



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

Discipline : Chimie-Physique / Physique

par Laurent JOURDAINNE

Mobilité des macromolécules dans les multicouches de polyélectrolytes

Soutenue publiquement le 18 septembre 2007

JURY

Président du jury

Mme Marie-Laure VIRIOT

Directeur de Recherche, DCPR, Nancy

Rapporteur Interne

M. Gero DECHER

Professeur ULP, Strasbourg

Rapporteur Externe

M. Michel NARDIN

Directeur de Recherche, ICSI, Mulhouse

Examineur

M. Philippe LAVALLE

Chargé de Recherche, INSERM U 595, Strasbourg

Directeur de Thèse

M. Bernard SENGER

Directeur de Recherche, INSERM U 595, Strasbourg

Table des matières

Introduction générale	11
Chapitre 1 Les films multicouches de polyélectrolyte	17
1.1 Historique	18
1.2 Caractéristiques physico-chimiques	20
1.2.1 <i>Les modes de croissance</i>	20
1.2.2 <i>Influence de différents paramètres de construction</i>	32
1.2.3 <i>Polyélectrolytes utilisés</i>	35
1.2.4 <i>Substrats employés</i>	36
1.3 Applications biomédicales et fonctionnalisation des films multicouches	37
1.3.1 <i>Domaines d'applications des films multicouches</i>	37
1.3.2 <i>Propriétés de surfaces anti-adhésives</i>	38
1.3.3 <i>Surfaces biomimétiques</i>	38
1.3.4 <i>Fonctionnalisation par insertion de biomolécules</i>	40
1.4 Films à compartiments	43
Bibliographie	47
Chapitre 2 Matériels et méthodes	59
2.1 Construction des échantillons	61
2.1.1 <i>Les produits utilisés</i>	61
2.1.2 <i>Préparation des films multicouches</i>	62
2.2 Microscopie confocale	63
2.2.1 <i>Principe général de la microscopie confocale</i>	63
2.2.2 <i>Fluorescence</i>	65
2.2.3 <i>Dispositif expérimental</i>	67

2.2.4	Mesure et analyse des intensités de fluorescence	69
2.3	Mesure de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment	72
2.3.1	Photoblanchiment à partir de motifs périodiques	73
2.3.2	Photoblanchiment d'une zone unique	80
2.4	Microbalance à cristal de quartz	85
2.4.1	Principe de mesure de la microbalance à cristal de quartz	85
2.4.2	Dispositif expérimental	88
	Bibliographie	89
Chapitre 3	Echange et diffusion dans le film poly(L-lysine) – acide hyaluronique	93
3.1	Cadre de l'étude	94
3.2	Phénomènes d'échange	97
3.2.1	Cinétique d'adsorption de la poly(L-lysine)	97
3.2.2	Dosage de la PLL ^{FITC} dans un film	99
3.2.3	Discussion	104
3.3	Diffusion de polyélectrolytes dans le film poly(L-lysine) – acide hyaluronique	106
3.3.1	Etude de solutions de molécules fluorescentes	106
3.3.2	Analyse des films marqués en surface	110
3.3.3	Analyse des films marqués en cours de construction	114
3.3.4	Discussion	119
3.4	Conclusion du chapitre	122
	Bibliographie	124
Chapitre 4	Films à barrière biodégradable	127
4.1	Contexte et stratégie	128
4.1.1	Travaux antérieurs	128
4.1.2	Choix des systèmes d'intérêt	131

4.2 Propriétés des films poly(L-lysine) – acide hyaluronique et poly(L-lysine) – poly(acide L-glutamique)	134
4.2.1 Films basés sur le couple poly(L-lysine) – acide hyaluronique	134
4.2.2 Films basés sur le couple poly(L-lysine) – poly(acide L-glutamique)	135
4.3 Croissance du film poly(L-lysine) – poly(acide L-glutamique) sur différents substrats	138
4.3.1 Résultats expérimentaux	138
4.3.2 Interprétation des résultats	140
4.4 Films multistrates	143
4.4.1 Dépôt de la première couche de poly(acide L-glutamique) sur un film poly(L-lysine) – acide hyaluronique	143
4.4.2 Dépôt de <i>n</i> paires de couches poly(acide L-glutamique) – poly(L-lysine) sur un film poly(L-lysine) – acide hyaluronique	144
4.4.3 Étude complémentaire : échange poly(acide L-glutamique) / acide hyaluronique	150
4.5 Film multistrates et protéine A	152
4.5.1 Comportement de la protéine A dans les films à croissance exponentielle	152
4.5.2 Comportement de la protéine A dans les films multistrates	154
4.6 Conclusion du chapitre	158
Bibliographie	159
Chapitre 5 Caractérisation par microscopie à force atomique de fibres de collagène de types I / II sur chondrocytes intacts	163
5.1 Résumé	163
5.2 Article	164
Conclusion générale	173

Liste des abréviations

Produits

PLL	poly(L-lysine)
HA	acide hyaluronique
PGA	poly(acide L-glutamique)
PA	protéine A

Marqueurs fluorescents

FITC	isothiocyanate de fluorescéine
Rho	Rhodamine
TR	« Texas Red »
AR	« Alexa Red »

Techniques

FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching / Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope / Microscope confocal à balayage laser
AFM	Atomic Force Microscope / Microscope à force atomique
QCM	Quartz Cristal Microbalance / Microbalance à cristal de quartz

Liste de publications

1. Youri Arntz*, Laurent Jourdainne*, Géraldine Greiner, Simon Rinckenbach, Joëlle Ogier, Jean-Claude Voegel, Philippe Lavallo and Dominique Vautier. **2006**. Immunogold detection of types I et II Chondrocyte collagen Fibrils : an in situ atomic force microscopic investigation. *Microscopy Research and technique* 69:283-290.
*contributed equally to this work
2. L. Jourdainne, Y. Arntz, B. Senger, C. Debry, J.-C. Voegel, P. Schaaf, and P. Lavallo. **2007**. Multiple strata of exponentially growing polyelectrolyte multilayer films. *Macromolecules* 40:316-321.
3. L. Jourdainne, S. Lecuyer, Y. Arntz, C. Picart, P. Schaaf, B. Senger, J-C. Voegel, P. Lavallo and T. Charitat. Dynamics of poly(L-lysine) in poly(L-lysine) / hyaluronic acid multilayer films studied by fluorescence recovery after pattern photobleaching. *En cours de soumission*

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 Jean-Claude Voegel, Directeur du laboratoire, de m'y avoir accueilli.

Je remercie très chaleureusement mon directeur de thèse, Bernard Senger, de sa sympathie et de sa disponibilité lors de mes nombreuses sollicitations, et aussi de m'avoir permis d'enseigner mes connaissances en informatique. J'associe à ces remerciements Pierre Schaaf, qui dans le cadre d'une étroite collaboration avec le laboratoire, m'a orienté sur des sujets de recherches très intéressants.

J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec Philippe Lavalley au cours de mon doctorat sur différents sujets de recherche. Sa gentillesse, sa disponibilité, la diversité de ses connaissances ainsi que l'autonomie et la confiance qu'il m'a conférées m'ont permis de travailler avec motivation et entrain.

Grâce à une très agréable collaboration avec Thierry Charitat de l'Institut Charles Sadron, j'ai pu mener à bien une étude non triviale à propos des multicouches. Malgré un montage expérimental plutôt bruyant, les qualités scientifiques et humaines de Thierry m'ont beaucoup appris et me laissent un bon souvenir de toutes ces expériences. Je remercie aussi tous les membres de l'équipe Membranes, et notamment Sigolène Lecuyer et Marc Basler, qui m'ont apporté leur aide au cours de ces travaux.

Je remercie également Dominique Vautier et Youri Arntz de m'avoir associé à leurs travaux au cours des premiers mois de la thèse, quand mon sujet de base ne fonctionnait pas très bien.

Je suis également très sensible à l'honneur que m'ont fait les membres du Jury en acceptant de jouer le rôle de rapporteurs de ma thèse. Je tiens ainsi à témoigner toute ma reconnaissance à Marie-Laure Viriot, Michel Nardin et Gero Decher.

Je tiens à remercier Gregory Francius de son agréable compagnie pendant les deux années que nous avons passées en commun au laboratoire, et de l'amitié qui en est née. Je suis très heureux aussi d'avoir partagé un bureau avec Damien Mertz, avec qui nous avons eu de longues discussions autres que scientifiques, et dont les explications en chimie m'ont été précieuses. De même, je garderai un excellent souvenir de la présence féminine dans le bureau de Nadia Ladhari et Sabine Müller. J'ai aussi été ravi de partager le bureau avec Youri Arntz et plus récemment avec Ludovic Richert, et au tout début du doctorat avec Bernard

Senger et Vincent Ball. Je remercie aussi très amicalement Erell Le Guen, qui a commencé le doctorat la même année que moi.

Je remercie également Sandra Werner, pour l'aide précieuse à la toute fin de la rédaction du manuscrit, Géraldine Greiner et Géraldine Koenig pour leur support technique. Un clin d'œil aussi aux thésards que j'ai côtoyés, Juan Mendez, Eric Hübsch, Leyla Kocgozlu, Hajare Mjahed...ainsi qu'à tous les membres du laboratoire.

Enfin, je remercie ma femme, ma sœur et mes parents, ainsi que ma belle-famille pour leur soutien au cours de ces années d'études.

Introduction générale

Les films multicouches sont étudiés depuis les années 1930 et consistent en l'assemblage de molécules selon une architecture prédéterminée. Ces films sont notamment destinés au recouvrement de matériaux pour leur conférer des propriétés de surface spécifiques.

La technique de Langmuir-Blodgett et la chimisorption ont été les premières méthodes utilisées pour réaliser des films multicouches. Cependant, ces techniques sont limitées à l'utilisation de certaines molécules organiques et ne permettent pas d'obtenir des films multicouches stables et résistants.

Depuis les années 1990, une technique basée sur l'adsorption alternée de polyanions et de polycations a permis d'obtenir des multicouches stables et pouvant atteindre des épaisseurs de plusieurs micromètres. Cette méthode dite "couche par couche" permet d'obtenir une structure bien définie en termes de composition, et de propriétés mécaniques et chimiques. Le procédé a été par la suite étendu à d'autres matériaux comme les colloïdes ou les protéines. Les multicouches de polyélectrolytes sont déjà largement exploitées dans de nombreux domaines comme l'optique non linéaire, l'optoélectronique, les détecteurs chimiques et biologiques, les membranes et les biomatériaux.

Pendant de nombreuses années, la recherche sur les biomatériaux s'est principalement attachée à rendre la surface d'un implant la plus inerte possible vis-à-vis des tissus environnant la zone d'implantation dans une optique de biotolérance. Depuis peu, une nouvelle voie consiste à concevoir une surface bioréactive, c'est-à-dire capable d'influencer la réaction tissulaire au voisinage du biomatériau. Ainsi, le grand enjeu actuel réside en l'élaboration de nouvelles structures surfaciques dont la réactivité est contrôlée et modulable en vue d'induire des réponses cellulaires spécifiques et appropriées (adhésion, prolifération, différenciation, ...). L'utilisation des films multicouches de polyélectrolytes devrait ainsi favoriser le contrôle des interactions entre le film recouvrant le biomatériau et les cellules jouxtant la zone d'implantation par la modulation des propriétés intrinsèques du film et le greffage de biomolécules spécifiques. Ces films multicouches peuvent également être mis en œuvre dans le cadre d'une stratégie antibactérienne locale au niveau de l'implant, où l'utilisation de polymères anti-adhésifs, tels que le polyéthylène glycol, (PEG) pourra prévenir

une infection potentielle. Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit se place dans le cadre général des biomatériaux.

Les objectifs à atteindre étaient les suivants :

- Les matériaux utilisés pour construire des films multicouches en vue d'applications biomédicales sont des polyélectrolytes d'origine naturelle ou bien synthétisés à partir d'acides aminés. Ainsi, l'utilisation de ces polyélectrolytes a permis d'identifier un nouveau type de croissance des films multicouches. La croissance de l'épaisseur de ces films en fonction du nombre de couches déposées suit un régime exponentiel et non plus linéaire comme c'était le cas lors de l'utilisation de polyélectrolytes de synthèse à taux de sel voisin du taux physiologique. Ce mode de croissance s'explique notamment par la diffusion sur toute l'épaisseur du film d'au moins l'un des polyélectrolytes participant à la construction. La croissance de ces films a déjà été bien étudiée, par contre la caractérisation des phénomènes de diffusion n'était pas très approfondie. L'objectif de ce premier travail a donc été d'étudier la diffusion des polyélectrolytes dans une multicouche pendant et après la construction.
- Le second travail consistait à développer des films multistrates, c'est-à-dire composés d'une part de multicouches de polyélectrolytes naturels, épaisses et hydratées, pouvant être utilisées en tant que réservoirs de biomolécules actives et d'autre part de films multicouches fins et denses utilisés en tant que barrières pour ces biomolécules. Le cahier des charges portait sur la mise en place de films multicouches entièrement dégradables par des cellules. La fonctionnalisation des réservoirs permet de conférer aux surfaces une ou plusieurs propriétés spécifiques qui pourraient moduler l'activité de cellules mises au contact du film en fonction de l'évolution temporelle de la dégradation de la multicouche.
- Différents types de cellules sont destinés à être cultivés en surface des films multicouches. Une des applications des biomatériaux concerne le recouvrement de la surface d'implants par les multicouches afin d'améliorer leur intégration

dans le milieu vivant. Les multicouches peuvent par exemple intervenir en modulant la force d'adhésion de protéines, d'un type cellulaire ou encore de bactéries. Elles peuvent aussi agir en diminuant la réponse inflammatoire des tissus en contact avec l'implant. Enfin, les multicouches sont susceptibles d'intervenir dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, notamment pour reconstruire un cartilage. Le maintien du phénotype des cellules de cartilage est le principal enjeu de ce domaine. La caractérisation des éléments de la matrice extracellulaire synthétisés par les cellules permettra de mettre en évidence l'influence éventuelle de la multicouche sur les cellules. Le troisième travail a consisté à développer une méthode originale de caractérisation à l'échelle nanométrique de la matrice extracellulaire produite par les cellules de cartilage.

Le présent mémoire se compose de cinq chapitres. Dans le premier chapitre, nous présentons différents travaux concernant les multicouches de polyélectrolytes en nous appuyant sur de nombreuses références bibliographiques. Nous y évoquerons les études réalisées sur la croissance des films linéaires et exponentiels. Plusieurs travaux traitant de l'influence de paramètres de construction comme la température ou le pH des solutions seront décrits. Les domaines d'applications des multicouches seront ensuite mentionnés et plus particulièrement les applications biomédicales de ces dernières, comme la conception de surfaces non adhésives ou biomimétiques. Les travaux concernant la fonctionnalisation des multicouches par diverses biomolécules actives et en particulier ceux entrepris par l'Unité 595 de l'INSERM seront développés. Finalement, les différents exemples de films à compartiments permettant la libération contrôlée de biomolécules seront répertoriés.

Le second chapitre traite des différentes méthodes et techniques employées pour réaliser nos travaux. Après la présentation des différents produits et du procédé utilisés pour produire les échantillons de multicouches, nous présentons la technique de microscopie confocale qui permet d'imager les sections verticales ou horizontales des échantillons grâce à la présence de polyélectrolytes fluorescents. L'analyse des intensités de fluorescence de ces images est ensuite décrite. A ce paragraphe succèdent la description des expériences permettant d'étudier la diffusion des polyélectrolytes dans les multicouches ainsi que des méthodes d'analyse des données expérimentales. Pour clore le chapitre, la technique de microbalance à cristal de quartz permettant de suivre la croissance des premières paires de couches lors de la formation d'un film multicouche est détaillée.

Le troisième chapitre concerne les travaux réalisés à propos sur la diffusion des chaînes de polyélectrolytes dans les films à croissance exponentielle. La première partie de ce chapitre discute de la diffusion des chaînes de polyélectrolytes dans toute l'épaisseur du film lorsque la solution de polyélectrolytes est mise en contact avec ce film. La quantité des chaînes pouvant remplir un film a ainsi été estimée. La seconde partie décrit les résultats d'expériences qui ont identifié les espèces mobiles dans un film exponentiel et quantifié les coefficients de diffusion des chaînes mobiles après la construction.

Les films à croissance exponentielle peuvent constituer des réservoirs à biomolécules ou des barrières à la diffusion de celles-ci. Le quatrième chapitre discute de films multicouches constitués alternativement d'une strate réservoir et d'une strate barrière, celle-ci étant pour la première fois constituée de polyélectrolytes dégradables par les cellules. L'étude de la croissance de ces films, ainsi que leur fonctionnalisation par une protéine sont exposées.

Enfin, le dernier chapitre traite d'une méthode originale de caractérisation de la matrice extracellulaire synthétisée par des cellules de cartilage, les chondrocytes. Cette caractérisation fait appel à la technique de microscopie à force atomique couplée à des méthodes d'immunomarquage. L'ensemble a pour but de déterminer le type de fibres de collagène synthétisé par les cellules afin de discerner un éventuel changement de phénotype. La méthode a été initialement testée sur des modèles cellulaires connus avant d'être appliquée aux cellules de cartilage et à l'étude phénotypique lors de leur ensemencement sur différents matériaux.

