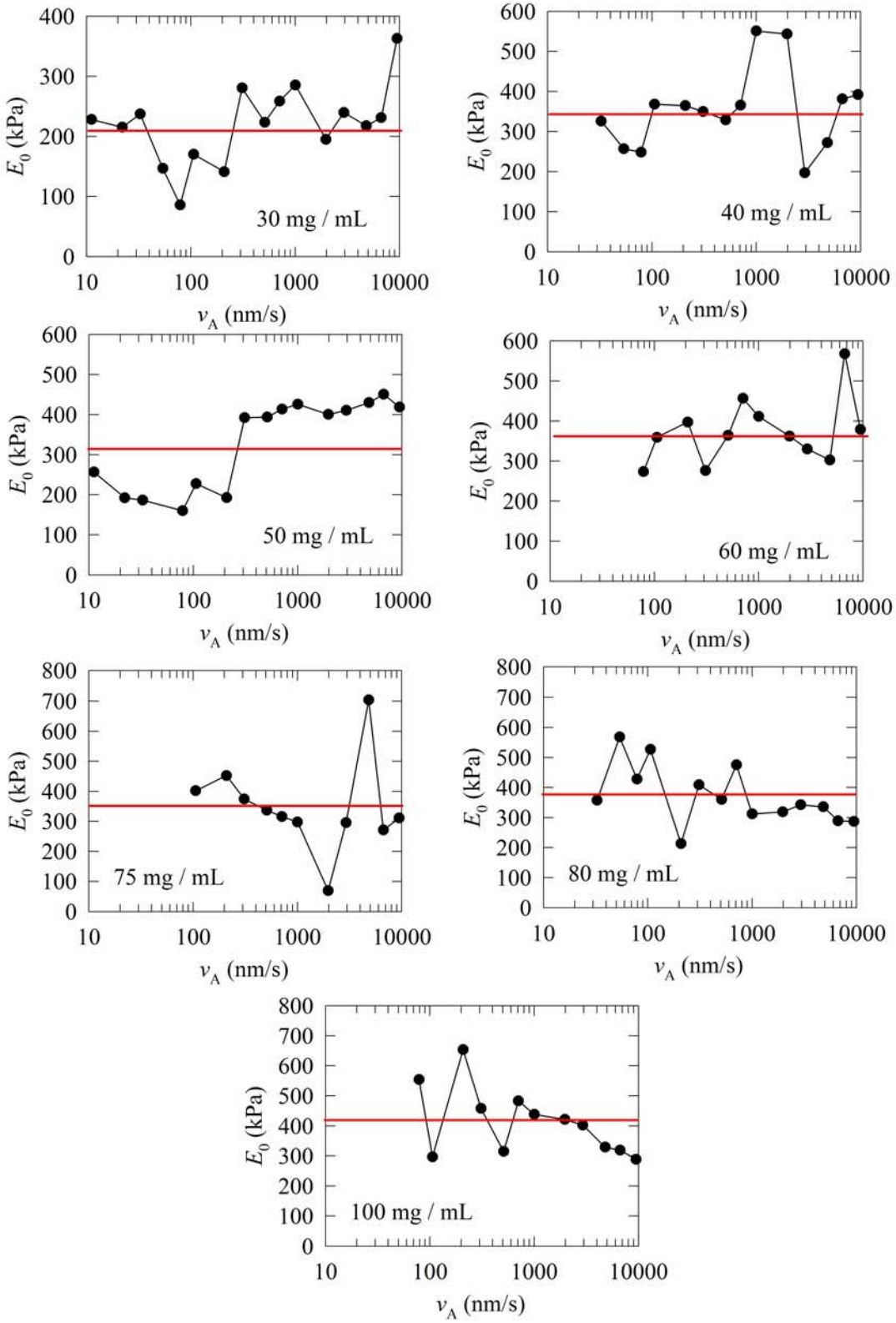




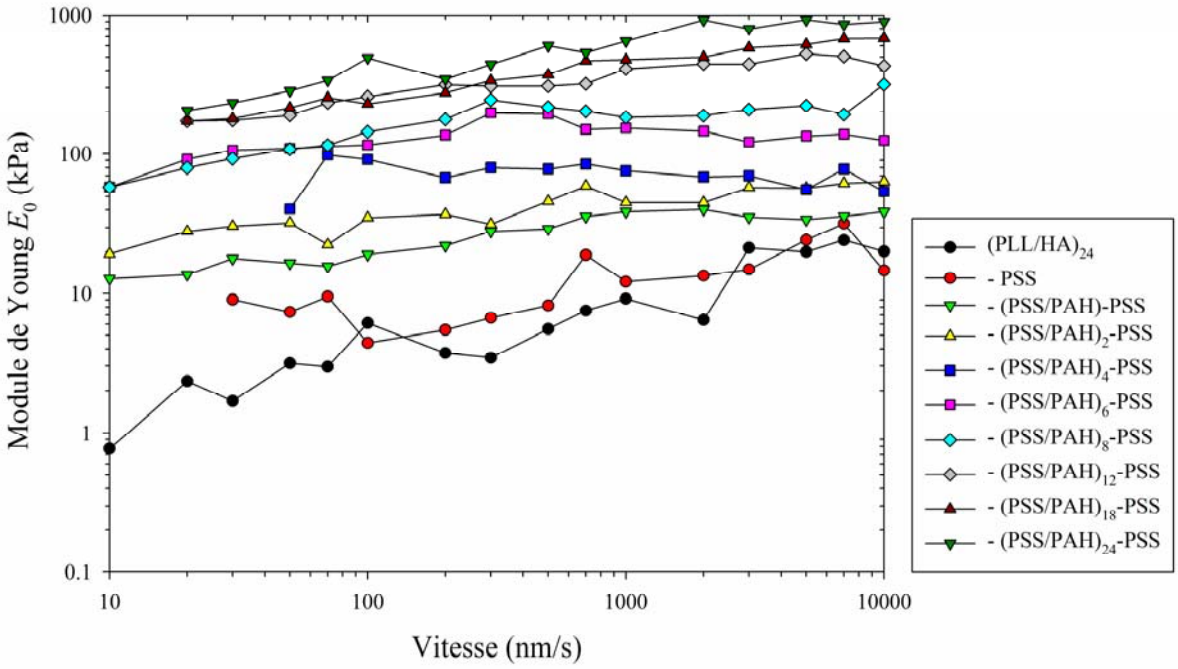


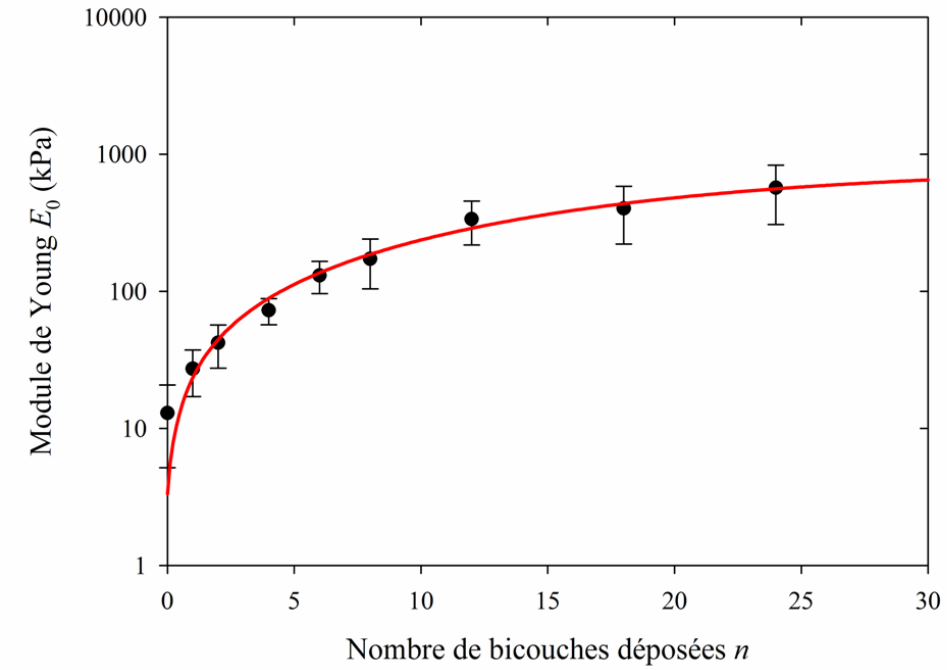



1 mg / mL
2 mg / mL
3,5 mg / mL
5 mg / mL
10 mg / mL
20 mg / mL
0 mg / mL
E_0 (kPa)
v_A (nm/s)

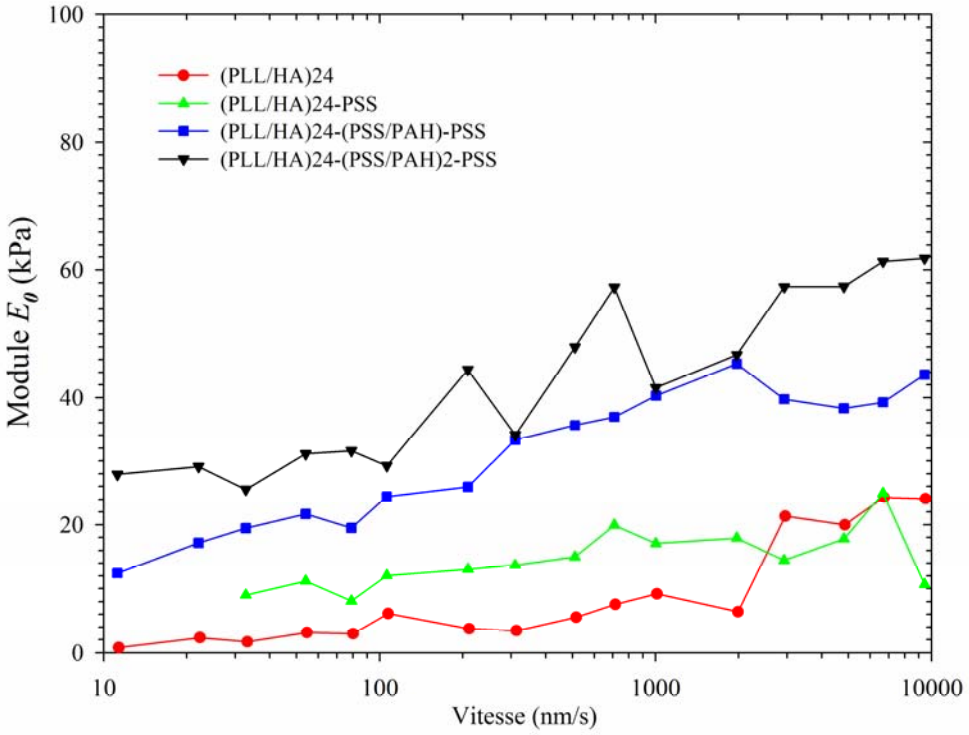

30 mg / mL
40 mg / mL
50 mg / mL
60 mg / mL
75 mg / mL
80 mg / mL
100 mg / mL
E_0 (kPa)
v_A (nm/s)

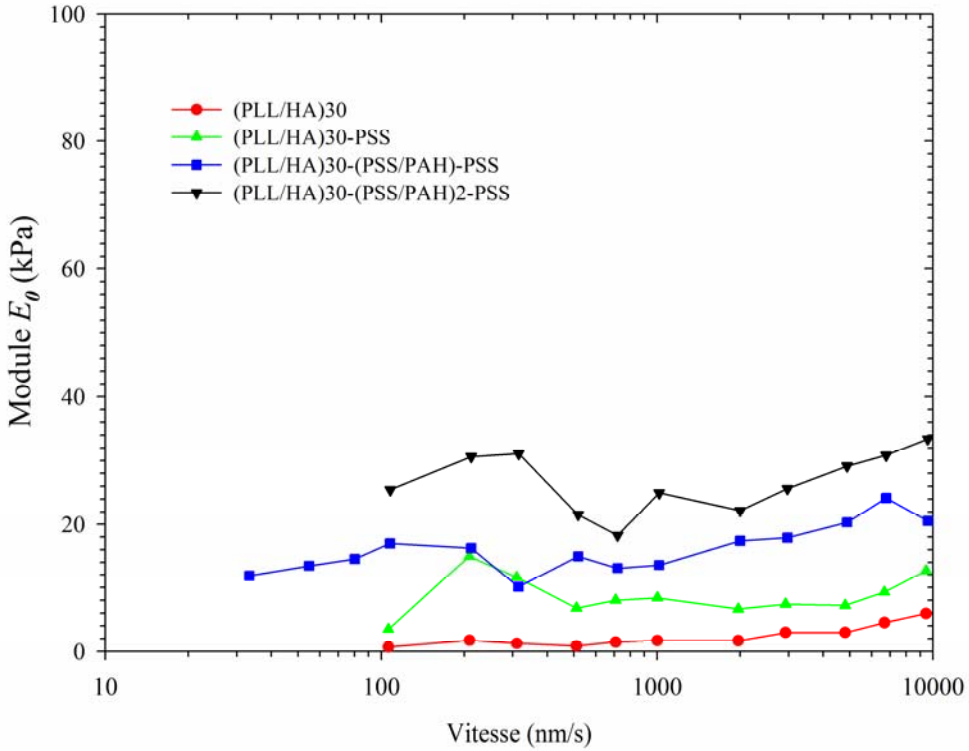
Annexe 2 (chapitre 4)





Variations du module d'Young des films $(PLL/HA)_{xx}$-$(PSS/PAH)_n$-PSS en fonction de la vitesse d'approche avec xx = {24,30} et n = {0,1,2}