Chapitre 1 Les films multicouches de polyélectrolytes

1.1 Historique	18
1.2 Caractéristiques physico-chimiques	20
1.2.1 <i>Les modes de croissance</i>	20
1.2.2 <i>Influence de différents paramètres de construction</i>	32
1.2.3 <i>Polyélectrolytes utilisés</i>	35
1.2.4 <i>Substrats employés</i>	36
1.3 Applications biomédicales et fonctionnalisation des films multicouches	37
1.3.1 <i>Domaines d'applications des films multicouches</i>	37
1.3.2 <i>Propriétés de surfaces anti-adhésives</i>	38
1.3.3 <i>Surfaces biomimétiques</i>	38
1.3.4 <i>Fonctionnalisation par insertion de biomolécules</i>	40
1.4 Films à compartiments	43
Bibliographie	47

1.1 Historique

Les premiers films nanostructurés ont été réalisés à partir de molécules amphiphiles, molécules possédant une tête hydrophile et une queue hydrophobe. Placées à l'interface liquide / air, les molécules s'auto-organisent en monocouche. La monocouche formée est ensuite transférée sur un substrat (technique de Langmuir-Blodgett) [Blodgett and Langmuir 1937]. Néanmoins, la formation de films multicouches par cette méthode est limitée à l'utilisation de certains types de molécules (molécules tensioactives) et nécessite des formes simples du substrat. De plus, les multicouches obtenues sont réduites à un nombre très limité de monocouches.

En 1966, Iler a montré qu'il était possible de créer des films multicouches par adsorptions successives de colloïdes anioniques et cationiques. Néanmoins, la stratification de ces films n'ayant pas été prouvée à l'époque par manque de techniques de caractérisation adaptées, ce travail a très peu intéressé la communauté scientifique [Iler 1966].

Au cours de la décennie 1980, cette idée a été reprise pour former des films multicouches à base de protéines et de polyélectrolytes [Fromherz 1980]. Des films de ce type ont aussi été réalisés avec des protéines (héparine) et des colloïdes biologiques cationiques (complexes hexadécylamine / héparine) [Gölander *et al.* 1982]. Cependant, les films formés se révélaient très instables au-delà de quelques paires de couches déposées : un phénomène de floculation en surface était observable, celui-ci détruisant l'uniformité du film formé.

Durant la même période, des techniques d'auto-assemblage reposant sur la chimie covalente du système silane / silice [Netzer and Sagiv 1983] et la chimie de coordination des systèmes métal / phosphonate [Cao *et al.* 1992] ont été utilisées comme alternative à la technique de Langmuir-Blodgett. Ces techniques comportaient également des inconvénients : elles étaient applicables seulement à certains types de molécules organiques et limitées à un faible nombre de couches.

Les travaux de Decher au début des années 1990 ont apporté un moyen de surmonter les difficultés mentionnées ci-dessus [Decher *et al.* 1992]. Le dépôt couche par couche (ou « Layer by layer », LbL) de polyanions et de polycations sur un substrat chargé a permis de développer des films multicouches (figure 1.1 – 1). L'élaboration de ces films a été possible grâce aux interactions électrostatiques entre la surface du substrat et la première couche de polyélectrolyte, et l'interaction entre les polyélectrolytes de charges opposées des couches

suivantes. Chaque dépôt de polyélectrolytes permet de maintenir la densité de charges en surface, moteur indispensable à la construction. Cette méthode a ainsi rendu possible le développement de films stables de plusieurs dizaines de couches. Ce procédé permet aussi d'utiliser n'importe quelle nature, taille ou topographie de substrat pourvu qu'il soit chargé.

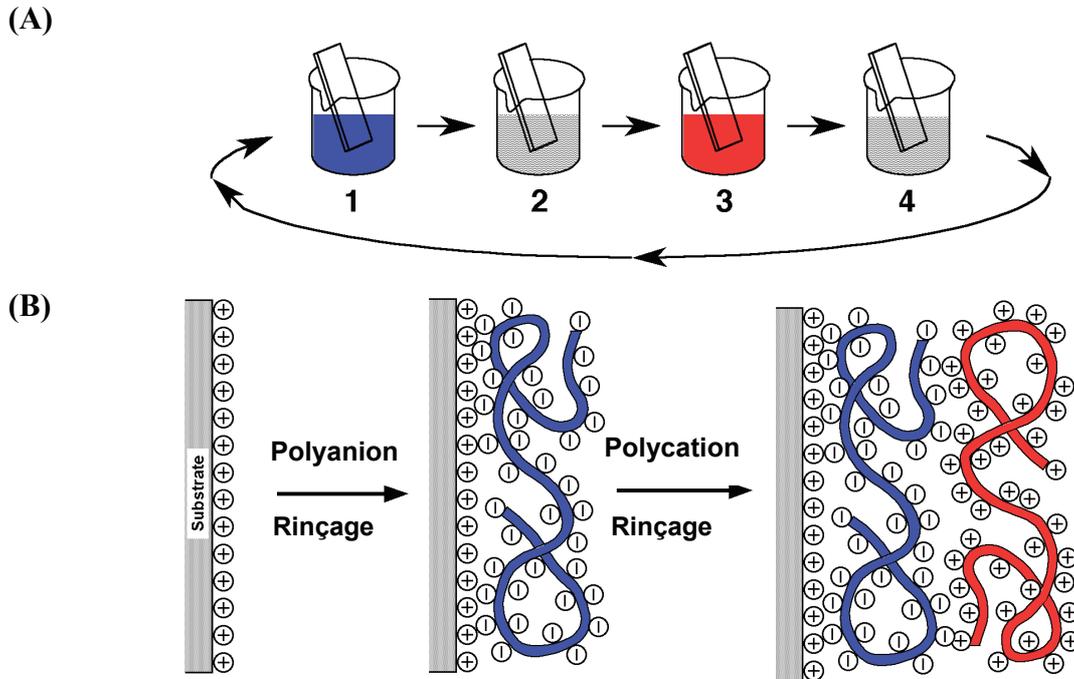


Figure 1.1 – 1 : (A) Principe du dépôt couche par couche. Les étapes 1 et 3 correspondent à l'adsorption du polyanion et du polycation sur un substrat (dans ce cas chargé positivement). Les étapes 2 et 4 correspondent à l'étape de rinçage suivant l'adsorption d'un polyélectrolyte. Ces quatre étapes représentent la séquence de base pour le dépôt d'une paire de couches. La répétition de cette séquence permet d'obtenir le nombre de paires de couches souhaité. (B) Schéma simplifié à l'échelle moléculaire des deux premières étapes d'adsorption mettant en évidence l'inversion du signe de la charge de surface après chaque dépôt [Decher 1997].

1.2 Caractéristiques physico-chimiques

De nombreux systèmes de polyélectrolytes ont été étudiés, notamment du point de vue de la croissance de films et de l'influence de différents paramètres sur cette construction. Ces travaux ont permis d'identifier différents modes de croissance de l'épaisseur, linéaire et exponentiel (figure 1.2 – 1). L'influence de paramètres tels que la température de construction, le pH ou la concentration saline des solutions de polyélectrolytes sera discutée dans ce chapitre.

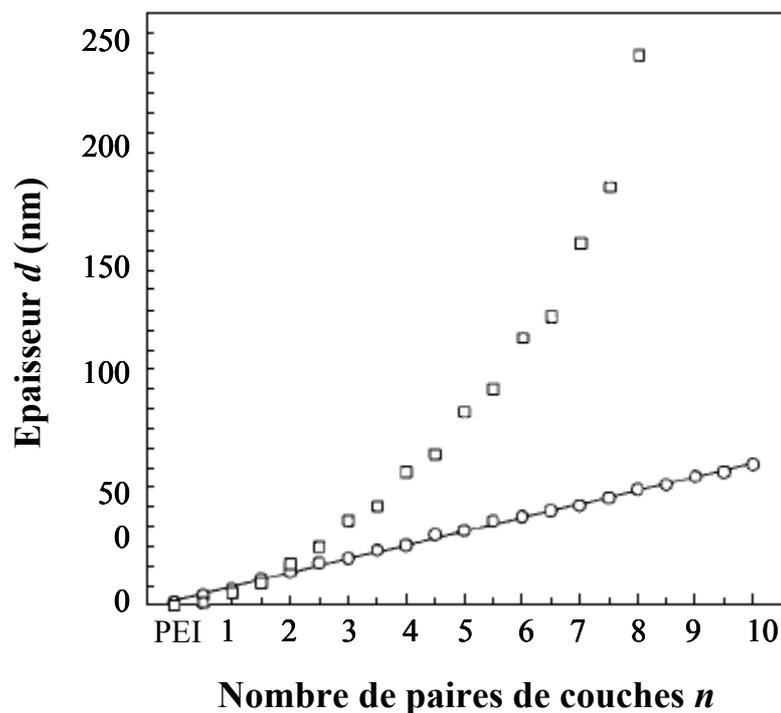


Figure 1.2 – 1 : Augmentation de l'épaisseur d d'un film (O) PEI – (PGA – PLL)_n et d'un film (□) PEI – (PSS – PAH)_n en fonction du nombre de paires de couches déposées suivie par spectroscopie optique par guide d'onde [Lavalle *et al.* 2002]. Le sigle PEI correspond à poly(éthylène imine), PGA à poly(acide L-glutamique), PLL à poly(L-lysine), PSS à poly(styrène sulfonate) et PAH à poly(hydrochlorure d'allylamine).

1.2.1 Les modes de croissance

- **Croissance linéaire**

Les premiers films multicouches ont été développés au début des années 1990. Ces films se construisaient suivant une croissance linéaire de leur masse et de leur épaisseur en

fonction du nombre de paires de couches déposées. Le film le plus largement documenté est basé sur le couple poly(hydrochlorure d'allylamine) – poly(styrène sulfonate) [Decher and Schmitt 1992, Ramsden *et al.* 1995]. Il a été montré qu'à chaque dépôt de l'un des polyélectrolytes, la charge de surface changeait de signe [Caruso *et al.* 1997a]. Cette inversion de charge permet ainsi le dépôt supplémentaire de polyélectrolytes de charge opposée. Ce phénomène de surcompensation de charge est le moteur de la croissance des films multicouches (figure 1.2.1 – 1) [Ladam *et al.* 2000b]. Une description théorique de ce phénomène a aussi été proposée [Joanny 1999, Netz and Joanny 1999]. Les chaînes de polyélectrolytes forment des boucles en solution. Ainsi seule une partie des charges de chaque chaîne interagit avec le substrat ou la couche de polyélectrolyte précédente. Les autres charges de chaque chaîne vont permettre de créer des interactions avec des chaînes portant des charges de signe opposé (cf. figure 1.1 – 1).

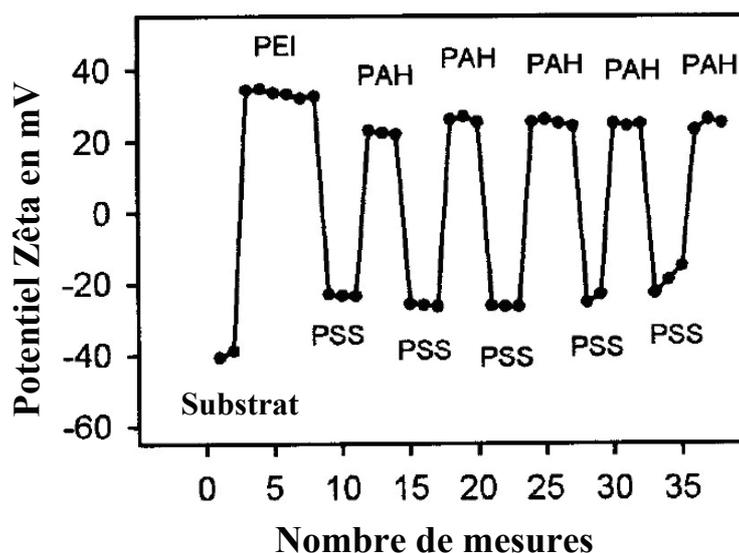


Figure 1.2.1 – 1 : Évolution du potentiel zêta pendant la construction d'un film PEI – (PSS – PAH) [Ladam *et al.* 2000b].

Les exemples de films à croissance linéaire sont des multicouches de poly(hydrochlorure d'allylamine) – poly(styrène sulfonate), ou (PAH – PSS) [Schmitt *et al.* 1993], chlorure d'ammonium de poly(diallyldiméthyle) – poly(styrène sulfonate), ou (PDADMAC – PSS) [Caruso *et al.* 1999], poly(hydrochlorure d'allylamine) – poly(acide acrylique), ou (PAH – PAA) [Yoo *et al.* 1998], et encore collagène – acide hyaluronique, ou (COL – HA) [Zhang *et al.* 2005].

Une organisation le long de l'épaisseur a été mise en évidence par réflexion de neutrons et de rayons X : pour des films dont certaines couches contenaient des polyélectrolytes deutérés, des pics de Bragg étaient observables [Lvov *et al.* 1993a, Schmitt *et al.* 1993]. Ces expériences ont aussi démontré que les couches de polyélectrolytes sont interpénétrées, provoquant un désordre local [Decher *et al.* 1994]. Ainsi chaque couche est solidaire de ses voisines.

Une étude alternative réalisée par Ladam *et al.* [Ladam *et al.* 2000b] sur les différentes étapes de la croissance linéaire ont abouti à un modèle de multicouches en trois zones (figure 1.2.1 – 2) [Ladam *et al.* 2000b]. Les zones I et III sont à l'interface substrat / film et film / solution, respectivement. La structure de chacune de ces zones est fortement influencée soit par le substrat soit par la solution. Lorsque le film atteint une épaisseur suffisante (qui dépend notamment de la nature des polyélectrolytes et du substrat), une zone II apparaît, celle-ci n'étant influencée ni par le substrat, ni par la solution. Les auteurs ont admis que les zones I et III conservaient leur épaisseur au cours de la construction une fois que la zone II existe, alors que l'épaisseur de cette dernière augmente au cours de la croissance du film.

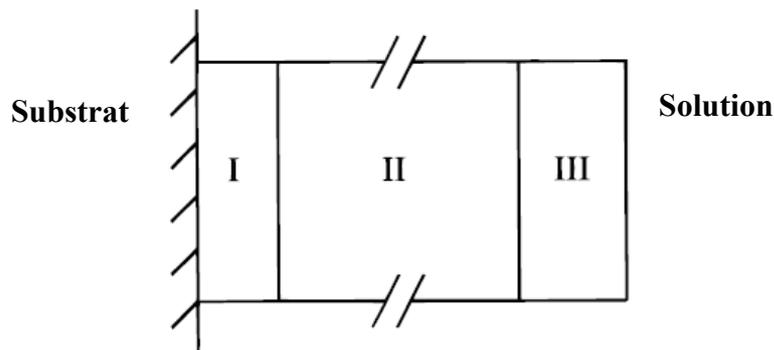


Figure 1.2.1 – 2 : Représentation schématique d'un film multicouche (substrat à gauche du schéma, solution à droite). Les transitions entre les différentes zones sont probablement plutôt graduelles et non pas abruptes comme schématisé [Ladam *et al.* 2000b].

- **Croissance exponentielle**

Durant les années 1990, toutes les constructions de films multicouches de polyélectrolytes présentaient une croissance linéaire de leur épaisseur. A la fin de cette décennie, les premiers films dont l'augmentation de la masse (ou de l'épaisseur) suivait une loi exponentielle en fonction du nombre de couches déposées ont été développés (figure 1.2.1

– 3). Les premiers films de ce type étaient basés sur le couple poly(L-lysine) et alginate [Elbert *et al.* 1999].

Ces auteurs ont évoqué la possibilité de la formation de complexes poly(L-lysine) / alginate et la formation d'un gel à la surface du film pendant les étapes successives de dépôt, mais n'ont pas présenté de modèle expliquant le mécanisme réel de la croissance exponentielle. Ce type de croissance avait aussi été observé pour des systèmes poly(L-lysine) biotinylée et streptavidine [Cassier *et al.* 1998] et des films composés de polyélectrolytes de différentes densités de charge le long de la chaîne principale [Kolarik *et al.* 1999].

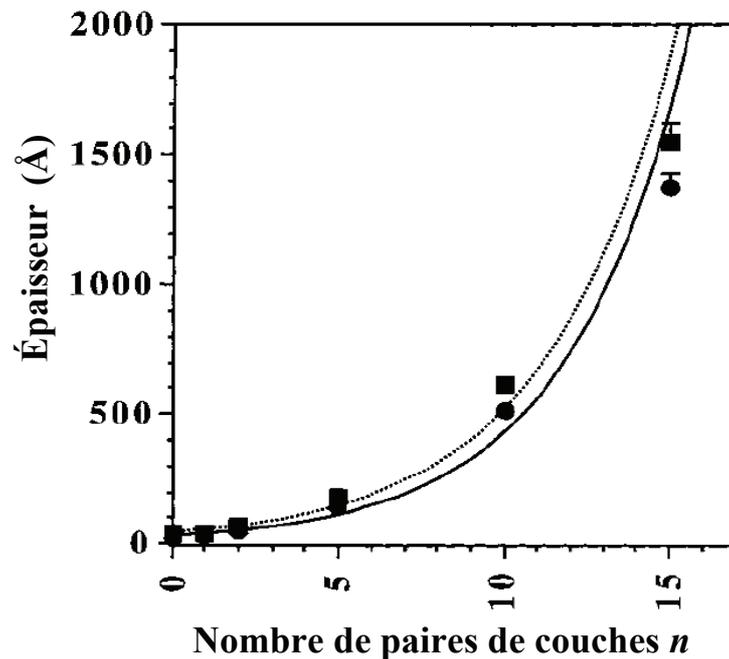


Figure 1.2.1 – 3 : Evolution de l'épaisseur du film adsorbé en fonction du nombre de paires de couches déposées pour le film poly(L-lysine) – alginate, $(PLL - Alg)_n$. Les épaisseurs sont déterminées par ellipsométrie après rinçage à l'eau et séchage. Chaque point représente la moyenne de trois mesures, les barres d'erreur correspondant à l'écart type. Des lames de Si / SiO₂ (■) et des lames de Si / SiO₂ avec une couche de gélatine pré-adsorbée (●) ont été utilisées comme substrats. Les ajustements exponentiels sont représentés par les courbes en pointillés pour la lame simple et la ligne continue pour la lame + gélatine [Elbert *et al.* 1999].