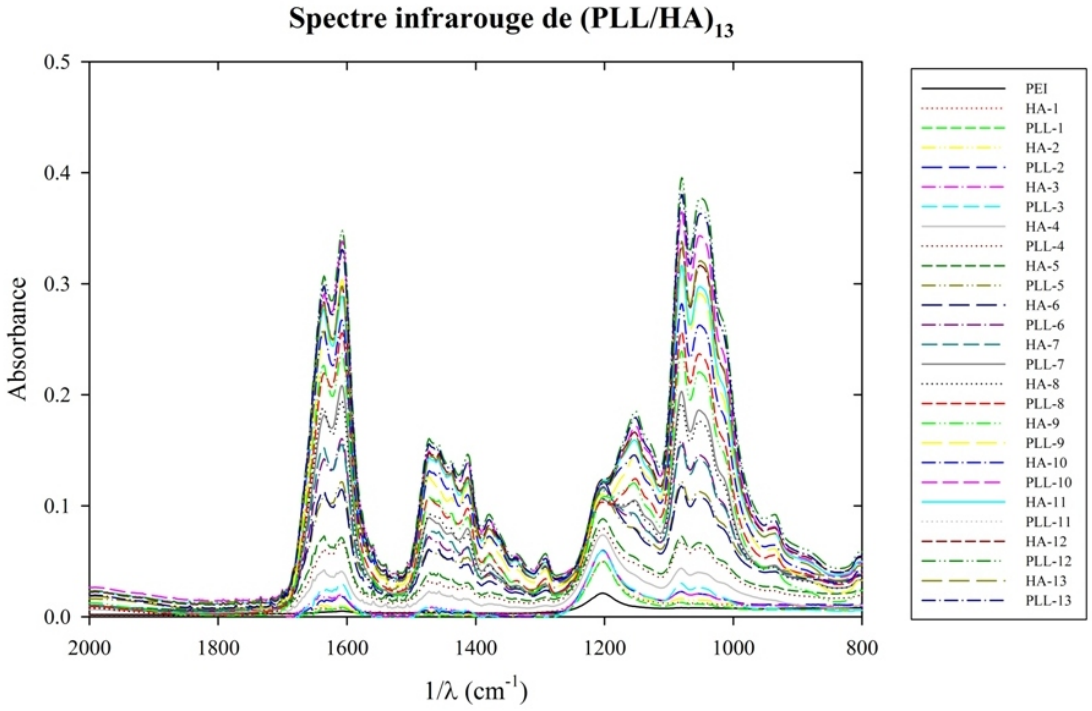


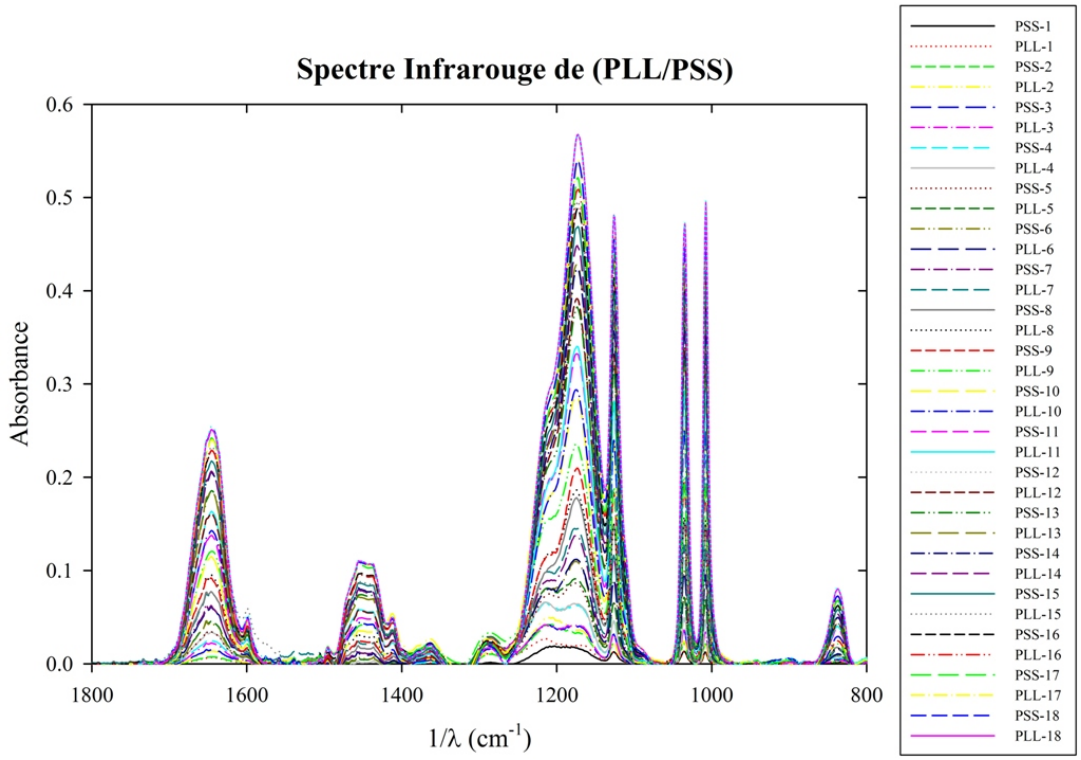


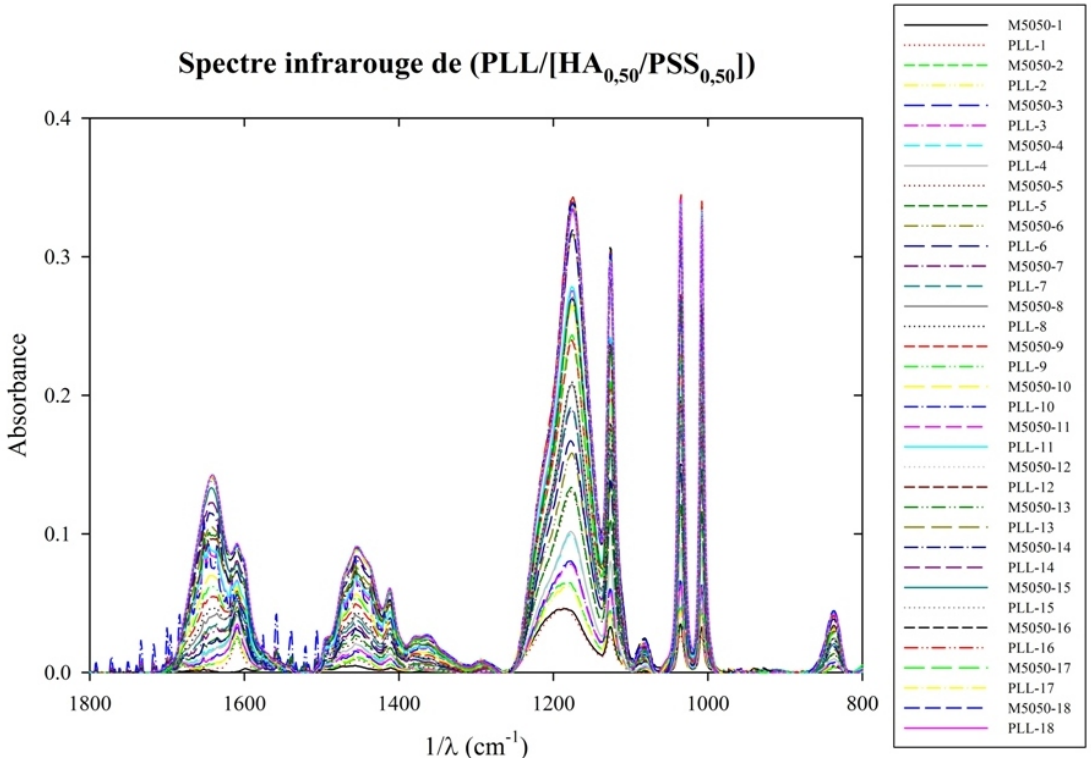
Nombre *n* de dépôt de (PSS/PAH)	**E_0 (kPa)**	**Vitesses (nm/s)**
0	12,9 ± 7,8	30-10000
1	27,2 ± 10,1	10-10000
2	42,1 ± 14,6	10-10000
4	72,7 ± 15,7	70-10000
6	130,7 ± 34,7	10-10000
8	172 ± 68	10-10000
12	336 ± 118	10-10000
15	393 ± 127	20-10000
18	402 ± 181	20-10000
24	569 ± 262	20-10000