Picart *et al.* ont proposé les premiers modèles de la croissance exponentielle [Picart *et al.* 2001]. Ils ont suggéré que le mode de croissance d'un film basé sur le couple poly(L-lysine) et acide hyaluronique était dû à la capacité des chaînes de poly(L-lysine) à diffuser vers l'intérieur du film au moment de leur dépôt et vers l'extérieur du film lors du dépôt de l'acide hyaluronique. Les chaînes des deux composés interagissent ainsi à la limite supérieure du film, pour former ainsi la nouvelle couche. La quantité de chaînes de poly(L-lysine) pénétrant dans le film (ceci s'accompagnant d'une expulsion de molécules d'eau) est

proportionnelle à l'épaisseur du film, d'où la croissance exponentielle. Nous décrirons plus précisément ce processus ultérieurement. La diffusion des chaînes de poly(L-lysine) dans toute l'épaisseur du film ainsi que l'immobilité des chaînes d'acide hyaluronique ont été mis en évidence par microscopie confocale [Picart *et al.* 2002].

La figure 1.2.1 – 4 (A) correspond à une section du film (PLL – HA)₁₉ – PLL en microscopie confocale. De la poly(L-lysine) marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (PLL^{FITC}) ainsi que de l'acide hyaluronique marqué au « Texas Red » (HA^{TR}) ont été déposés en tant que 19^{ème} paire de couches. Les images de microscopie confocale révèlent que l'acide hyaluronique reste au sommet du film, tandis que la poly(L-lysine) diffuse dans toute l'épaisseur du film. La construction de 6 paires de couches supplémentaires confirme le comportement de ces deux polyélectrolytes (partie (B)).

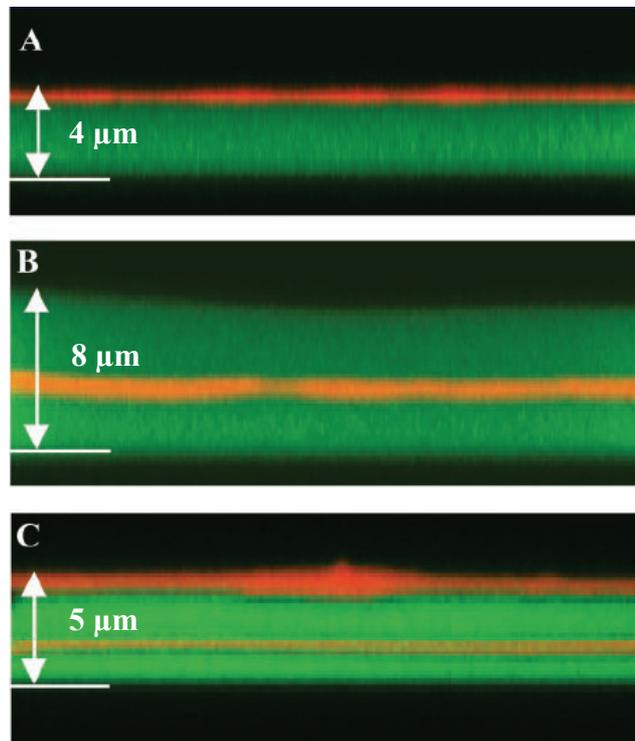


Figure 1.2.1 – 4 : Observation en microscopie confocale de la section en z de différentes constructions multicouches contenant des polyélectrolytes marqués. La fluorescence verte est émise par les chaînes de PLL^{FITC} et la fluorescence rouge est émise par les chaînes de HA^{TR}. **(A)** (PLL – HA)₁₈ – PLL^{FITC} – HA^{TR} – PLL. **(B)** (PLL – HA)₂₅ – PLL où la 19^{ème} paire de couche est marquée par PLL^{FITC} et HA^{TR}. **(C)** (PLL – HA)₂₀ où les 14^{ème} et 20^{ème} dépôts d'acide hyaluronique sont du HA^{TR}. Le dernier dépôt correspond à la PLL^{FITC} [Picart *et al.* 2002].

Un modèle du mécanisme de construction a été développé par Lavallo *et al.* [Lavallo *et al.* 2004a] et Richert *et al.* ont résumé les points principaux de ce modèle [Richert *et al.*

2004b]. Nous reprenons cette description dans la figure 1.2.1 – 5. On se place dans le cas d'un film (PLL – HA) se terminant par HA (A). Lors du dépôt suivant de PLL, ces chaînes diffusent dans toute l'épaisseur du film (B), molécules que l'on nomme « chaînes libres ». Le potentiel chimique de ces chaînes augmente alors jusqu'à être égal à celui des chaînes en solution. A ce moment, le processus de diffusion vers l'intérieur du film s'arrête (C).

Lors du rinçage (D), les molécules de PLL peuvent franchir la barrière de potentiel électrostatique pour sortir du film. Cependant, ce nombre de molécules à l'intérieur du film diminuant, leur potentiel chimique fait de même et les chaînes de PLL ont une barrière de plus en plus élevée à franchir. Ainsi toutes les chaînes libres ne s'échappent pas du film pendant la durée finie du rinçage.

Lors de l'addition de HA, la barrière électrostatique disparaît et les molécules de PLL peuvent diffuser hors du film. Cependant, 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). Le processus s'arrête une fois que toutes les chaînes libres de PLL se sont complexées avec les chaînes de HA, pour un temps d'exposition suffisant. L'incrément de masse dû au dépôt de cette nouvelle couche doit être proportionnel à la quantité de chaînes de PLL présentes dans le film à la fin de la précédente étape de rinçage. Cette quantité est approximativement proportionnelle à l'épaisseur du film avant cette nouvelle étape de dépôt. Après chaque dépôt, la quantité de chaînes de PLL présentes dans le film augmente et entraîne ainsi une augmentation de la masse 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. Le cycle d'adsorption peut alors recommencer.

Ce modèle ne suffit cependant pas à expliquer le résultat de la figure 1.2.1 – 4. En effet, comme la PLL^{FITC} diffuse dans toute l'épaisseur du film, le dépôt de HA aurait dû vider le film des chaînes libres de PLL^{FITC}. Le film étant néanmoins complètement marqué par la PLL^{FITC} après le dépôt de HA, un échange à chaque étape de dépôt entre des chaînes de PLL liées fortement au film et les chaînes libres de PLL a alors été envisagé.

Le mécanisme présenté dans le cas des films (PLL – HA) s'applique aussi à d'autres films à croissance exponentielle, comme (PLL – PGA) où cependant dans ce cas les deux polyélectrolytes sont capables de diffuser dans toute l'épaisseur du film.

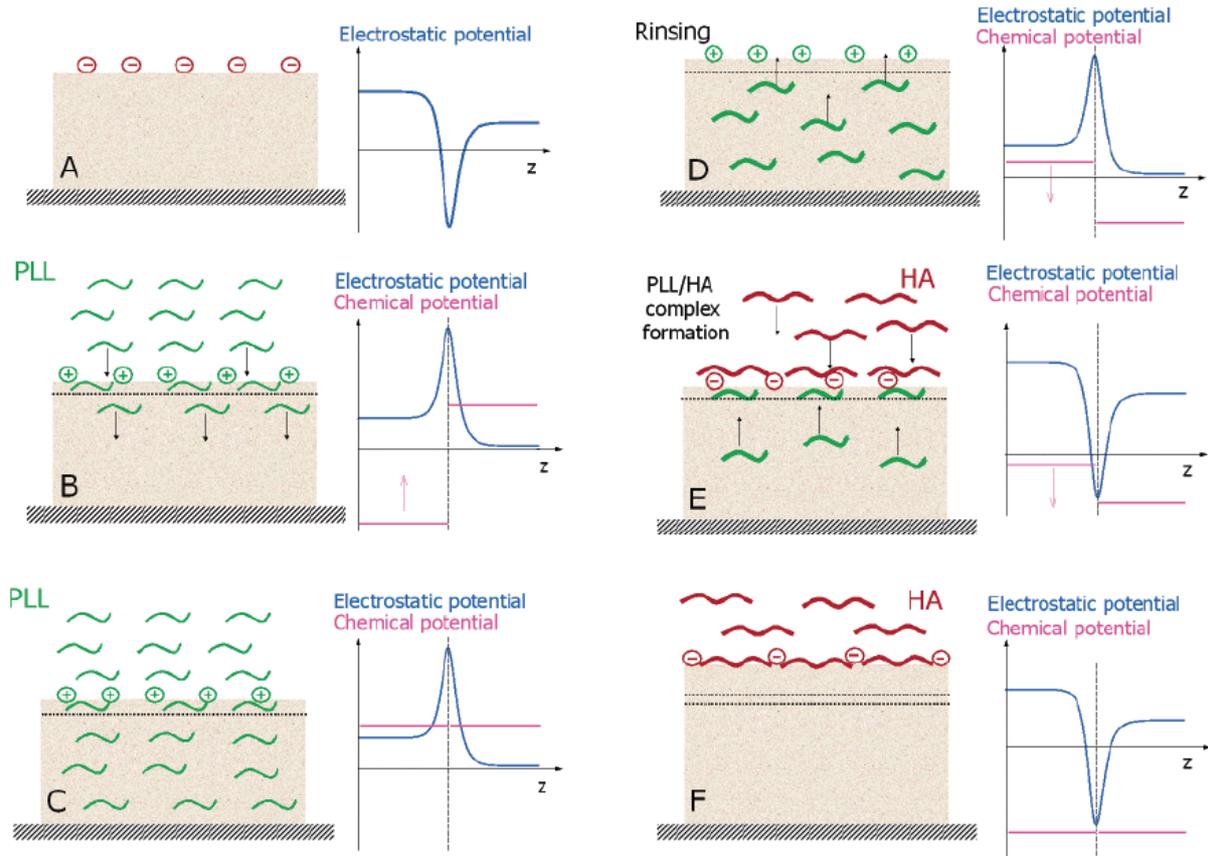


Figure 1.2.1 – 5 : Mécanisme de construction d'un film multicouche à croissance exponentielle, basé sur la poly(L-lysine) (PLL) et l'acide hyaluronique (HA). [Richert *et al.* 2004b].

• Transition croissance exponentielle / linéaire

Nous avons détaillé précédemment les deux modes de croissance de films multicouches de polyélectrolytes connus au début des années 2000. Depuis quelques années, des travaux ont mis en évidence la transition du mode de croissance exponentiel au mode de croissance linéaire.

La première description expérimentale de ce type de transition a été fournie par Hübsch *et al.* [Hübsch *et al.* 2004]. Les auteurs ont étudié la croissance d'un film multicouche basé sur un polycation, le PAH, et un mélange binaire de polyanions, le PGA et le PSS. Ces polyanions ont été choisis car l'un, le PGA, induit une croissance exponentielle avec le PAH, et l'autre, le PSS, induit une croissance linéaire avec le PAH. Hübsch *et al.* ont montré qu'il était possible de modifier la croissance du film en jouant sur la composition du mélange binaire. Avec x la fraction massique de PGA dans la solution, la construction de ces films s'écrit : $(\text{PGA}_x / \text{PSS}_{1-x}) - \text{PAH}$. Pour des valeurs de x très proches de 0 (ou de 1), la

croissance reste linéaire (ou exponentielle) sur le domaine d'épaisseur qui a pu être exploré à l'aide de la microbalance à cristal de quartz (QCM). Par contre dans le cas de valeurs intermédiaires de x , la croissance exponentielle s'arrête brusquement pour devenir linéaire (figure 1.2.1 – 6).

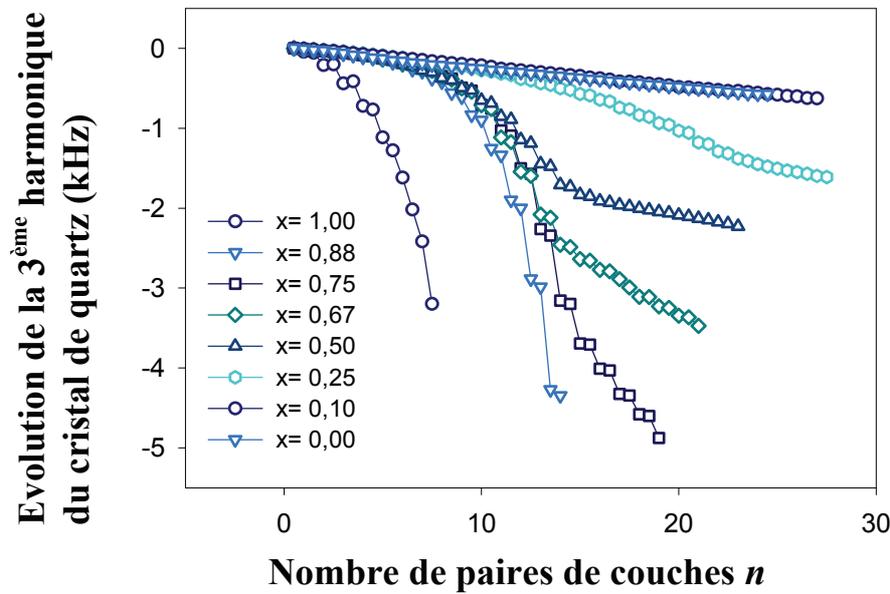


Figure 1.2.1 – 6 : Etude de la croissance d'un film $(PGA_x / PSS_{1-x} - PAH)_n$ par microbalance à cristal de quartz (QCM) [Hübsch *et al.* 2004]. Cette technique permet de suivre la masse de polyélectrolytes déposée à chaque couche en mesurant la diminution de la fréquence de résonance du cristal (5 MHz) et de ses harmoniques (15, 25 et 35 MHz) pendant la construction du film. Seule l'évolution de la fréquence de la 3^{ème} harmonique est représentée sur le graphique : $\frac{\Delta f_{15\text{MHz}}}{\nu}$ où $\nu = 3$.

Les auteurs ont proposé une explication de l'origine de la transition et de la variation de la pente entre la fin du régime exponentiel et le régime linéaire (figure 1.2.1 – 7) :

- Origine de la transition : en supposant que les deux polyanions sont capables de diffuser sur toute l'épaisseur du film (et qu'ils ont des coefficients de diffusion identique), le nombre de chaînes de polyanions disponibles pour former des complexes avec les chaînes de PAH est proportionnel à l'épaisseur du film. Cette hypothèse conduit à une croissance exponentielle de l'épaisseur en fonction du nombre de paires de couches déposées. Une fois que le film atteint une épaisseur critique, les chaînes des deux polyanions ne sont plus capables de diffuser dans toute l'épaisseur. Le nombre de chaînes de polyanions participant à la formation

de complexes avec le PAH devient alors constant. La croissance se modifie ainsi en croissance linéaire de même pente que celle observée à la fin du régime de croissance exponentielle.

- Cause du changement de pente : il est supposé que les deux polyanions n'ont pas le même coefficient de diffusion pour migrer hors du film. Une fois une épaisseur critique atteinte, les chaînes du polyanion le plus lent ne peuvent plus diffuser complètement vers l'extérieur du film pendant le temps de contact avec la solution de PAH. La composition de la couche où se forment les nouveaux complexes polyanion – polycation est modifiée. La densité de cette zone devient plus importante, réduisant ainsi significativement les coefficients de diffusion des deux polyanions. La zone concernée par la diffusion de chaînes de polyanions devient plus petite ainsi que la quantité de chaînes disponibles pour former de nouveaux complexes. Cela permet d'expliquer le changement de pente entre la fin du régime exponentiel et le régime linéaire.

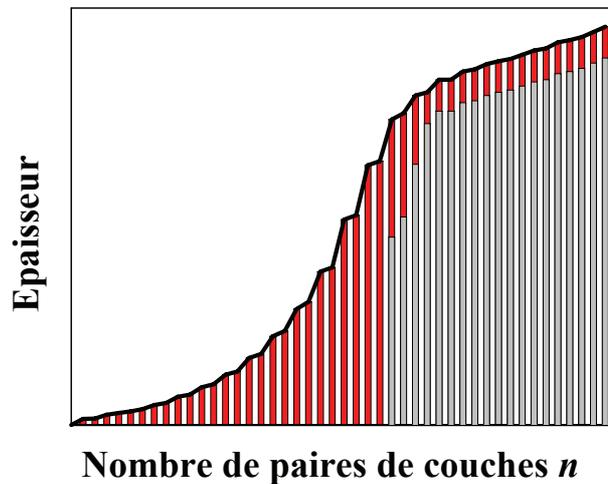


Figure 1.2.1 – 7 : Représentation du modèle de la profondeur variable de diffusion des polyanions. Les traits en rouge symbolisent la partie du film disponible à la diffusion, n correspond au nombre de paires de couches déposées.

D'autres expériences ont révélé une modification du mode de croissance en cours de construction d'un film multicouche. Une étude approfondie de la construction des films contenant un nombre assez élevé de paires de couches (>12) poly(L-lysine) – acide hyaluronique a révélé une transition de la croissance d'un mode exponentiel à un mode

linéaire (figure 1.2.1 – 8). Il a été montré que cette transition se produisait toujours au même nombre de paires de couches ($12^{\text{ème}}$) et que la pente de la croissance linéaire était identique à la pente en fin de mode exponentiel, quelles que soient les valeurs temps de dépôt des polyélectrolytes HA ou PLL [Porcel *et al.* 2006]. Ces films ont été construits par pulvérisation alternée des polyélectrolytes sur le substrat placé verticalement. Cette méthode est la plus rapide pour élaborer des films multicouches [Schlenoff *et al.* 2000].