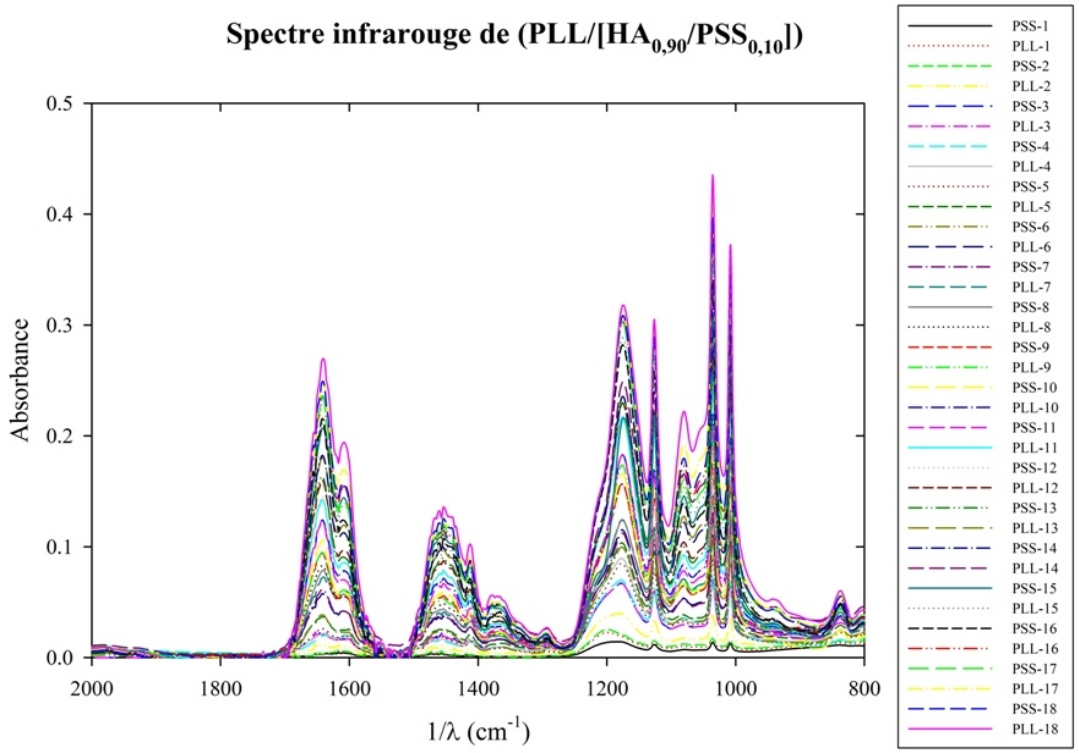
Architectures	**Module de Young moyen (kPa)**
$(PLL/HA)_{24}$ – $(PLL/PGA)_6$	52 ± 9
$(PLL/HA)_{24}$ – $(PLL/PGA)_6$ réticulé	229 ± 70
$(PLL/HA)_{24}$ – $(PLL/PGA^{maléimide})_6$	29,1 ± 5,6
$(PLL/HA)_{24}$ – $(PLL/PGA^{mannose})_6$	163 ± 44
$(PLL/HA)_{24}$ – $(PLL/PGA^{lactose})_6$	278 ± 31
$(PLL/HA)_{24}$ – $(PSS/PAH)_6$ – PSS	130 ± 34

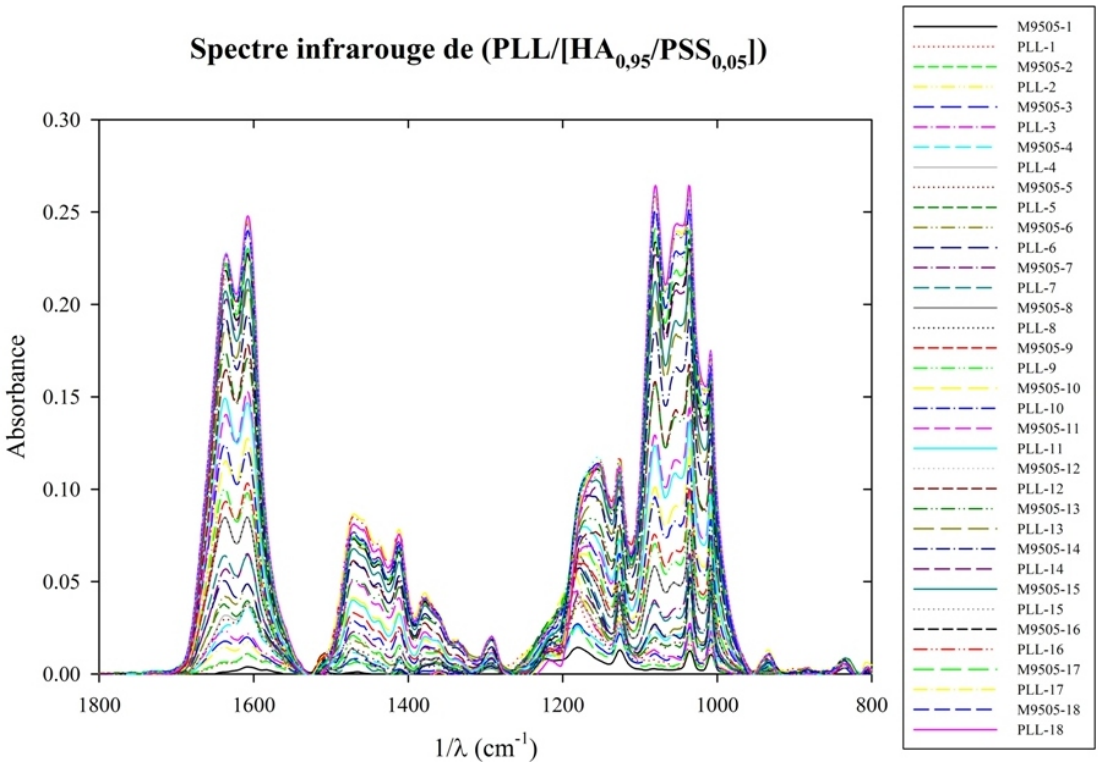
Annexe 3 (chapitre 6)

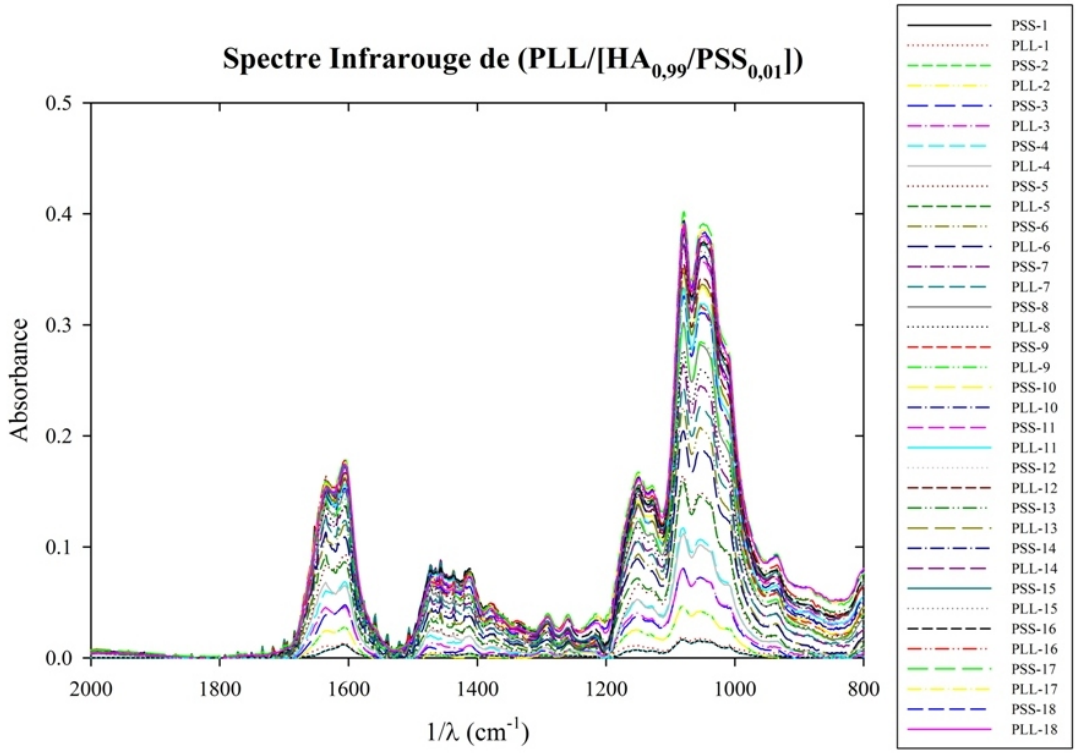


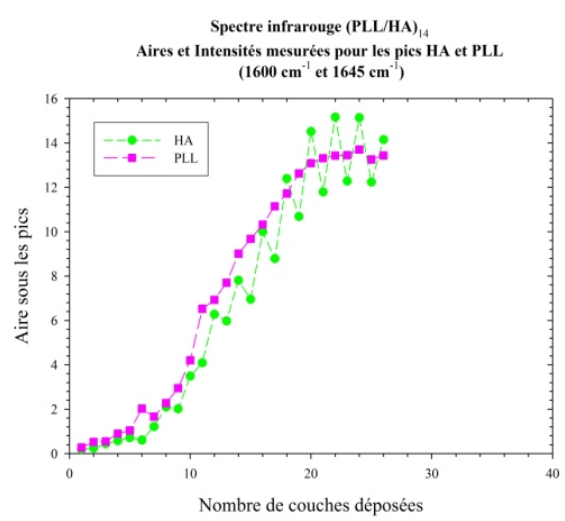


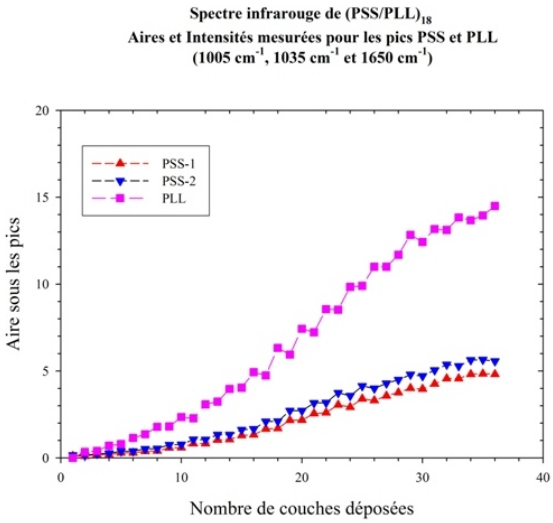

Spectre infrarouge de (PLL/[HA0,50/PSS0,50])
Absorbance
1/λ (cm-1)
M5050-1
PLL-1
M5050-2
PLL-2
M5050-3
PLL-3
M5050-4
PLL-4
M5050-5
PLL-5
M5050-6
PLL-6
M5050-7
PLL-7
M5050-8
PLL-8
M5050-9
PLL-9
M5050-10
PLL-10
M5050-11
PLL-11
M5050-12
PLL-12
M5050-13
PLL-13
M5050-14
PLL-14
M5050-15
PLL-15
M5050-16
PLL-16
M5050-17
PLL-17
M5050-18
PLL-18

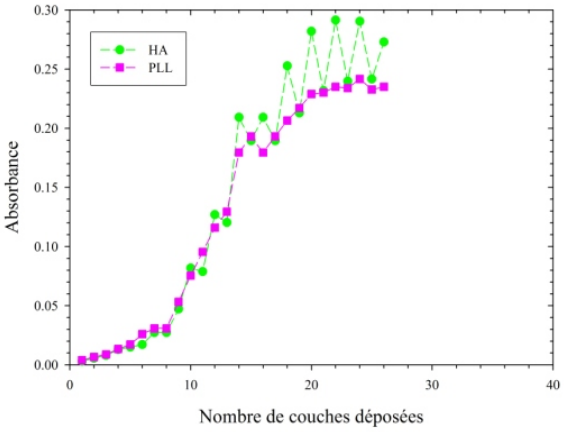

Spectre infrarouge de (PLL/[HA0,90/PSS0,10])
Absorbance
1/λ (cm-1)
PSS-1
PLL-1
PSS-2
PLL-2
PSS-3
PLL-3
PSS-4
PLL-4
PSS-5
PLL-5
PSS-6
PLL-6
PSS-7
PLL-7
PSS-8
PLL-8
PSS-9
PLL-9
PSS-10
PLL-10
PSS-11
PLL-11
PSS-12
PLL-12
PSS-13
PLL-13
PSS-14
PLL-14
PSS-15
PLL-15
PSS-16
PLL-16
PSS-17
PLL-17
PSS-18
PLL-18

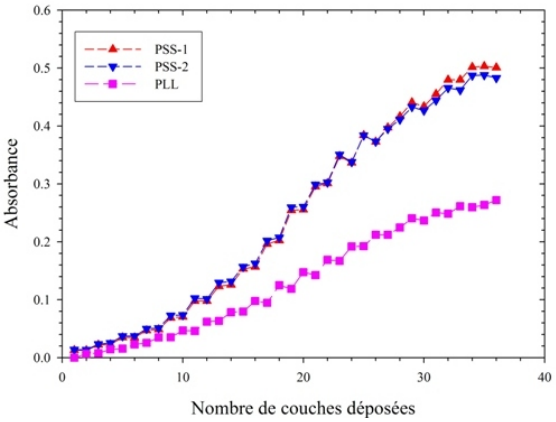

Spectre infrarouge de (PLL/[HA0,95/PSS0,05])
Absorbance
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
1800
1600
1400
1200
1000
800
1/λ (cm-1)
M9505-1
PLL-1
M9505-2
PLL-2
M9505-3
PLL-3
M9505-4
PLL-4
M9505-5
PLL-5
M9505-6
PLL-6
M9505-7
PLL-7
M9505-8
PLL-8
M9505-9
PLL-9
M9505-10
PLL-10
M9505-11
PLL-11
M9505-12
PLL-12
M9505-13
PLL-13
M9505-14
PLL-14
M9505-15
PLL-15
M9505-16
PLL-16
M9505-17
PLL-17
M9505-18
PLL-18