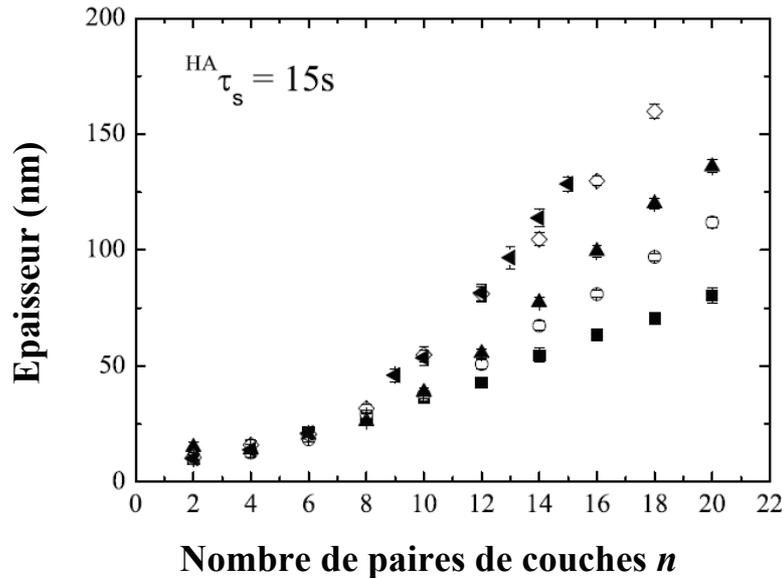


Figure 1.2.1 – 8 : Croissance de film $(PLL - HA)_n$ pour différents temps τ_{PLL} de dépôt de PLL, le temps de dépôt de HA restant égal à 15 secondes : $\tau_{PLL} = 3s$ (■), $6s$ (○), $9s$ (▲), $12s$ (◇) et $15s$ (◄) [Porcel *et al.* 2006].

Dans un premier temps pour expliquer le phénomène, une structure en trois zones a été proposée (figure 1.2.1 – 9). Il est supposé que le film se restructure ce qui limite voire empêche la diffusion de la poly(L-lysine) dans toute une partie du film. Cette zone **II** grandit avec le nombre de dépôts, tandis que la zone **III** du film présente à l'interface film / solution reste concernée par la diffusion des chaînes de poly(L-lysine) et conserve une épaisseur constante au cours de la construction.

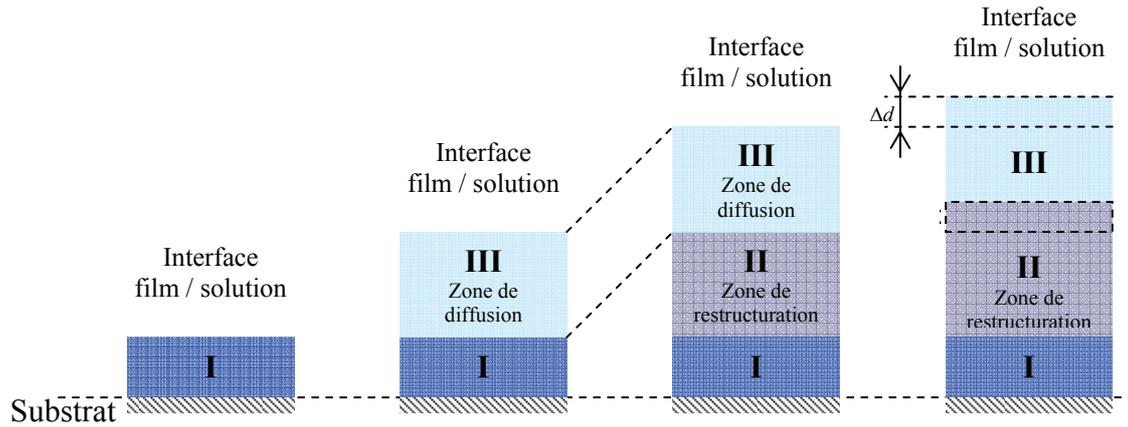


Figure 1.2.1 – 9 : Modèle à trois zones des films à croissance exponentielle. Δd correspond à l'incrément d'épaisseur du film pour une paire de couche supplémentaire. Cet incrément d'épaisseur se répercute uniquement dans la zone II, la zone III conserve une épaisseur constante.

Dans un second travail, ce modèle a été affiné [Porcel *et al.* 2007]. En effet, la construction de films poly(L-lysine) – acide hyaluronique avec des masses molaires de poly(L-lysine) différentes a montré que (figure 1.2.1 – 10) :

- La transition de la croissance exponentielle à la croissance linéaire se produit après un nombre de paires de couches différent (12 à 18) en fonction de la masse molaire de la poly(L-lysine) (figure 1.2 .1 – 10 **(A)**).
- La pente de la croissance linéaire est très peu dépendante de la masse molaire de la poly(L-lysine) utilisée pour la construction pour une masse molaire de l'acide hyaluronique fixée. Elle est aussi identique à la pente de la fin de la croissance exponentielle (figure 1.2 .1 – 10 **(A)**). Par contre, celle-ci est dépendante, à masse molaire de poly(L-lysine) fixée, de la masse molaire de l'acide hyaluronique (figure 1.2 .1 – 10 **(B)**).

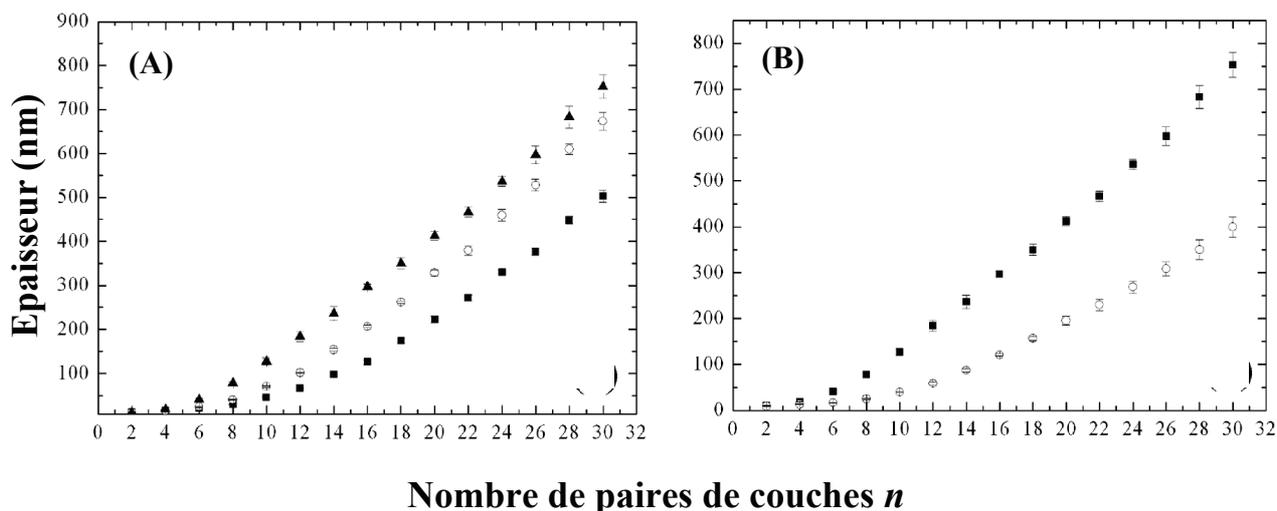


Figure 1.2.1 – 10 : (A) Influence de la masse molaire de la PLL sur la construction d'un film $(PLL - HA)_n$. La masse molaire de l'acide hyaluronique est de 130 000 g / mol. La masse molaire de la poly(L-lysine) est de 20 000 g / mol (■), 70 000 g / mol (○) et de 360 000 g / mol (▲). (B) Influence de la masse molaire de l'acide hyaluronique sur la construction d'un film $(PLL - HA)_n$. La masse molaire de la poly(L-lysine) est de 360 000 g / mol. La masse molaire de l'acide hyaluronique est de (■) 130 000 g / mol (○) 400 000 g / mol [Porcel *et al.* 2007].

Les auteurs ont remarqué que la pénétration de poly(L-lysine) fluorescente dans un tel film est très dépendante de la masse molaire de celle-ci mais pas du tout des masses molaires des polyélectrolytes utilisés pour la construction du film. Ainsi, une chaîne de PLL de faible masse molaire pénètre dans toute l'épaisseur du film tandis qu'une chaîne de PLL de masse molaire plus importante reste principalement confinée en haut du film sur une épaisseur de 4 μm (figure 1.2.1 – 11).

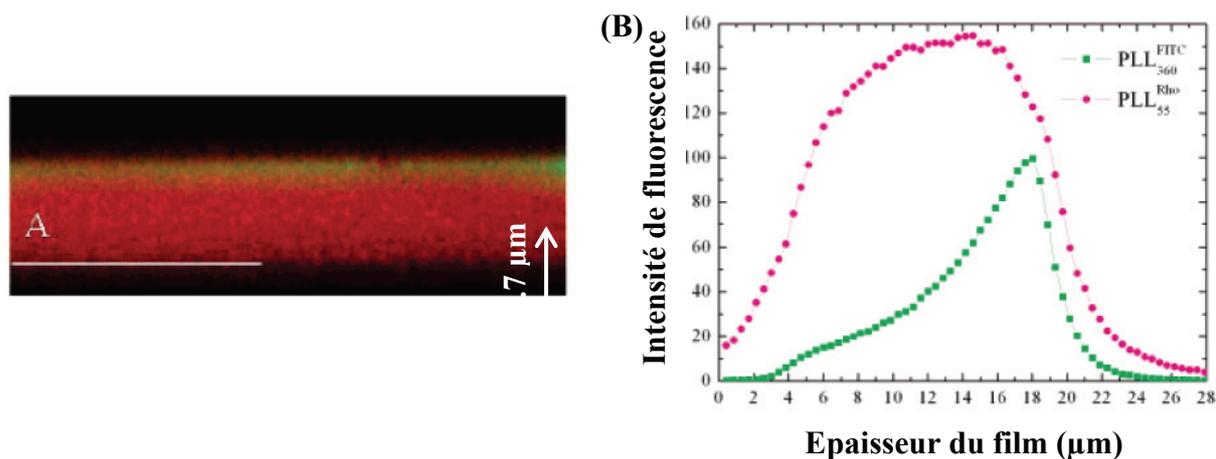


Figure 1.2.1 – 11 : (A) Observation en microscopie confocale de la section en z d'un film $PEI - (HA - PLL)_{80} - HA - PLL_{360000}^{\text{FITC}} - HA - PLL_{55000}^{\text{Rho}}$. (B) Profils de fluorescence correspondant. Les masses molaires des polyélectrolytes utilisés pour construire le film sont de 400 000 g / mol pour l'acide hyaluronique et 360 000 g / mol pour la poly(L-lysine). La poly(L-lysine) de faible masse (PLL^{Rho} de 55 000 g / mol) pénètre dans toute l'épaisseur du film de manière homogène, tandis que celle de masse plus élevée (PLL^{FITC} de 360 000 g / mol) est principalement présente à la surface du film [Porcel *et al.* 2007].

La diffusion de chaînes de PLL de masse molaire élevée limitée aux 4 μm au sommet du film a initialement été expliquée par la présence d'une zone de restructuration (zone II sur la figure 1.2.1 – 9) empêchant la diffusion de ces chaînes dans toute l'épaisseur du film. Si la transition exponentielle / linéaire était due à la limitation de la diffusion de la PLL, celle-ci devrait apparaître lorsque le film aurait atteint une épaisseur de 4 μm . Or la transition apparaît lorsque le film atteint une épaisseur d'environ de 1 μm , c'est-à-dire bien en dessous de l'épaisseur pour laquelle les chaînes de PLL ne peuvent plus diffuser sur toute l'épaisseur du film. La zone de restructuration ne suffit donc pas à expliquer la transition de croissance.

Les auteurs proposent un modèle tenant compte d'une zone d'interaction de l'acide hyaluronique lors de son dépôt. Ils supposent que l'acide hyaluronique est capable d'interagir avec les chaînes de poly(L-lysine) sur une épaisseur d'environ 1 μm au sommet du film. Une fois que le film dépasse cette épaisseur, l'interaction est limitée, et la croissance linéaire débute.

1.2.2 Influence de différents paramètres de construction

- **Influence du pH des solutions de polyélectrolytes**

La variation du pH des solutions de polyélectrolytes faibles implique une variation du degré d'ionisation des chaînes. Le changement d'ionisation modifie par voie de conséquence la conformation des chaînes en solution. Cet effet est similaire à celui induit par la modulation de la force ionique : la quantité de charges par chaîne est modifiée et donc les interactions entre chaînes également.

La variation du pH des solutions de polyélectrolytes lors de la construction d'un film (PAA – PAH) fait varier l'incrément d'épaisseur à chaque dépôt d'un polyélectrolyte (figure 1.2.2 – 1) [Shiratori and Rubner 2000]. À pH égal à 7, l'épaisseur du dépôt atteint 0.5 nanomètres, tandis qu'à pH égal à 5, elle peut atteindre 8 nanomètres. Les auteurs ont expliqué cette différence par la quantité de charges présentes le long des chaînes de polyélectrolytes. A pH neutre, les chaînes sont très ionisées car le pKa du PAA est égal à 5 et le pKa du PAH est égal à 9, il y a une répulsion forte le long de chaque chaîne, elles adoptent donc une conformation allongée. A pH = 5, le PAA est plus protoné, ses chaînes adoptent alors une conformation plutôt sous forme de pelote et l'incrément d'épaisseur après chaque dépôt est plus grand.

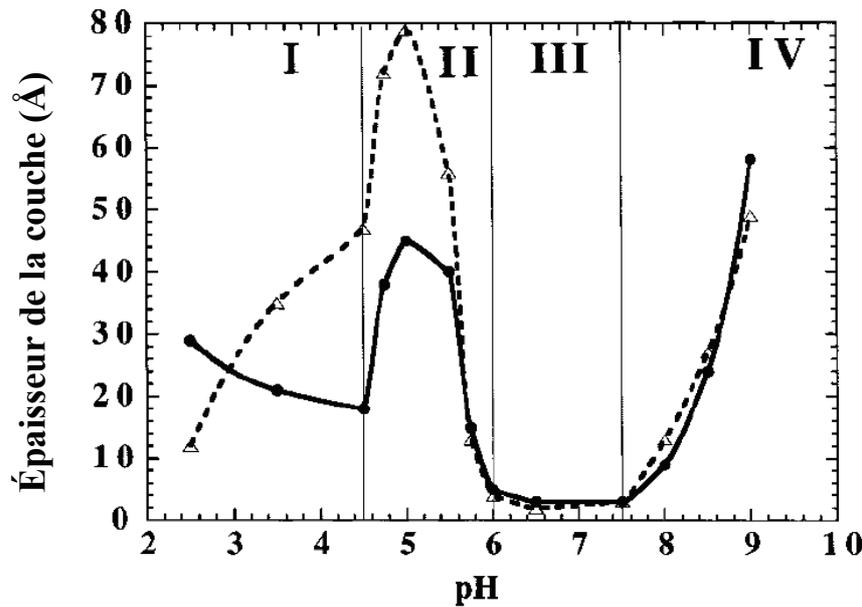


Figure 1.2.2 – 1 : Épaisseur d'une couche de PAH (pointillés) ou de PAA (ligne continue) en fonction du pH des solutions [Shiratori and Rubner 2000].

- **Influence de la force ionique**

McAloney *et al.* ont démontré l'influence de la force ionique sur l'épaisseur et la rugosité des multicouches de polyélectrolytes. Ils ont observé que l'augmentation du taux de sel des solutions entraînait l'augmentation de l'épaisseur et de la rugosité d'un film (PDADMAC – PSS) (figure 1.2.2 – 2) [McAloney *et al.* 2001]. Ils ont expliqué ces résultats par le changement de conformation des chaînes de polyélectrolytes en fonction de la force ionique de la solution. En effet, à faible taux de sel, la répulsion entre les charges présentes le long des chaînes n'est pas suffisamment écrantée par les ions : les chaînes adoptent une conformation en bâtonnet pour agrandir au maximum la distance entre les charges et ainsi diminuer la force de répulsion. A force ionique élevée, l'écrantage est plus important, la répulsion entre les charges de chaque chaîne est plus faible. Le rayon de giration des chaînes diminue [Joanny 1999] et elles adoptent ainsi une conformation en pelote, dont l'effet est d'augmenter l'épaisseur du film. En augmentant suffisamment la concentration en NaCl des solutions de polyélectrolytes ou de rinçage (1 M), la croissance d'un film (PAH – PSS) peut même être rendue exponentielle [Picart *et al.* 2004].

L'effet du taux de sel sur un film (PAH – PSS) a aussi été examiné [Ladam *et al.* 2000b]. Ces auteurs ont remarqué que l'augmentation du taux de sel impliquait l'augmentation de la quantité de polyélectrolyte déposée et de l'épaisseur de la multicouche.

De plus, le film une fois formé gonflait lorsqu'il était mis en contact d'une solution à concentration saline plus faible que celle des solutions de polyélectrolytes et de rinçage. Ce gonflement est totalement réversible une fois que le film est remis dans les conditions initiales de concentration saline.

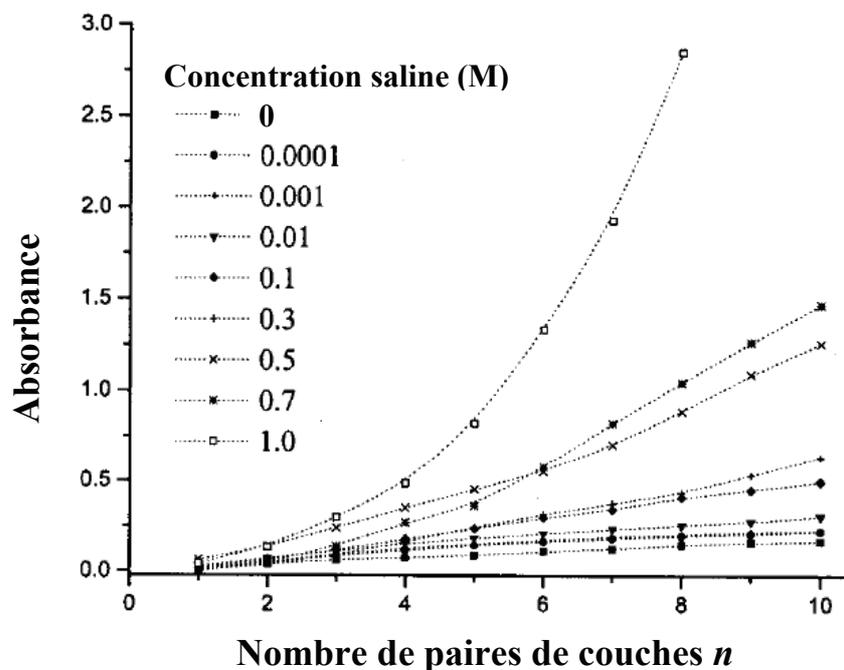


Figure 1.2.1 – 2 : Mesure en spectroscopie UV / visible de l'absorbance d'un film (PDADAMAC – PSS) $_n$, en fonction de la concentration molaire en NaCl [McAloney *et al.* 2001].