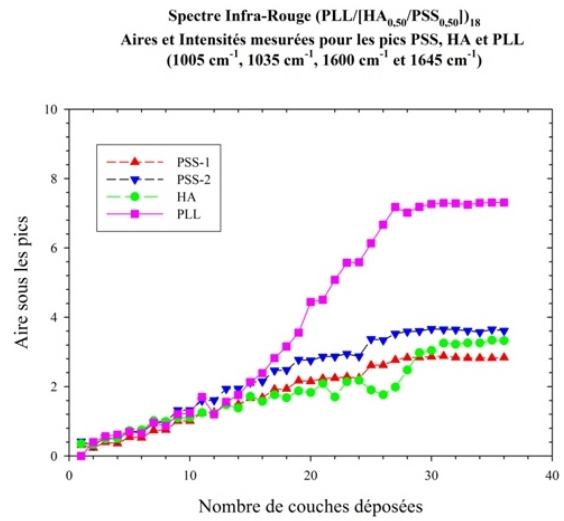

Spectre Infrarouge de (PLL/[HA0,99/PSS0,01])
Absorbance
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
1/λ (cm-1)
PSS-1
PLL-1
PSS-2
PLL-2
PSS-3
PLL-3
PSS-4
PLL-4
PSS-5
PLL-5
PSS-6
PLL-6
PSS-7
PLL-7
PSS-8
PLL-8
PSS-9
PLL-9
PSS-10
PLL-10
PSS-11
PLL-11
PSS-12
PLL-12
PSS-13
PLL-13
PSS-14
PLL-14
PSS-15
PLL-15
PSS-16
PLL-16
PSS-17
PLL-17
PSS-18
PLL-18

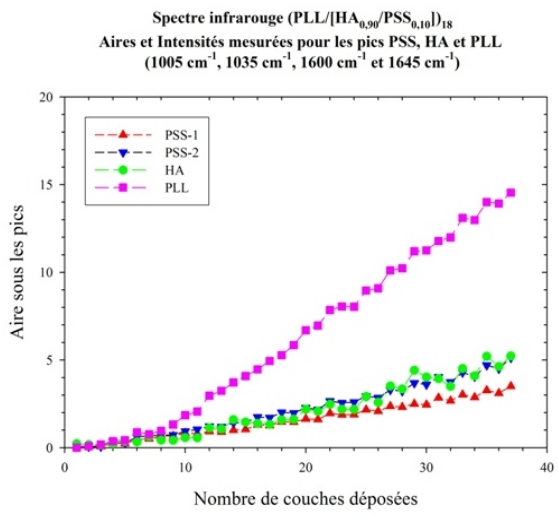

Spectre infrarouge (PLL/HA)14
Aires et Intensités mesurées pour les pics HA et PLL
(1600 cm-1 et 1645 cm-1)
HA
PLL
Aire sous les pics
Nombre de couches déposées

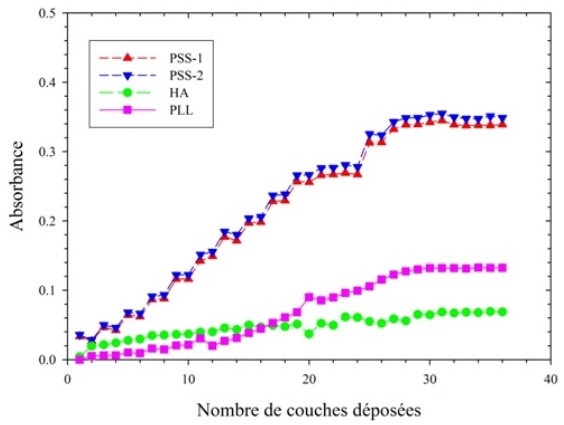

Spectre infrarouge de (PSS/PLL)18
Aires et Intensités mesurées pour les pics PSS et PLL
(1005 cm-1, 1035 cm-1 et 1650 cm-1)
PSS-1
PSS-2
PLL
Aire sous les pics
Nombre de couches déposées

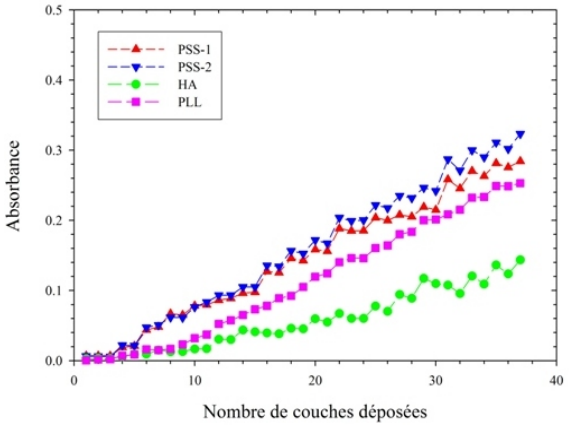

HA
PLL
Absorbance
Nombre de couches déposées

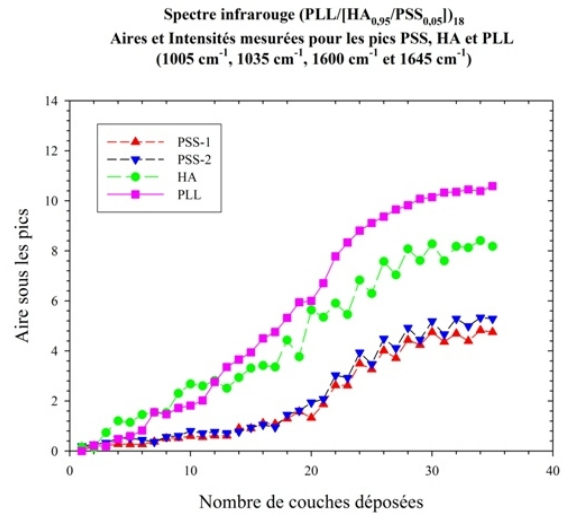

PSS-1
PSS-2
PLL
Absorbance
Nombre de couches déposées

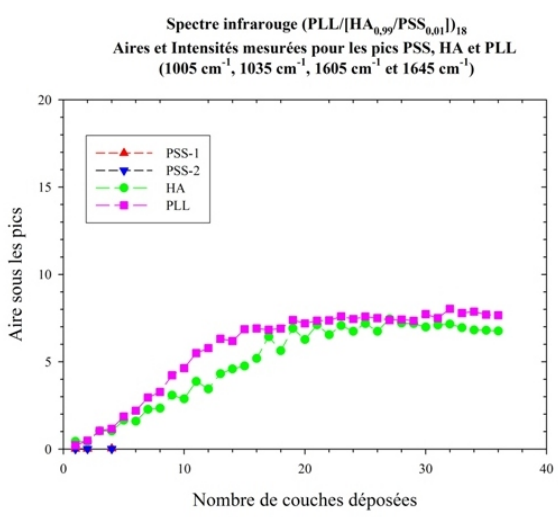

Spectre Infra-Rouge (PLL/[HA0,50/PSS0,50])18
Aires et Intensités mesurées pour les pics PSS, HA et PLL
(1005 cm-1, 1035 cm-1, 1600 cm-1 et 1645 cm-1)
PSS-1
PSS-2
HA
PLL
Aire sous les pics
Nombre de couches déposées