- **Influence de la variation de la température au cours de la construction**

Des travaux portant sur l'effet de la température des solutions de polyélectrolytes lors de la construction d'un film de multicouches ont mis en évidence une modification du mode de croissance [Salomäki *et al.* 2005]. Ces auteurs ont remarqué qu'une augmentation de la température rendait la croissance exponentielle, tandis qu'une diminution induisait une croissance linéaire d'un film (PAH – PAA) (figure 1.2.2 – 3). Les effets de la modification de température sont plus importants pour le système (PDADMAC – PSS) que pour le système (PAH – PSS).

Les auteurs expliquent ces résultats par la diffusion ou non des polyélectrolytes sur l'épaisseur totale du film. Ils considèrent que chaque film possède de manière inhérente une

croissance exponentielle, mais qu'il présente une croissance linéaire lorsque les chaînes de polyélectrolytes ne peuvent pas diffuser sur toute son épaisseur. L'augmentation de la température favorise la diffusion à travers tout le film des chaînes de polyélectrolytes, conduisant ainsi à une croissance exponentielle de l'épaisseur.

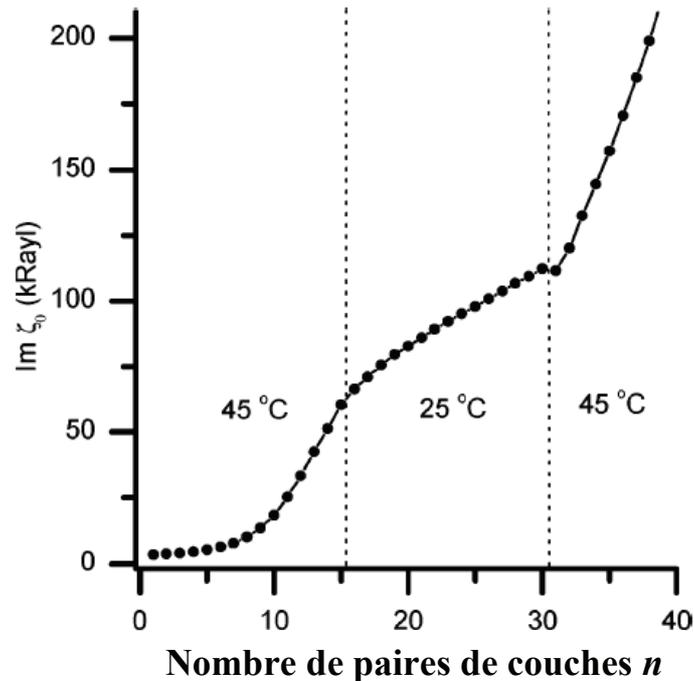


Figure 1.2.2 – 3 : Croissance d'un film (PDADMAC – PSS)_n suivie par microbalance à cristal de quartz en fonction de la température des solutions de polyélectrolytes. Le graphique représente l'évolution de la partie imaginaire de l'onde acoustique, représentative de l'incrément de masse de polyélectrolytes à chaque paire de couche déposée [Salomäki *et al.* 2005].

1.2.3 Polyélectrolytes utilisés

Différents types de polyélectrolytes sont disponibles et ont été utilisés pour construire des films multicouches. Des polyélectrolytes synthétiques comme le poly(styrène sulfonate) ou la poly(hydrochlorure d'allylamine) sont couramment utilisés car ils sont synthétisés à l'échelle industrielle. De nombreux polyélectrolytes biologiques et / ou biodégradables sont depuis peu utilisés pour le développement de surfaces biocompatibles, notamment dans le cas des films multicouches.

Ainsi, la poly(L-lysine) est couramment utilisée en biologie pour améliorer l'adhésion et la prolifération cellulaire. Elle offre aussi la possibilité d'être facilement conjuguée à des molécules bioactives comme des peptides ou de l'ADN [Mezo *et al.* 2000, Wagner *et al.*

1991, Wu and Wu 1987]. Des polyélectrolytes à base d'acides aminés sont aussi synthétisés pour leurs propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité. On utilise ainsi du poly(acide glutamique), du poly(acide aspartique) ou encore de la poly(ornithine) pour élaborer des films multicouches de polyélectrolytes.

Des polysaccharides naturels ou des protéines de la matrice extracellulaire comme le chitosane ou l'acide hyaluronique peuvent être intéressants [Richert *et al.* 2004b]. En particulier, l'acide hyaluronique prend part à de nombreux processus biologiques [Laurent 1998, Stuhlmeier 2006] qui rendent son utilisation pertinente dans le cadre des multicouches :

- il est notamment présent dans le liquide synovial (lubrification des articulations) et dans l'humeur vitreuse (présente dans la cavité oculaire) [Scott *et al.* 2000]. C'est pourquoi il est utilisé en chirurgie ophtalmologique ou pour des interventions chirurgicales sur les articulations [Lapcik *et al.* 1998].
- il s'agit d'un composé très hydrophile : il peut être lié à une grande quantité d'eau [Whitson *et al.* 1998]. Il participe ainsi au contrôle de l'hydratation des tissus et du transport de l'eau. L'acide hyaluronique est largement employé dans les formulations de cosmétiques [Laurent 1998].
- il possède la propriété de pouvoir être modifié chimiquement ou conjugué avec la poly(L-lysine) et être ainsi utilisé en tant que transporteur d'ADN [Asayama *et al.* 1998, Takei *et al.* 1999].
- il se comporte en tant que ligand pour des cellules de type chondrocyte (cellule de cartilage) à travers les récepteurs CD44 et RHAMM [Ishida *et al.* 1997, Lee and Spicer 2000].

1.2.4 Substrats employés

Les films multicouches peuvent être élaborés sur diverses topographies et natures de substrat. Dans la littérature, on rencontre par exemple des substrats sous forme de lame, de colloïdes [Caruso and Möhwald 1999, Caruso and Schuler 2000] ou même des structures à trois dimensions [Ghosh and Crooks 1999, Kotov *et al.* 2004]. La composition chimique de ces substrats peut être à base de verre, de silicium, de silicone [Hemmerlé *et al.* 2005, Mertz *et al.* 2007], d'or [Caruso *et al.* 1997a]. On trouve aussi des supports constitués de matériaux non chargés [Chen and McCarthy 1997].

1.3 Applications biomédicales et fonctionnalisation des films multicouches

1.3.1 Domaines d'applications des films multicouches

Depuis l'élaboration des premiers films multicouches [Decher 1997], de nombreuses applications ont été envisagées et développées dans divers domaines [Hammond 1999], grâce à l'utilisation de différents matériaux (polyélectrolytes synthétiques, particules colloïdales, argile). Le recouvrement de substrats par ces matériaux permet un contrôle des propriétés de surface. Dans la littérature, des travaux décrivent le recouvrement de surface par la méthode couche par couche afin de protéger les matériaux de la corrosion [Graul and Schlenoff 1999], de créer des surfaces anti-reflet [Hattori 2001], de détecter des substances chimiques [Lee *et al.* 2000, Yang *et al.* 1997] ou encore afin d'obtenir des propriétés de surface d'optique non linéaire [Balasubramanian *et al.* 1998, Heflin *et al.* 1999]. Des photodiodes ou des membranes de séparation ont également été fabriquées à partir de la technique couche par couche [Ferreira *et al.* 1995, Gao *et al.* 1997], [Chen *et al.* 2000, Stroeve *et al.* 1996]. Le développement de multicouches reproduisant les propriétés mécaniques de biomatériaux naturels comme les os ou la nacre est aussi un domaine d'intérêt [Tang *et al.* 2003]. On peut enfin mentionner le recouvrement de lentilles de contact [Decher and Schlenoff 2002] et une application industrielle, les Yasa-Sheets, commercialisés au Japon [Schaaf *et al.* 2005].

L'utilisation de biomolécules comme les protéines, les polyélectrolytes naturels ou encore l'ADN dans les systèmes multicouches a permis de développer de nombreux systèmes en vue d'applications biomédicales [Thierry *et al.* 2003]. Nous traitons dans les trois paragraphes suivants des différentes propriétés biologiques de films multicouches soulignées dans la littérature. Nous les avons regroupées en trois parties : les multicouches aux propriétés d'adhésion ou de non-adhésion cellulaire, l'élaboration de matrices biomimétiques, et la fonctionnalisation par insertion de biomolécules.

1.3.2 Propriétés de surfaces anti-adhésives

Le développement de surfaces résistantes à l'adhésion protéique ou cellulaire est un enjeu important pour l'élaboration de matériaux en contact avec le milieu sanguin (implants, biocapteurs). Le recouvrement de ces matériaux par différents films multicouches est un moyen de moduler l'adhésion cellulaire.

Des substrats composés de gélatine, de matrice extracellulaire de fibroblastes ou de fibres de collagène, ont été utilisés pour l'élaboration de multicouches à base de poly(L-lysine) – alginate [Elbert *et al.* 1999]. Alors que les fibroblastes adhèrent fortement aux substrats non traités, ils ne présentent plus aucune affinité pour ces surfaces, une fois la multicouche déposée.

Richert *et al.* ont étudié les forces d'adhésion entre des chondrosarcomes (cellules cancéreuses de cartilage) et des films poly(L-lysine) – poly(acide L-glutamique). Les forces d'adhésion étaient beaucoup plus grandes pour des films se terminant par une couche de poly(L-lysine) que pour une couche terminale de poly(acide L-glutamique). Les auteurs ont aussi démontré que l'accroissement du nombre de paires de couches diminuait la force d'adhésion entre le film et les cellules [Richert *et al.* 2002]. Des films conçus à base de deux polysaccharides naturels (chitosane et acide hyaluronique) diminuent jusqu'à 80% l'adhésion de bactéries par rapport à l'adhésion observée sur une lame de verre [Richert *et al.* 2004b].

L'élaboration de multicouches à base de poly(L-lysine) et de poly(acide L-glutamique) contenant des chaînes de poly(éthylène glycol) couplées aux chaînes de poly(acide L-glutamique) ont montré aussi une réduction très importante de l'adhésion de bactéries sur les surfaces [Boulmedais *et al.* 2004].

1.3.3 Surfaces biomimétiques

L'élaboration de matrices biomimétiques par la technique couche par couche est envisageable en utilisant des composants de la matrice extracellulaire. Des films multicouches à base de collagène et de poly(styrène sulfonate) ont été développés pour la première fois par Grant *et al.*. La biocompatibilité de ces films a été démontrée et ils ont permis la croissance de cellules déposées en surface [Grant *et al.* 2001].

Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, l'enjeu primordial est le maintien du phénotype des cellules cultivées. Celles-ci peuvent aisément changer de phénotype hors de leur milieu naturel. Un film multicouche basé sur des composants du milieu naturel pourrait permettre le maintien du phénotype des cellules. Zhang *et al.* ont travaillé sur la culture de chondrosarcomes au sommet de films multicouches basés sur le dépôt alterné d'acide hyaluronique (HA) et de collagène (Col), deux composants de la matrice extracellulaire [Zhang *et al.* 2005]. La culture de chondrosarcomes sur des films PEI – (HA – Col)₅ ou PEI – (HA – Col)₅ – HA a mis en évidence que ces cellules synthétisent leur propre matrice extracellulaire sur les films se terminant par une couche de collagène, alors qu'aucune production n'est observée sur des films se terminant par de l'acide hyaluronique. Les structures que l'on peut observer dans la matrice extracellulaire synthétisée par la cellule sont notamment des fibres de type collagène. En effet, les images de microscopie à force atomique de ces fibres de la matrice extracellulaire montrent une structure périodique dont le motif répétitif a une longueur de 60 nanomètres (figure 1.3.3 – 1). Cette périodicité est caractéristique des fibres de collagène de type I et de type II. Néanmoins, le type précis de collagène n'a pas pu être identifié. Seul le collagène de type II est représentatif du phénotype du cartilage, tandis que le collagène de type I est en général synthétisé par des cellules telles que les fibroblastes.

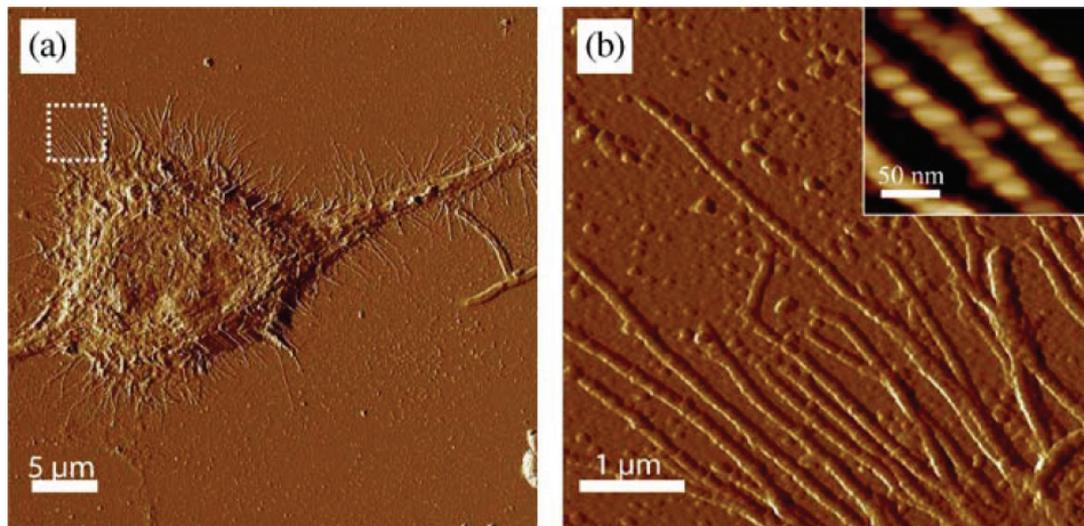


Figure 1.3.3 – 1 : Images de déflexion en microscopie à force atomique de cellules HCS-2/8 cultivées à la surface d'un film PEI – (HA – COL)₅. (a) Image de la cellule complète. (b) Agrandissement d'une zone de la matrice extracellulaire (zone encadrée par le carré blanc sur l'image (a)). Une structure périodique représentative de fibres de collagène est observée [Zhang *et al.* 2005].

1.3.4 Fonctionnalisation par insertion de biomolécules

On définit la fonctionnalisation d'un matériau par le fait de conférer à celui-ci une ou plusieurs propriétés spécifiques (anti-inflammatoire, anti-bactérienne, anti-adhésive ou adhésive, etc.). Il existe plusieurs moyens de fonctionnaliser un film multicouche : il est possible par exemple d'insérer des biomolécules comme des protéines ou des peptides, des médicaments, de l'ADN.

- **Insertion de protéines**

Les protéines peuvent être insérées au cours de la construction d'un film multicouche par le dépôt d'une à plusieurs couches après leur adsorption. Il n'est pas nécessaire pour cela de les coupler avec un polyélectrolyte. Il a été montré que, dans les films, les protéines conservaient une structure proche de leur structure native, leur permettant de maintenir leur activité biologique [Schwinté *et al.* 2001].

L'insertion d'une couche de protéines dans les films multicouches a été réalisée dès les premiers travaux sur les multicouches [Decher *et al.* 1994, Lvov *et al.* 1995]. Des anticorps anti-IgG ont été immobilisés au sein de multicouches composées de poly(hydrochlorure d'allylamine) et de poly(styrène sulfonate) et la reconnaissance spécifiques de ces protéines par des IgG a été étudiée par microbalance à cristal de quartz [Caruso *et al.* 1997b]. L'application de ces films en tant qu'immunodétecteurs, qui nécessitent le maintien de l'activité immunologique de l'anti-IgG, a été confirmée par le dépôt ultérieur d'IgG. La sensibilité de ces films en tant qu'immunodétecteur d'immunoglobuline G peut-être améliorée en augmentant le nombre de couches d'anti-IgG dans le film ou en augmentant le taux de sel, ce qui permet d'accroître la quantité d'anti-IgG adsorbée à chaque dépôt et donc la sensibilité de la détection ultérieure.

Un exemple de films multicouches sur lequel une couche d'albumine est déposée a été présenté par Ladam *et al.* Ces auteurs ont analysé les interactions entre la protéine albumine et un film multicouche (PAH – PSS) par réflectométrie à balayage angulaire. Ils ont trouvé que l'albumine s'adsorbait sur ces films quelle que soit la couche terminale (PSS ou PAH). Ce phénomène est lié à la structure de la protéine [Ladam *et al.* 2000a]. Néanmoins, les quantités d'albumine adsorbées sont différentes en fonction de la couche terminale : sur PSS, le dépôt d'albumine prend la forme d'une monocouche, tandis que sur PAH, le dépôt forme une

couche d'albumine dont l'épaisseur peut atteindre jusqu'à quatre fois la plus grande dimension de la protéine en solution.

Les multicouches peuvent être fonctionnalisées par d'autres protéines comme la protéine A. Celle-ci a été enfouie dans une multicouche composée d'énantiomères de poly(acide glutamique) et d'énantiomères de polylysine (formes L et D). Il a été montré que la variation de la profondeur d'enfouissement de la protéine A et la variation de la proportion des énantiomères permettaient une modulation des délais et des intensités d'internalisation de la protéine A par les cellules mises en culture sur le film. [Benkirane-Jessel *et al.* 2005].

- **Insertion de peptides**

La réponse inflammatoire des tissus est un des facteurs principaux limitant le recours aux prothèses. Ceux-ci peuvent être rejetés par le corps humain avec des effets secondaires très sévères (forte fièvre, choc septique). Le processus inflammatoire est généralement gouverné par l'interaction entre les tissus et la surface de l'implant. Le contrôle de la nature de cette surface peut donc permettre de maîtriser la réponse des tissus environnants. Une solution pour y parvenir est donc le recouvrement de la surface par des films multicouches contenant des agents anti-inflammatoires comme l' α -MSH (alpha-melanocyte stimulating hormone) [Getting 2002].

Les travaux de Chluba *et al.* ont montré que le couplage d'un dérivé de ce peptide à la poly(L-lysine) et son enfouissement dans un film (PLL – PGA) permettaient le maintien de son activité biologique jusqu'à des temps longs (un mois). Aux temps courts, l'activité biologique a pu être modulée par un enfouissement plus ou moins profond au sein de la multicouche [Chluba *et al.* 2001]. Des monocytes cultivés en surface d'un film (PLL – PGA) dans lequel l' α -MSH avait été insérée voyaient diminuer fortement leur activité inflammatoire [Benkirane-Jessel *et al.* 2004]. La fonctionnalisation de ces films par l' α -MSH a été appliquée au recouvrement des surfaces de prothèses trachéales en titane poreux [Schultz *et al.* 2005]. L'activité anti-inflammatoire de ce recouvrement a été démontrée *in vivo* chez le rat en dosant la production de cytokines anti-inflammatoires. Ce type de recouvrement bioactif laisse donc entrevoir des applications cliniques dans le futur.

- **Insertion d'autres types de biomolécules**

Il a été montré qu'il est possible de construire un film par le dépôt alterné d'ADN et d'un polycation (poly(hydrochlorure d'allylamine) ou poly(L-lysine)) [Lvov *et al.* 1993b, Sukhorukov *et al.* 1996]. La libération contrôlée de chaînes d'ADN contenues dans des films multicouches a été étudiée. Ce type de films peut être directement utilisé pour la transfection [Jessel *et al.* 2006, Jewell *et al.* 2005]. L'enfouissement de virus dans des multicouches est un autre moyen pour libérer de façon contrôlée des vecteurs [Dimitrova *et al.* 2007, Lvov *et al.* 1994].

D'autres types de biomolécules comme des médicaments ont pu être insérés dans les films multicouches [Thierry *et al.* 2005, Vodouhê *et al.* 2006].

1.4 Films à compartiments

Des couches de polyélectrolytes dites « barrières » peuvent être déposées au cours de la construction d'un film multicouche. Cette barrière peut être constituée de différents matériaux (argile, polyélectrolytes). La nature de la barrière permet de limiter ou d'empêcher la diffusion d'une molécule donnée dans la multicouche inférieure et / ou supérieure. L'insertion d'une ou plusieurs barrières au cours de la construction d'un film multicouche permet ainsi d'élaborer des films multicompartiments, chaque compartiment pouvant contenir une molécule de nature différente. Ce type d'architecture ouvre des possibilités pour la libération contrôlée de molécules en utilisant, dans le cadre d'applications biomédicales, des barrières dégradables par les cellules. Nous présentons dans les paragraphes suivants différents travaux traitant de films contenant une barrière.

Le premier exemple de films à barrière décrivait des systèmes contenant une couche de montmorillonite (argile). Des films à base de calcium et de poly(hydrochlorure d'allylamine) sur lesquels une couche de montmorillonite a été déposée ont notamment été développés. La couche d'argile agit comme barrière en limitant la pénétration d'ion Ca^{2+} dans le film [Struth *et al.* 2001].

Le dépôt d'une barrière à base de montmorillonite au cours de la construction d'un film de polymère semi-conducteur (formant ainsi des systèmes de diode électroluminescente) a présenté une augmentation du rendement des diodes électroluminescentes [Eckle and Decher 2001].

Un autre exemple de barrière a été présenté par Glinel *et al.* Le dépôt de particules de cire au sommet d'un film $(\text{PAH} - \text{PSS})_n - \text{PAH}$, après passage à 60°C , forme une couche complètement hydrophobe empêchant totalement la diffusion de molécules d'eau à l'intérieur du film (figure 1.4 – 1). Ce type de système se révèle être intéressant pour limiter la pénétration d'ions, d'eau ou de médicaments et peptides hydrophiles.

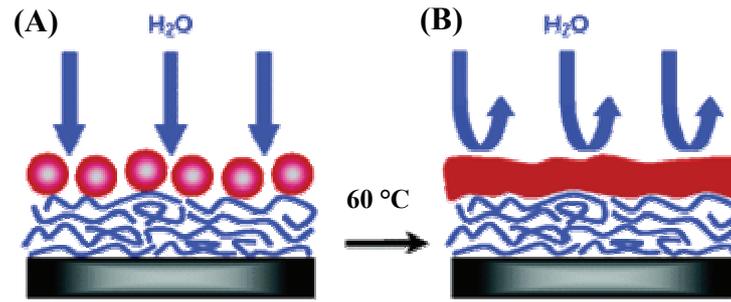


Figure 1.4 – 1 : (A) Représentation schématique d'un film (PAH – PSS) – PAH sur lequel des particules de cire représentées en rouge ont été déposées. (B) Après passage à 60°C les particules forment une couche imperméable aux molécules d'eau [Glinel *et al.* 2004].

Au laboratoire, plusieurs études ont été réalisées sur les films à compartiments. Le premier de ces travaux discutait des films constitués de deux types de strates, l'une à base d'un film à croissance exponentielle (PLL – HA), l'autre à base d'un film à croissance linéaire (PAH – PSS). Ce dernier se comporte comme barrière à la diffusion de chaînes de polyélectrolytes libres [Garza *et al.* 2004].

Les auteurs ont construit un film basé sur trois compartiments (PLL – HA)₃₀ superposés et séparés par deux barrières (PAH – PSS)₃₀. La construction est donc : (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} – HA – (PAH – PSS)₃₀ – (PLL – HA)₃₀ – (PAH – PSS)₃₀ – (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC}. Les réservoirs inférieur et supérieur ont été marqués par des chaînes PLL^{FITC}. L'observation en microscopie confocale a révélé une bande non fluorescente au niveau du réservoir intermédiaire initialement non marqué (figure 1.4 – 2). Le rôle de barrière des multicouches (PAH – PSS) a ainsi été mis en évidence par l'inhibition de la diffusion des chaînes de PLL^{FITC} d'un réservoir à l'autre.

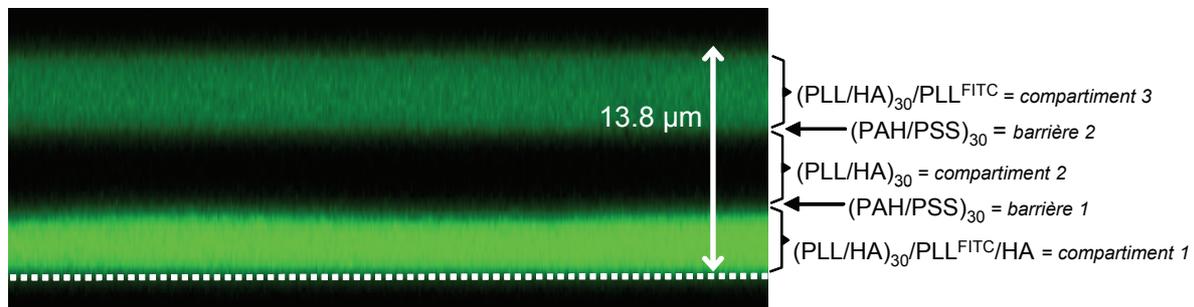


Figure 1.4 – 2 : Observation en microscopie confocale de la section en z d'un film (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} – HA – (PAH – PSS)₃₀ – (PLL – HA)₃₀ – (PAH – PSS)₃₀ – (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC}. La fluorescence verte est émise par les chaînes de PLL^{FITC}. Le trait pointillé blanc correspond à la position de la lamelle de verre [Garza *et al.* 2004].

Cependant il a été démontré ultérieurement que les barrières (PAH – PSS) n’étaient pas dégradables par des phagocytes. Les molécules contenues dans les films réservoirs n’étaient ainsi pas accessibles pour les cellules. Il a été alors proposé un autre système où la multicouche (PLL – HA) utilisée en tant que réservoir était déposée alternativement avec une couche de polymère biocompatible, le copolymère d'acide lactique et glycolique (poly(lactico-glycolic) acid, PLGA) utilisé alors pour former la barrière [Garza *et al.* 2005]. L'ensemble du film se comporte comme un système réservoir / barrière prévenant la diffusion de molécules libres comme la PLL d’un réservoir à l’autre (figure 1.4 – 3). Ces auteurs ont mis en évidence que des cellules de moelle osseuse dégradait la barrière de PLGA en quelques jours et peuvent ainsi avoir accès aux molécules sous-jacentes contenues dans les réservoirs, dans ce cas des molécules de poly(L-lysine).

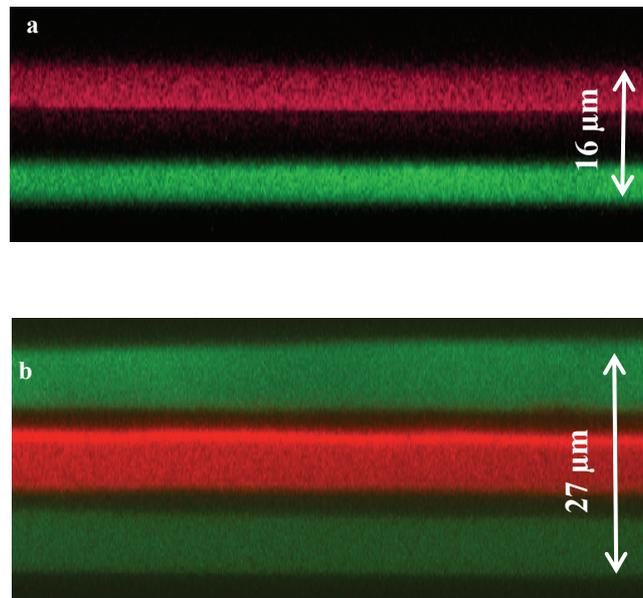


Figure 1.4 – 3 : Observation en microscopie confocale de la section en z d'un film **(a)** (PLL –HA)₃₀ – PLL^{FITC} – PLGA – (PLL – HA)₃₀ – PLL^{Rho} **(b)** (PLL –HA)₃₀ – PLL^{FITC} – PLGA – (PLL – HA)₃₀ – PLL^{Rho} – PLGA – (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC}. La fluorescence rouge est émise par les chaînes de PLL^{Rho} et la fluorescence verte est émise par les chaînes de PLL^{FITC} [Garza *et al.* 2005].

Dans le précédent exemple, l’importance de la dégradation de la barrière pour permettre l’interaction entre cellules et biomolécules a été mise en évidence. Une solution pour permettre la libération contrôlée de biomolécules a été présentée par Wood *et al.* Ces auteurs ont décrit la construction de multicouches à base d’un poly(α amino-acide) dégradable et de diverses biomolécules (héparine, sulfate de chondroïtine). Ils ont démontré que la cinétique de

déconstruction du film peut être modifiée en ajustant la valeur du pH de la solution environnante (figure 1.4 – 4).

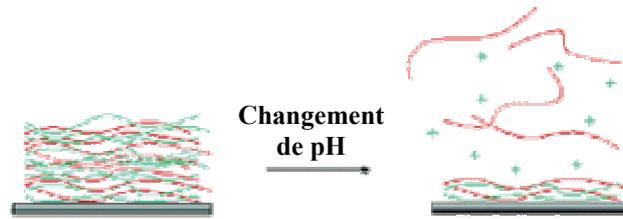


Figure 1.4 – 4 : Représentation schématique de la déconstruction d'un film par changement de pH de 5.1 à 7.4 [Wood *et al.* 2005].

Bibliographie

- S. Asayama, M. Nogawa, Y. Takei, T. Akaike, and A. Maruyama. **1998**. Synthesis of novel polyampholyte comb-type copolymers consisting of a poly(L-lysine) backbone and hyaluronic acid side chains for a DNA carrier. *Bioconjug. Chem.* 9:476-481.
- S. Balasubramanian, X. G. Wang, H. C. Wang, K. Yang, J. Kumar, S. K. Tripathy, and L. Li. **1998**. Azochromophore-functionalized polyelectrolytes. 2. Acentric self-assembly through a layer-by-layer deposition process. *Chem. Mater.* 10:1554-1560.
- N. Benkirane-Jessel, P. Lavalle, E. Hubsch, V. Holl, B. Senger, Y. Haikel, J.-C. Voegel, J. Ogier, and P. Schaaf. **2005**. Short-time timing of the biological activity of functionalized polyelectrolyte multilayers. *Adv. Funct. Mater.* 15:648-654.
- N. Benkirane-Jessel, P. Lavalle, F. Meyer, F. Audouin, B. Frisch, P. Schaaf, J. Ogier, G. Decher, and J.-C. Voegel. **2004**. Control of monocyte morphology on and response to model surfaces for implants equipped with anti-inflammatory agents. *Adv. Mater.* 16:1507-1511.
- K. B. Blodgett, and I. Langmuir. **1937**. Buildup films of Barium stearate and their optical properties. *Phys. Rev* 51:964-982.
- F. Boulmedais, B. Frisch, O. Etienne, P. Lavalle, C. Picart, J. Ogier, J.-C. Voegel, P. Schaaf, and C. Egles. **2004**. Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of anti-microbial protection for biomaterials. *Biomaterials* 25:2003-2011.
- G. Cao, H. Hong, and T. Mallouk. **1992**. Layered metal phosphates and phosphonates: from crystals to monolayers. *Acc. Chem. Res.* 25:420-427.
- F. Caruso, H. Lichtenfeld, E. Donath, and H. Möhwald. **1999**. Investigation of electrostatic interactions in polyelectrolyte multilayer films: Binding of anionic fluorescent probes to layers assembled onto colloids. *Macromolecules* 32:2317-2328.
- F. Caruso, and H. Möhwald. **1999**. Preparation and characterization of ordered nanoparticle and polymer composite multilayers on colloids. *Langmuir* 15:8276-8281.

- F. Caruso, K. Niikura, D. N. Furlong, and Y. Okahata. **1997a**. 1. Ultrathin Multilayer Polyelectrolyte Films on Gold: Construction and Thickness Determination. *Langmuir* 13:3422-3426.
- F. Caruso, K. Niikura, D. N. Furlong, and Y. Okahata. **1997b**. 2. Assembly of Alternating Polyelectrolyte and Protein Multilayer Films for Immunosensing. *Langmuir* 13:3427-3433.
- F. Caruso, and C. Schuler. **2000**. Enzyme multilayers on colloid particles: Assembly, stability, and enzymatic activity. *Langmuir* 16:9595-9603.
- T. Cassier, K. Lowack, and G. Decher. **1998**. Layer-by-layer assembled protein/polymer hybrid films : nanoconstruction via specific recognition. *Supramol. Sci.* 5:309-315.
- T. Chen, K. A. Friedman, I. Lei, and A. Heller. **2000**. In situ assembled mass-transport controlling micromembranes and their application in implanted amperometric glucose sensors. *Anal. Chem.* 72:3757-3763.
- W. Chen, and T. J. McCarthy. **1997**. Layer-by-layer deposition: A tool for polymer surface modification. *Macromolecules* 30:78-86.
- J. Chluba, J.-C. Voegel, G. Decher, P. Erbacher, P. Schaaf, and J. Ogier. **2001**. Peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity. *Biomacromolecules* 2:800-805.
- G. Decher. **1997**. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* 277:1232-1237.
- G. Decher, J. D. Hong, and J. Schmitt. **1992**. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charges surface. *Thin Solid Films* 210:831-835.
- G. Decher, B. Lehr, K. Lowack, Y. Lvov, and J. Schmitt. **1994**. New nanocomposite films for biosensors: layer-by-layer adsorbed films of polyelectrolytes, proteins or DNA. *Biosens. Bioelectron.* 9:677-684.

- G. Decher, and J. B. Schlenoff. **2002**. Multilayer Thin Films. Wiley-VCH.
- G. Decher, and J. Schmitt. **1992**. Fine-tuning of the film thickness of ultrathin multilayer films composed of consecutively alternating layers of anionic and cationic polyelectrolytes. *Prog. Colloid Polym. Sci.* 89:160-164.
- M. Dimitrova, Y. Arntz, P. Lavalle, F. Meyer, M. Wolf, C. Schuster, Y. Haikel, J.-C. Voegel, and J. Ogier. **2007**. Adenoviral gene delivery from multilayered polyelectrolyte architectures. *Adv. Funct. Mater.* 17:233-245.
- M. Eckle, and G. Decher. **2001**. Tuning the Performance of Layer-by-Layer Assembled OLEDs by Controlling the Position of Isolating Clay Barrier Sheets. *Nanoletters* 1:45–49.
- D. L. Elbert, C. B. Herbert, and J. A. Hubbell. **1999**. Thin polymer layers formed by polyelectrolyte multilayer techniques on biological surfaces. *Langmuir* 15:5355-5362.
- M. S. Ferreira, M. F. Rubner, and B. R. Hsieh. **1995**. Luminescence behavior of self-assembled multilayer heterostructures of poly(phenyl-ene-vinylene). *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 328:119-124.
- P. Fromherz. **1980**. In : Electron Microscopy at Molecular Dimensions, Ed: W. Baumeister et W. Vogell, Berlin: Springer-Verlag. 338.
- M. Y. Gao, B. Richter, and S. Kirstein. **1997**. White-light electroluminescence from a self-assembled Q-CdSe/PPV multilayer structures. *Adv. Mater.* 9:802-805.
- J. M. Garza, N. Jessel, G. Ladam, V. Dupray, S. Muller, J.-F. Stoltz, P. Schaaf, J.-C. Voegel, and P. Lavalle. **2005**. Polyelectrolyte multilayers and degradable polymer layers as multicompartment films. *Langmuir* 21:12372-12377.
- J. M. Garza, P. Schaaf, S. Muller, V. Ball, J.-F. Stoltz, J.-C. Voegel, and P. Lavalle. **2004**. Multicompartment films made of alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth. *Langmuir* 20:7298-7302.