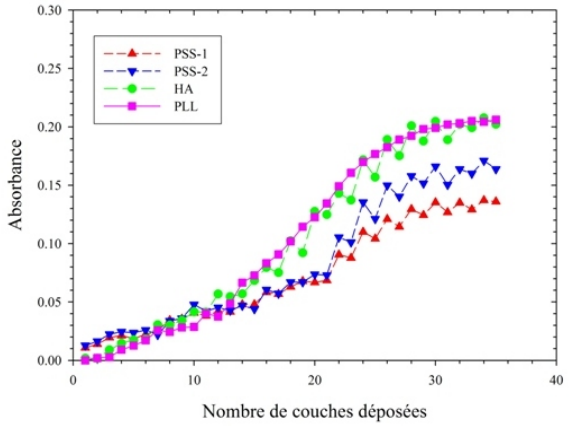

Spectre infrarouge (PLL/[HA0,90/PSS0,10])18
Aires et Intensités mesurées pour les pics PSS, HA et PLL
(1005 cm-1, 1035 cm-1, 1600 cm-1 et 1645 cm-1)
PSS-1
PSS-2
HA
PLL
Aire sous les pics
Nombre de couches déposées

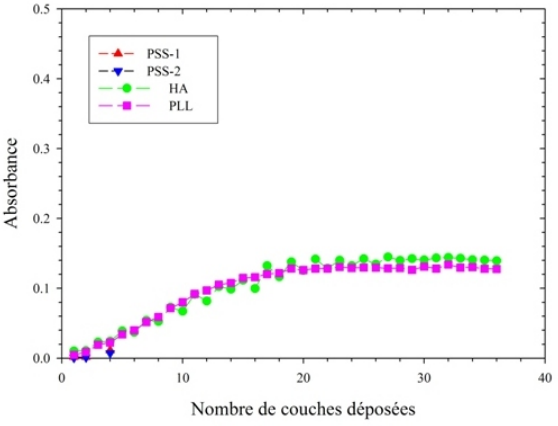

PSS-1
PSS-2
HA
PLL
Absorbance
Nombre de couches déposées


PSS-1
PSS-2
HA
PLL
Absorbance
Nombre de couches déposées

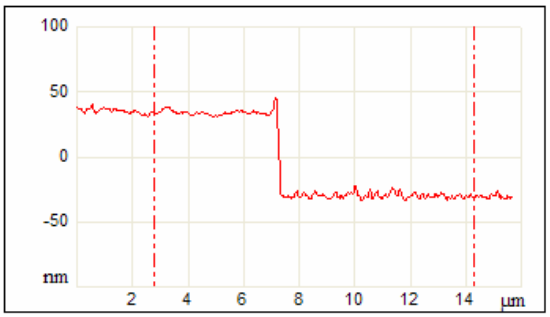

Spectre infrarouge (PLL/[HA0,95/PSS0,05])18
Aires et Intensités mesurées pour les pics PSS, HA et PLL
(1005 cm-1, 1035 cm-1, 1600 cm-1 et 1645 cm-1)
PSS-1
PSS-2
HA
PLL
Aire sous les pics
Nombre de couches déposées


Spectre infrarouge (PLL/[HA0,99/PSS0,01])18
Aires et Intensités mesurées pour les pics PSS, HA et PLL
(1005 cm-1, 1035 cm-1, 1605 cm-1 et 1645 cm-1)
PSS-1
PSS-2
HA
PLL
Aire sous les pics
Nombre de couches déposées

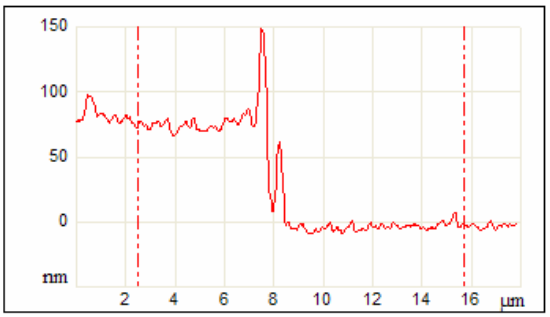

PSS-1
PSS-2
HA
PLL
Absorbance
Nombre de couches déposées


PSS-1
PSS-2
HA
PLL
Absorbance
Nombre de couches déposées

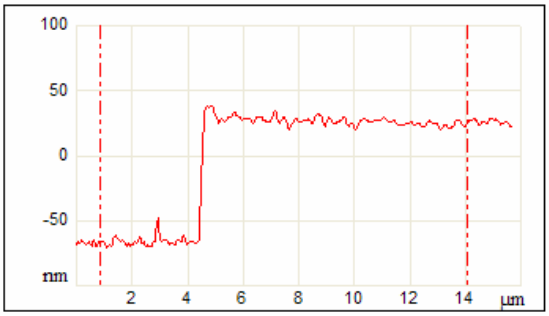
$(PLL/PSS)_{12}$



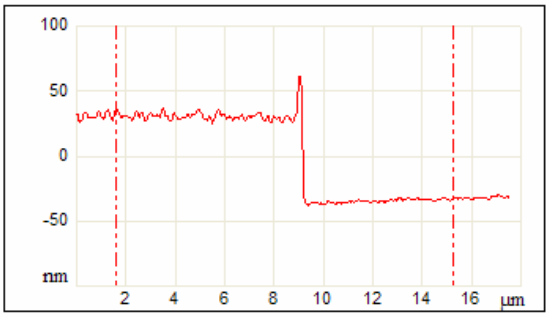
$(PLL/[HA_{0.20}/PSS_{0.80}])_{12}$



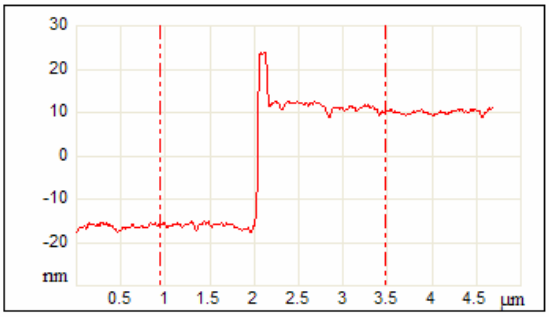
$(PLL/[HA_{0.50}/PSS_{0.50}])_{12}$



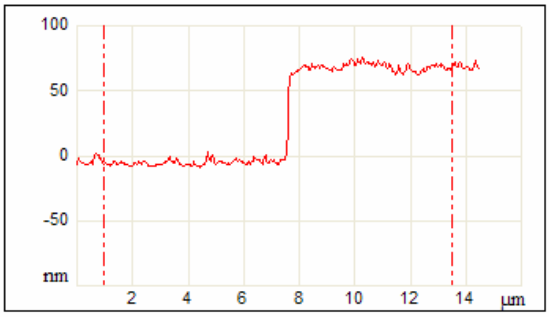
$(PLL/[HA_{0.75}/PSS_{0.25}])_{12}$



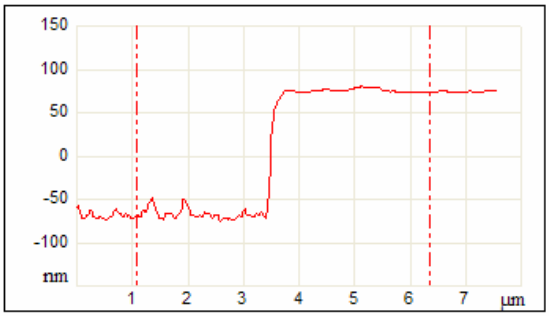
$(PLL/[HA_{0.90}/PSS_{0.10}])_{12}$



$(PLL/[HA_{0.98}/PSS_{0.02}])_{12}$



$(PLL/HA)_{12}$



x	**Epaisseur mesurée par ellipsométrie (nm)**	**Epaisseur mesurée par AFM (nm)**
0	85,6 ± 10,1	79,1 ± 2,1
19,6	83,8 ± 1,7	--
41,7	73,6 ± 1,8	--
50	80,0 ± 1,9	92,3 ± 1,2
75	61,4 ± 1,4	74,5 ± 3,1
90	41,8 ± 1,7	28,6 ± 1,4
95	41,3 ± 4,3	22,1 ± 1,1
98	71,5 ± 7,9	77,3 ± 2,7
99	120,9 ± 6,2	122,9 ± 2,1
100	150,2 ± 2,3	182,7 ± 1,7

Résumé

De récents travaux ont montré une relation directe entre le comportement cellulaire (adhésion et prolifération) et les propriétés viscoélastiques du substrat sur lequel des cellules vivantes ont été déposées. La technique de dépôt « LBL » permet d'élaborer différents types de films multicouches de polyélectrolytes à épaisseur contrôlée, présentant des applications potentielles importantes dans le domaine biomédical. Le but de mes travaux a été la mise au point de films fonctionnalisés aux propriétés contrôlées en termes de biocompatibilité, de viscoélasticité et de rigidité.

La technique de nanoindentation au microscope de force atomique nous a permis de caractériser des films multicouches élaborés à partir de deux polyélectrolytes différents. Les résultats ont montré que les films à croissance exponentielle tels que $(PLL/HA)_{24}$ et $(CHI/HA)_{24}$ présentent un module de Young de moins de 10-20 kPa par rapport aux films à croissance linéaire tels que $(PSS/PLL)_{24}$ et $(PSS/PAH)_{210}$ pour lesquels il vaut respectivement environ 50 kPa et plus de 500 kPa. Nous avons également mesuré l'effet de la réticulation chimique sur l'élasticité des films $(PLL/HA)_{24}$. Il en ressort que le module de Young des films $(PLL/HA)_{24}$ augmente avec la concentration en agent réticulant, jusqu'à une valeur plateau de l'ordre de 400 kPa. Ces résultats ont pu être corrélés à l'adhésion, la viabilité et l'étalement cellulaire de chondrocytes.

Nous avons ensuite étudié des films composés de deux strates construites à partir de deux paires de polyélectrolytes différents : une strate épaisse et molle, $(PLL/HA)_{24}$, et une strate très mince et dure, $(PSS/PAH)_n$. Nos mesures ont montré que la rigidité des films $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$-PSS augmente avec le nombre n de bicouches déposées. Elle passe ainsi de quelques kPa pour $n = 0$ à plus de 700 kPa pour $n = 24$. Cette étude a été étendue à d'autres systèmes possédant la même strate basale $(PLL/HA)_{24}$ mais couverte d'une seconde strate différente : $(PLL/PGA)_6$, $(PLL/PGA^{mannose})_6$, $(PLL/PGA^{lactose})_6$ et $(PSS/PAH)_6$. Cette étude a révélé une grande variabilité de la rigidité du système en fonction de la nature chimique de la seconde strate. L'utilisation de plusieurs modèles viscoélastiques pour interpréter les courbes de force mesurées sur les films couverts par (PSS/PAH) nous a permis de montrer que ceux-ci peuvent être assimilés à un système mécanique comportant un ressort, deux unités de Kelvin (un ressort et un piston montés en parallèle) et un piston associés en série.

Enfin nous avons étudié des films constitués de PLL et d'un mélange de polyanions $[HA_x/PSS_{1-x}]$ où x représente la fraction molaire en monomères dans la solution de polyanions. L'étude par ellipsométrie a révélé le passage par un minimum d'épaisseur de ces films pour des fractions molaires respectives en HA et PSS de 0,9 et 0,1. Par ailleurs, l'analyse de ces films par spectroscopie infrarouge a montré que ceux-ci sont fortement dopés en PSS, même pour des concentrations très faibles de ce polyélectrolyte en solution. Ceci peut s'expliquer par une plus grande affinité de la PLL pour le PSS que pour le HA. L'étude des propriétés mécaniques de ces films par nanoindentation a montré une corrélation entre le module d'Young et le dopage réel du film en PSS.

Abstract

Recent studies have shown a direct relation between the cellular behavior (adhesion and proliferation) and the viscoelastic properties of the substrate on which living cells were deposited. The "LBL" deposit technique permits different types of polyelectrolyte multilayer films with controlled thickness and important potential applications in the biomedical field to be built up. The goal of my work was the development of functionalized films with controlled properties in terms of biocompatibility, of viscoelasticity and of rigidity.

The technique of nanoindentation at the atomic force microscope enabled us to characterize multilayer films elaborated with two different polyelectrolytes. The results showed that the exponentially growing films such as $(PLL/HA)_{24}$ and $(CHI/HA)_{24}$ are characterized by Young modulus of less than 10-20 kPa compared to linearly growing films such as $(PSS/PLL)_{24}$ and $(PSS/PAH)_{210}$ for which it amounts respectively to 50 kPa and more than 500 kPa. We also measured the effect of the chemical cross-linking on the elasticity of $(PLL/HA)_{24}$ films. The Young modulus of $(PLL/HA)_{24}$ films increases with the concentration in cross-linking agent, up to a plateau value of about 400 kPa. These results could be to correlated with adhesion, viability and cellular spreading of chondrocytes.

We then studied films composed of two superposed slabs, each formed with two different pairs of polyelectrolytes: a thick and soft slab, $(PLL/HA)_{24}$, and a very thin and hard slab, $(PAH/PSS)_n$. Our measurements showed that the rigidity of the $(PLL/HA)_{24}$-$(PSS/PAH)_n$-PSS increases with the number of deposited pairs. It increases thus from some kPa for $n = 0$ up to more than 700 kPa for $n = 24$. This study was extended to others systems having the same foundation, i.e. $(PLL/HA)_{24}$, but covered with different second slabs: $(PLL/PGA)_6$, $(PLL/PGA^{mannose})_6$, $(PLL/PGA^{lactose})_6$ and $(PSS/PAH)_6$. This study revealed a great variability of the rigidity of the systems according to the chemical nature of the second slab. The use of several viscoelastic models to interpret the force curves measured on films covered by (PSS/PAH) allowed showing that those can be compared to a mechanical system comprising at spring, two Kelvin units (spring and dashpot in parallel) and a dashpot associated in series.

Finally we studied films made up of PLL and of a mixture of polyanions $[HA_x/PSS_{1-x}]$ where x represents the molar fraction in monomers in the solution of polyanions. The study by ellipsometry revealed the existence of a minimum thickness of these films for respective molar fractions in HA and PSS of 0.9 and 0.1. In addition, the analysis of these films by infrared spectroscopy showed that they are strongly doped in PSS, even for very weak concentrations of this polyelectrolyte in solution. This can be explained by a greater affinity of the PLL for the PSS than for the HA. The study of the mechanical properties of these films by nanoindentation showed a correlation between the Young modulus and the actual doping in PSS of the film.

Auteur	Titre	Université/Année
Grégory FRANCIUS	Détermination des propriétés viscoéastiques de films multicouches de polyélectrolytes par sonde colloïdale au microscope de force atomique	Université Louis Pasteur Strasbourg, 2006