- S. J. Getting. **2002**. Melanocortin peptides and their receptors: new targets for anti-inflammatory therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 23:447-449.
- P. Ghosh, and R. M. Crooks. **1999**. Covalent grafting of a patterned, hyperbranched polymer onto a plastic substrate using microcontact printing. *J. Am. Chem. Soc.* 121:8395-8396.
- K. Glinel, M. Prevot, R. Krustev, G. B. Sukhorukov, A. M. Jonas, and H. Möhwald. **2004**. Control of the water permeability of polyelectrolyte multilayers by deposition of charged paraffin particles. *Langmuir* 20:4898-4902.
- C.-G. Gölander, H. Arwin, J. C. Ericksson, L. Lundstrom, and R. Larsson. **1982**. Heparin surface lm formation through adsorption of colloidal particles studied by ellipsometry and scanning electron microscopy. *Coll. Surf.* 5:1-16.
- G. G. S. Grant, D. S. Koktysh, B. Yun, R. L. Matts, and N. A. Kotov. **2001**. Layerby-layer assembly of collagen thin films: controlled thickness and biocompatibility. *Biomed Microdevices* 3:301–306.
- T. W. Graul, and J. B. Schlenoff. **1999**. Capillaries modified by polyelectrolyte multilayers for electrophoretic separations. *Anal. Chem.* 71:4007-4013.
- P. T. Hammond. **1999**. Recent explorations in electrostatic multilayer thin film assembly. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 4:430-442.
- H. Hattori. **2001**. Anti-reflection surface with particle coating deposited by electrostatic attraction. *Adv. Mater.* 13:51-54.
- J. R. Heflin, C. Figura, D. Marciu, Y. Liu, and R. O. Claus. **1999**. Thickness dependence of second-harmonic generation in thin films fabricated from ionically self-assembled monolayers. *Appl. Phys. Lett.* 74:495-497.
- J. Hemmerlé, V. Roucoules, G. Fleith, M. Nardin, V. Ball, P. Lavalle, P. Marie, J.-C. Voegel, and P. Schaaf. **2005**. Mechanically responsive films of variable hydrophobicity made of polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 21:10328-10331.

- E. Hübsch, V. Ball, B. Senger, G. Decher, J.-C. Voegel, and P. Schaaf. **2004**. Controlling the growth regime of polyelectrolyte multilayer films: Changing from exponential to linear growth by adjusting the composition of polyelectrolyte mixtures. *Langmuir* 20:1980-1985.
- R. Iler. **1966**. Multilayers of colloidal particles. *J. Colloid Interface Sci.* 21:569-594.
- O. Ishida, Y. Tanaka, I. Morimoto, M. Takigawa, and S. Eto. **1997**. Chondrocytes are regulated by cellular adhesion through CD44 and hyaluronic acid pathway. *J. Bone Miner. Res.* 12:1657-1663.
- N. Jessel, M. Oulad-Abdeighani, F. Meyer, P. Lavalley, Y. Haikel, P. Schaaf, and J.-C. Voegel. **2006**. Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by beta-cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:8618-8621.
- C. M. Jewell, J. Zhang, N. J. Fredin, and D. M. Lynn. **2005**. Multilayered polyelectrolyte films promote the direct and localized delivery of DNA to cells. *J. Controlled Release* 106:214-223.
- J. F. Joanny. **1999**. Polyelectrolyte adsorption and charge inversion. *Eur. Phys. J. B.* 9:117-122.
- L. Kolarik, D. N. Furlong, H. Joy, C. Struijk, and R. Rowe. **1999**. Building assemblies from high molecular weight polyelectrolytes. *Langmuir* 15:8265-8275.
- N. A. Kotov, Y. F. Liu, S. P. Wang, C. Cumming, M. Eghtedari, G. Vargas, M. Motamedi, J. Nichols, and J. Cortiella. **2004**. Inverted colloidal crystals as three-dimensional cell scaffolds. *Langmuir* 20:7887-7892.
- G. Ladam, C. Gergely, B. Senger, G. Decher, J.-C. Voegel, P. Schaaf, and F. J. Cuisinier. **2000a**. Protein interactions with polyelectrolyte multilayers: interactions between human serum albumin and polystyrene sulfonate/polyallylamine multilayers. *Biomacromolecules* 1:674-687.

- G. Ladam, P. Schaad, J.-C. Voegel, P. Schaaf, G. Decher, and F. Cuisinier. **2000b**. In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 16:1249-1255.
- L. J. a. L. Lapcik, L. Lapcik, S. De Smedt, J. Demeester, and P. Chabreck. **1998**. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chem. Rev.* 98:2663-2684.
- T. C. Laurent. **1998**. The chemistry, biology, and medical applications of hyaluronan and its derivatives. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- P. Lavalle, C. Gergely, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, J.-C. Voegel, and C. Picart. **2002**. Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: An in situ atomic force microscopy study. *Macromolecules* 35:4458-4465.
- P. Lavalle, C. Picart, J. Mutterer, C. Gergely, H. Reiss, J.-C. Voegel, B. Senger, and P. Schaaf. **2004**. Modeling the buildup of polyelectrolyte multilayer films having exponential growth. *J. Phys. Chem. B* 108:635-648.
- J. Y. Lee, and A. P. Spicer. **2000**. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:581-586.
- S. H. Lee, J. Kumar, and S. K. Tripathy. **2000**. Thin film optical sensors employing polyelectrolyte assembly. *Langmuir* 16:10482-10489.
- Y. Lvov, G. Decher, and H. Mohwald. **1993a**. Assembly, Structural Characterization, and Thermal Behavior of Layer-by-Layer Deposited Ultrathin Films of Poly(vinyl sulfate) and Poly(allylamine). *Langmuir* 9:481-486
- Y. Lvov, G. Decher, and G. Sukhorukov. **1993b**. Assembly of Thin Films by Means of Successive Deposition of Alternate Layers of DNA and Poly(allylamine). *Macromolecules* 26:5396-5399.

- Y. Lvov, H. Haas, G. Decher, and H. Mohwald. **1994**. Successive Deposition of Alternate Layers of Polyelectrolytes and a Charged Virus. *Langmuir* 10:4232-4236.
- Y. Lvov, A. Katsuhiko, I. Ichinose, and T. Kunitake. **1995**. Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption. *J. Am. Chem. Soc* 117:6117-6123.
- R. A. McAloney, M. Sinyor, V. Dudnik, and M. C. Goh. **2001**. Atomic force microscopy studies of salt effects on polyelectrolyte multilayer film morphology. *Langmuir* 17:6655-6663.
- D. Mertz, J. Hemmerlé, J. Mutterer, S. Ollivier, J.-C. Voegel, P. Schaaf, and P. Lavalle. **2007**. Mechanically responding nanovalves based on polyelectrolyte multilayers. *Nano Letters* 7:657-662.
- G. Mezo, J. Remenyi, J. Kajtar, K. Barna, D. Gaal, and F. Hudecz. **2000**. Synthesis and conformational studies of poly(L-lysine) based branched polypeptides with Ser and Glu/Leu in the side chains. *J Control Release* 63:81-95.
- R. R. Netz, and J. F. Joanny. **1999**. Adsorption of semiflexible polyelectrolytes on charged planar surfaces: charge compensation, charge reversal, and multilayer formation. *Macromolecules* 32:9013-9025.
- L. Netzer, and J. Sagiv. **1983**. A new approach to construction of artificial monolayer assemblies. *J. Am. Chem. Soc.* 105:674-676.
- C. Picart, C. Gergely, Y. Arntz, J.-C. Voegel, P. Schaaf, F. J. G. Cuisinier, and B. Senger. **2004**. Measurement of film thickness up to several hundreds of nanometers using optical waveguide lightmode spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* 20:553-561.
- C. Picart, P. Lavalle, P. Hubert, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, and J.-C. Voegel. **2001**. Buildup mechanism for poly(L-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface. *Langmuir* 17:7414-7424.

- C. Picart, J. Mutterer, L. Richert, Y. Luo, G. D. Prestwich, P. Schaaf, J.-C. Voegel, and P. Lavalle. **2002**. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:12531-12535.
- C. Porcel, P. Lavalle, V. Ball, G. Decher, B. Senger, J.-C. Voegel, and P. Schaaf. **2006**. From exponential to linear growth in polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 22:4376-4383.
- C. Porcel, P. Lavalle, G. Decher, B. Senger, J.-C. Voegel, and P. Schaaf. **2007**. Influence of the polyelectrolyte molecular weight on exponentially growing multilayer films in the linear regime. *Langmuir* 23:1898-1904.
- J. J. Ramsden, Y. M. Lvov, and G. Decher. **1995**. Determination of optical constants of molecular films assembled via alternate polyion adsorption. *Thin Solid Films* 254:246-251.
- L. Richert, P. Lavalle, E. Payan, X. Z. Shu, G. D. Prestwich, J.-F. Stoltz, P. Schaaf, J.-C. Voegel, and C. Picart. **2004**. Layer by layer buildup of polysaccharide films: Physical chemistry and cellular adhesion aspects. *Langmuir* 20:448-458.
- L. Richert, P. Lavalle, D. Vautier, B. Senger, J.-F. Stoltz, P. Schaaf, J.-C. Voegel, and C. Picart. **2002**. Cell interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomacromolecules* 3:1170-1178.
- M. Salomäki, I. A. Vinokurov, and J. Kankare. **2005**. Effect of temperature on the buildup of polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 21:11232-11240.
- P. Schaaf, G. Decher, and J.-C. Voegel. **2005**. Des milles feuilles moléculaires à tout faire. *La Recherche* N° 389:56-58.
- J. B. Schlenoff, S. T. Dubas, and T. Farhat. **2000**. Sprayed Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir* 16:9968 - 9969.
- J. Schmitt, T. Grünwald, G. Decher, P. Perahan, K. Kjaer, and M. Lösche. **1993**. Internal Structure of Layer-by-Layer Adsorbed Polyelectrolyte Films: A Neutron and X-ray Reflectivity Study. *Macromolecules* 26:7058-7063.

- P. Schultz, D. Vautier, L. Richert, N. Jessel, Y. Haikel, P. Schaaf, J.-C. Voegel, J. Ogier, and C. Debry. **2005**. Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide, alpha-MSH, for coating a tracheal prosthesis. *Biomaterials* 26:2621-2630.
- P. Schwinté, J.-C. Voegel, C. Picart, Y. Haikel, P. Schaaf, and B. Szalontai. **2001**. Stabilizing effects of various polyelectrolyte multilayer films on the structure of adsorbed/embedded fibrinogen molecules: An ATR-FTIR study. *J. Phys. Chem. B* 105:11906-11916.
- D. Scott, P. J. Coleman, R. M. Mason, and J. R. Levick. **2000**. Concentration dependence of interstitial flow buffering by hyaluronan in synovial joints. *Microvasc. Res.* 59:345-353.
- S. S. Shiratori, and M. F. Rubner. **2000**. pH-dependent thickness behavior of sequentially adsorbed layers of weak polyelectrolytes. *Macromolecules* 33:4213-4219.
- P. Stroeve, V. Vasquez, M. A. N. Coelho, and J. F. Rabolt. **1996**. Gas transfer in supported films made by molecular self-assembly of ionic polymers. *Thin Solid Films* 284 - 285:708 - 712.
- B. Struth, M. Eckle, G. Decher, R. Oeser, P. Simon, D. W. Schubert, and J. Schmitt. **2001**. Hindered Ion Diffusion in Polyelectrolyte/Montmorillonite Multilayers: Toward Compartmentalized Films. *Eur. Phys. J. E.* 6:351–358.
- K. M. Stuhlmeier. **2006**. Aspects of the biology of hyaluronan, a largely neglected but extremely versatile molecule. *Wien. Med. Wochenschr.* 156:563-568.
- G. B. Sukhorukov, H. Mijhwal, G. Decher, and Y. M. Lvov. **1996**. Assembly of polyelectrolyte multilayer films by consecutively alternating adsorption of polynucleotides and polycations. *Thin Solid Films* 284-285:220-223.
- Y. Takei, A. Maruyama, S. Kawano, Y. Nishimura, S. Asayama, M. Nogawa, K. Ikejima, M. Hori, T. Akaike, J. J. Lemasters, S. Watanabe, and N. Sato. **1999**. Targeted gene

- transfer to sinusoidal endothelial cells and expression in vivo. *Transplant. Proc.* 31:790-791.
- Z. Tang, N. A. Kotov, S. Magonov, and B. Ozturk. **2003**. Nanostructured artificial nacre. *Nat. mater.* 2:413-418.
- B. Thierry, P. Kujawa, C. Tkaczyk, F. M. Winnik, L. Bilodeau, and M. Tabrizian. **2005**. Delivery platform for hydrophobic drugs: prodrug approach combined with self-assembled multilayers. *J. Am. Chem. Soc.* 127:1626-1627.
- B. Thierry, F. M. Winnik, Y. Merhi, and M. Tabrizian. **2003**. Nanocoatings onto arteries via layer-by-layer deposition: toward the in vivo repair of damaged blood vessels. *J. Am. Chem. Soc.* 125:7494-7495.
- C. Vodouhê, E. Le Guen, J. M. Garza, G. Francius, C. Dejumat, J. Ogier, P. Schaaf, J.-C. Voegel, and P. Lavalle. **2006**. Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* 27:4149-4156.
- E. Wagner, M. Cotten, R. Foisner, and M. L. Birnstiel. **1991**. Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:4255-4259.
- K. B. Whitson, A. M. Lukan, R. L. Marlowe, S. A. Lee, L. Anthony, and A. Rupprecht. **1998**. Binding of the water of primary hydration to the sodium and cesium salts of deoxyribonucleic acid and potassium hyaluronate. *Phys. Rev. E* 58:2370-2377.
- K. C. Wood, J. Q. Boedicker, D. M. Lynn, and P. T. Hammond. **2005**. Tunable Drug Release from Hydrolytically Degradable Layer-by-Layer Thin Films. *Langmuir* 21:1603-1609.
- G. Y. Wu, and C. H. Wu. **1987**. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432.
- X. Yang, S. Johnson, J. Shi, T. Holesinger, and B. Swanson. **1997**. Polyelectrolyte and molecular host ion self-assembly to multilayer thin films: An approach to thin film chemical sensors. *Sens. Actuators, B* 45:87-92.

D. Yoo, S. S. Shiratori, and M. F. Rubner. **1998**. Controlling bilayer composition and surface wettability of sequentially adsorbed multilayers of weak polyelectrolytes. *Macromolecules* 31:4309-4318.

J. Zhang, B. Senger, D. Vautier, C. Picart, P. Schaaf, J.-C. Voegel, and P. Lavallo. **2005**. Natural polyelectrolyte films based on layer-by layer deposition of collagen and hyaluronic acid. *Biomaterials* 26:3353-3361.

Chapitre 2 Matériels et méthodes

2.1 Construction des échantillons	61
2.1.1 <i>Les produits utilisés</i>	61
2.1.2 <i>Préparation des films multicouches</i>	62
2.2 Microscopie confocale	63
2.2.1 <i>Principe général de la microscopie confocale</i>	63
2.2.2 <i>Fluorescence</i>	65
2.2.3 <i>Dispositif expérimental</i>	67
2.2.4 <i>Mesure et analyse des intensités de fluorescence</i>	69
2.3 Mesure de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment	72
2.3.1 <i>Photoblanchiment à partir de motifs périodiques</i>	73
2.3.2 <i>Photoblanchiment d'une zone unique</i>	80
2.4 Microbalance à cristal de quartz	85
2.4.1 <i>Principe de mesure de la microbalance à cristal de quartz</i>	85
2.4.2 <i>Dispositif expérimental</i>	88
Bibliographie	89

Dans ce chapitre, nous présentons les différentes techniques que nous avons utilisées lors de nos expériences. Pour commencer, nous décrivons la méthode pour concevoir nos échantillons, les films multicouches de polyélectrolytes. L'épaisseur de ces films peut atteindre plusieurs micromètres d'épaisseur. L'observation en microscopie confocale de leur section a donc été possible par l'utilisation de molécules fluorescentes, en particulier lorsque des groupements fluorophores sont greffés aux chaînes des polyélectrolytes utilisés. Nous discutons dans le second paragraphe de la technique de microscopie confocale et des méthodes utilisées pour analyser les images réalisées à partir de cette technique.

Dans le cas d'échantillons fluorescents, nous avons réalisé des expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) pour suivre la mobilité des espèces marquées avec des fluorophores. Nous décrivons dans cette partie le déroulement de ces expériences ainsi que le traitement des données recueillies à l'aide des deux dispositifs expérimentaux utilisés.

Pour clore ce chapitre, nous exposons le principe général de la technique de microbalance à cristal de quartz, technique permettant de suivre avec précision la croissance d'un film multicouche lors des premières étapes de sa construction.

2.1 Construction des échantillons

2.1.1 Les produits utilisés

Les polyélectrolytes utilisés sont dissous dans une solution aqueuse de chlorure de sodium (0.15 M) préparée avec de l'eau ultrapure Milli-Q de résistivité $\rho = 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$. Les solutions de polyélectrolytes utilisées pour construire des films multicouches sont préparées à une concentration de 1 mg / mL. Le pH de ces solutions est ajusté entre 5.9 et 6.4. Le tableau 2.1.1 – 1 récapitule les produits utilisés.

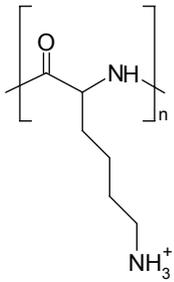
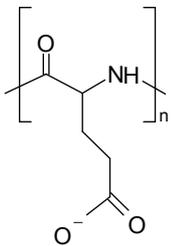
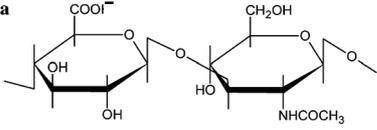
Nom des produits	Notation	Formule (pH = 6.2)	Masse molaire (g/mol)	pKa	Fournisseur
Poly(L-lysine)	PLL		58900	10.5	Sigma Aldrich
Poly(acide L-glutamique)	PGA		97800	4.3	Sigma Aldrich
Acide hyaluronique	HA		400000	2.9	Biolberica

Tableau 2.1.1 – 1 : Récapitulatif des polyélectrolytes utilisés.

Pour nos études des films multicouches en microscopie confocale ou pour des expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (cf. paragraphes 2.2 et 2.3), nous avons eu besoin d'utiliser des polyélectrolytes fluorescents. Selon les expériences, les concentrations en polyélectrolytes fluorescents utilisées ont varié de 0.05 à 5 mg / mL. Le tableau 2.1.1 – 2 répertorie les polyélectrolytes fluorescents utilisés.

Poly(L-lysine) couplé à			
Nom du marqueur	Notation	Masse molaire (g/mol)	Fournisseur
Isothiocyanate de fluorescéine	PLL ^{FITC}	66700	Sigma Aldrich
Rhodamine B	PLL ^{Rho}	57000	Synthèse au laboratoire
Poly(acide glutamique) couplé à			
Alexa Fluor 594	PGA ^{AR}	72000	Synthèse P. Mesini (ICS)

Tableau 2.1.1 – 2 : Récapitulatif des polyélectrolytes fluorescents utilisés.

2.1.2 Préparation des films multicouches

Les lamelles de silice sont nettoyées avant le dépôt de polyélectrolytes selon le protocole suivant :

- environ 1 heure dans une solution de dodecyl sulfate de sodium (SDS) 0.1M à 90°C,
- rinçage à l'eau ultrapure pendant 15 minutes,
- environ 1 heure dans une solution d'acide chlorhydrique 0.1 M chauffée à 90°C,
- rinçage à l'eau ultrapure pendant 15 minutes.

La fabrication des films multicouches à partir de solutions concentrées à 1 mg / mL a toujours été réalisée au moyen d'un bras robotisé (Riegler & Kirstein, GmbH, Berlin). Des lamelles de silice sont plongées successivement :

- 10 minutes dans la solution de polycation,
- 10 minutes dans une solution de NaCl à 0.15 M (solution de rinçage),
- 10 minutes dans la solution de polyanion,
- 10 minutes dans une solution de NaCl à 0.15 M (solution de rinçage).

Ce cycle de 4 étapes est répété autant de fois que le nombre de paires de couches total souhaité.

2.2 Microscopie confocale

2.2.1 Principe général de la microscopie confocale

Durant les années 1950, Minsky (connu notamment pour ses travaux sur l'intelligence artificielle) a développé le premier modèle de microscope confocal pour observer des échantillons épais en microscopie dans le cadre de travaux en neurobiologie [Boyde 1988].

La microscopie optique classique (à fluorescence ou non) ne permet pas de rendre une image nette d'un plan de l'échantillon autre que le plan de surface. En effet, tout le volume de l'échantillon, c'est-à-dire les plans situés au-dessus et en dessous du plan focal de l'objectif, est éclairé. Cela rend floue l'image de tout plan autre que celui de surface. Minsky a donc modifié le microscope optique en ajoutant deux diaphragmes. Le premier est placé après la source lumineuse afin de former une source ponctuelle et ainsi n'éclairer qu'un seul point du plan focal (ce point étant alors le plus éclairé de l'échantillon). Le second est placé au point de focalisation de l'objectif afin de ne récupérer que la lumière (fluorescence) provenant du plan focal. On parle de microscopie confocale car le plan de l'image produite par l'objectif et le plan de la source lumineuse ponctuelle sont conjugués. Cette modification apporte deux avantages majeurs :

- le premier est qu'on peut ainsi former l'image d'un plan de l'échantillon quelle que soit sa position axiale,
- le second est l'amélioration de la résolution latérale (source ponctuelle) et de la résolution axiale (diaphragme après l'objectif).

Cependant le microscope confocal ne connut un réel développement qu'à partir des années 1980 notamment grâce aux améliorations technologiques des lasers (sources de lumières monochromatiques et facilement focalisables) et de l'informatique. En effet, un seul point de l'échantillon étant éclairé à la fois, il est nécessaire de réaliser un balayage laser pour chaque point de la zone observée du plan focal pour obtenir l'intensité lumineuse émise par chaque point. L'image de la fluorescence de la zone est reconstituée à l'aide d'un logiciel qui traite l'ensemble des intensités recueillies. On appelle maintenant ce dispositif "microscope confocal à balayage laser" (Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM). Les dispositifs actuels de microscopie confocale reprennent le principe du prototype de Minsky (illumination

d'un seul point du plan focal, diaphragme pour éliminer la lumière provenant des autres plans (figure 2.2.1 – 1). Cette technique est ainsi une méthode de choix pour l'étude d'échantillons épais contenant des molécules fluorescentes.

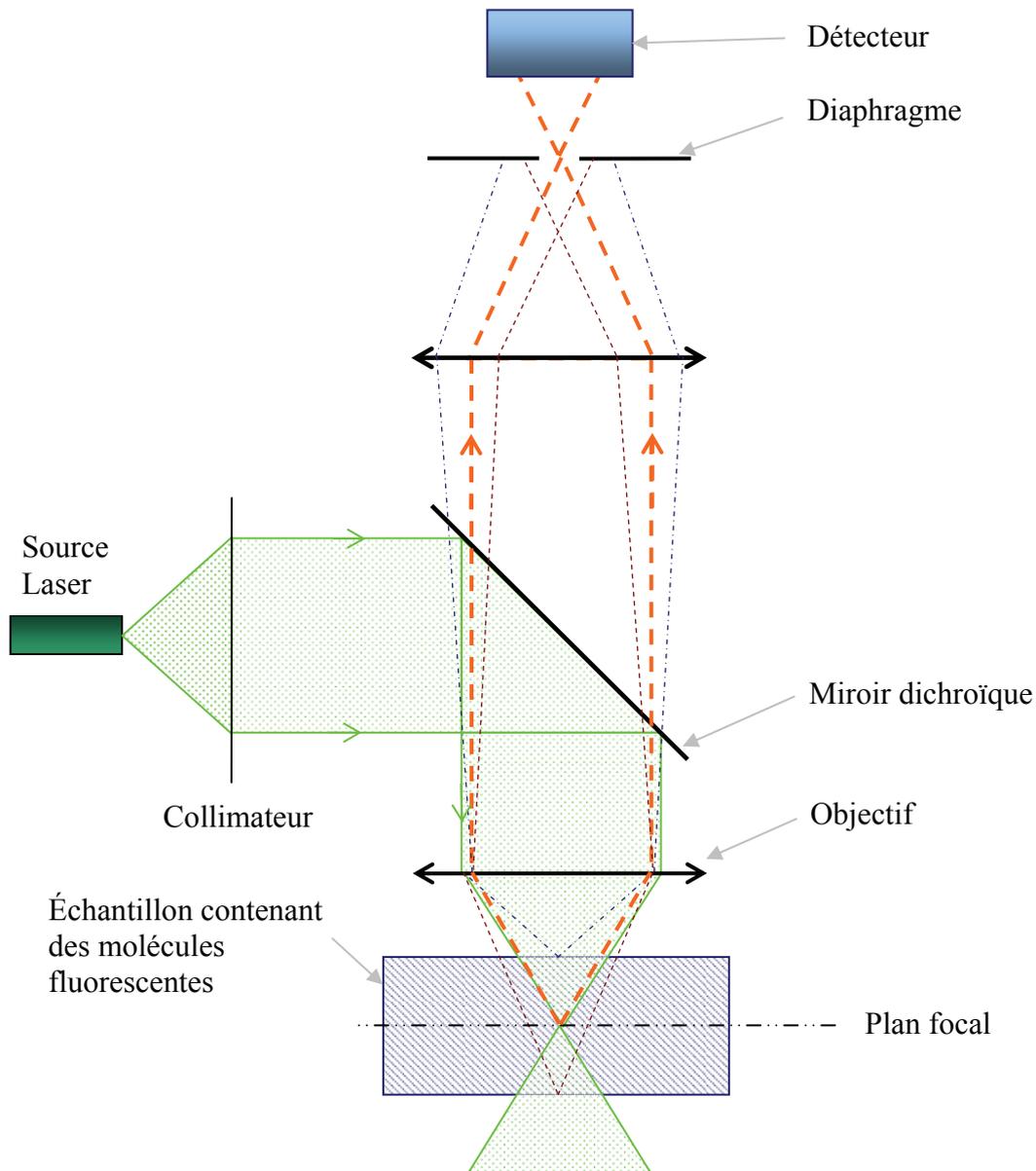


Figure 2.2.1 – 1 : Schéma de principe du microscope confocal. Seule la lumière provenant du point illuminé du plan focal est détectée (traits pointillés oranges). Les pointillés bleus et marron représentent la trajectoire de la lumière émise à partir d'autres plans. Ces trajectoires sont interrompues par le diaphragme et ne sont ainsi pas détectées. Le miroir dichroïque est réfléchissant à la longueur d'onde de la lumière émise par le laser, mais est transparent à celle de la fluorescence émise par l'échantillon (cf. § 2.2.2).

2.2.2 Fluorescence

Pour nos observations en microscopie confocale ou pour nos expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (cf. § 2.3), nous utilisons des polyélectrolytes fluorescents, tels que la poly(L-lysine) marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou à la rhodamine (Rho). Il peut être utile dans ce paragraphe de rappeler le principe du processus de fluorescence ainsi que de décrire la perte de fluorescence par photoblanchiment.

- **Processus de fluorescence**

Les molécules fluorescentes contiennent souvent des cycles aromatiques. Ce sont des molécules capables d'absorber une énergie lumineuse et d'émettre une radiation d'énergie plus faible, après un temps de l'ordre de la nanoseconde.

La structure des molécules fluorescentes leur permet d'être liées de manière covalente à d'autres molécules sans forcément perdre leur propriété de fluorescence. Elles jouent ainsi le rôle de sonde ou de marqueur et rendent possible la détection des espèces marquées présentes par exemple dans des cellules vivantes ou des films multicouches en microscopie confocale ou à fluorescence.

Le phénomène de fluorescence est le résultat de trois étapes (figure 2.2.2. – 1) :

- la première étape correspond à l'absorption par le fluorophore d'un photon d'énergie $E_1 = h\nu_{\text{abs}}$, où h est la constante de Planck et ν_{abs} la fréquence du rayonnement absorbé. La molécule passe ainsi du niveau électronique fondamental à un état excité instable.
- La seconde étape correspond à la transition d'un état excité à un autre de plus faible énergie ($E_2 < E_1$). Cette relaxation est due à l'interaction du fluorophore avec son environnement (dissipation d'énergie sous forme de chaleur par exemple).
- La troisième étape est le retour à l'état fondamental par émission d'un photon d'énergie $E_3 = h\nu_{\text{em}}$, plus faible que celle du photon d'excitation à cause de la dissipation d'énergie lors de l'étape 2 (ν_{em} est la fréquence du rayonnement émis).

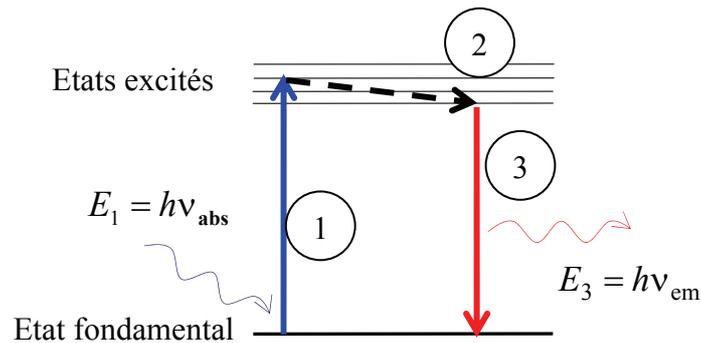


Figure 2.2.2 – 1 : Schéma en trois étapes du phénomène de fluorescence.

• Perte de fluorescence par photoblanchiment

Un fluorophore est capable de supporter un nombre d'excitations plus ou moins important. Lorsque ce nombre important est atteint, ce qui se produit notamment dans le cas d'une illumination trop intense, le fluorophore peut se détruire de manière irréversible et ainsi ne peut plus émettre de photon. Les mécanismes et les causes du photoblanchiment de la fluorescéine ont été étudiés par Song *et al.* [Song *et al.* 1995, Song *et al.* 1996].

Dans nos expériences, nous distinguons deux sources de photoblanchiment. Le premier est intentionnel en vue de créer un profil de concentration en molécules fluorescentes non uniforme. La diffusion des molécules tendra ensuite à restaurer une concentration uniforme dans l'échantillon. La mesure de la cinétique du processus de recouvrement de fluorescence permet d'estimer la fraction de molécules mobiles dans leur environnement et d'attribuer une valeur à leur coefficient de diffusion. Ces expériences sont décrites dans le paragraphe 2.3.

Le second type de photoblanchiment est systématiquement présent lorsqu'une image de la fluorescence d'un échantillon est réalisée (en microscopie confocale par exemple). Ce photoblanchiment, dit de lecture, perturbe l'analyse quantitative des intensités de fluorescence. Nous cherchons donc toujours les conditions expérimentales qui permettent de diminuer au maximum ce phénomène. Nous décrivons notamment dans le paragraphe suivant les méthodes employées en microscopie confocale pour limiter le photoblanchiment présent lors de l'observation d'un échantillon.

2.2.3 Dispositif expérimental

- **Configuration des microscopes utilisés**

Nous avons utilisé le modèle de microscope LSM 510 développé par Carl Zeiss pour toutes nos expériences. Celles-ci se sont déroulées sur les plates-formes de microscopie de l'Institut Fédératif de Recherche de Neurochimie (Strasbourg) ou de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (Strasbourg). Les deux modèles utilisés sont identiques et sont des microscopes inversés.

Nous avons essentiellement utilisé deux objectifs de microscope :

- un objectif $\times 10$ d'ouverture numérique égale à 0.3 et de résolution verticale de 11 μm pour certaines expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (cf. paragraphe 2.3.2.)
- un objectif à immersion dans l'huile $\times 40$ d'ouverture numérique égale à 1.4 et d'une résolution verticale de 0.4 μm .

Les lasers que nous avons utilisés sont :

- un laser Argon émettant à une longueur d'onde de 488 nm (ce laser possède également deux raies à 459 et 514 nm). Ce laser est adapté à l'excitation de l'isothiocyanate de fluorescéine (longueur d'onde d'absorption maximale de 490 nm).
- un laser Helium-Néon émettant à une longueur d'onde de 543 nm. Celui-ci était le plus adapté des lasers équipant le microscope confocal à notre disposition pour exciter la rhodamine (longueur d'onde d'absorption, 572 nm, longueur d'onde d'émission, 591 nm) et du fluorophore Alexa Red 594 (longueur d'onde d'absorption 590 nm, longueur d'onde d'émission 612 nm).

Pour détecter la fluorescence émise par les différents fluorophores et l'isoler des longueurs d'onde d'excitation des différents lasers (488 et 543 nm), nous avons employé différents filtres :

- un filtre passe-bande 505 – 530 nm pour isoler l'émission de fluorescence de l'isothiocyanate de fluorescéine (centrée sur 510 nm),
- un filtre passe bande 585 – 615 nm pour isoler l'émission de fluorescence de la rhodamine ou de l'Alexa Red 594.

Les acquisitions d'intensités lumineuses pour ces deux filtres se font successivement, et non pas simultanément.

- **Représentation d'une image de microscope confocal**

Par souci de clarté, nous décrivons succinctement comment sont représentées les images de microscopie confocale dans ce manuscrit.

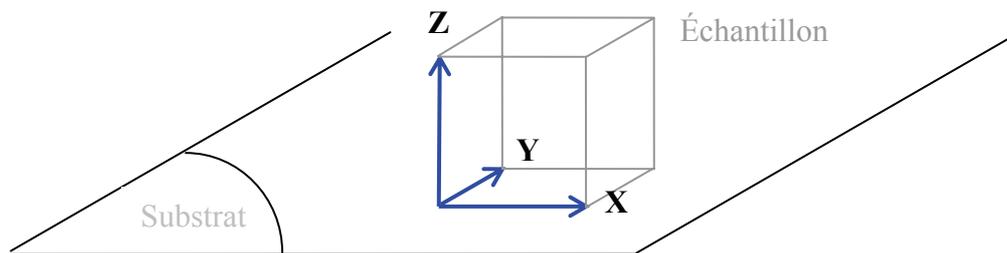


Figure 2.2.3 – 1 : Représentation de l'échantillon.

- On peut imaginer un plan (X, Y) de l'échantillon:

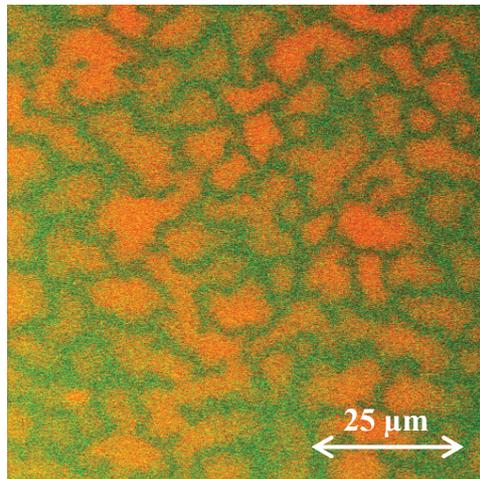


Figure 2.2.3 – 2 : Image d'un plan (X, Y) d'un film multicouche de polyélectrolytes à base de poly(L-lysine), d'acide hyaluronique et de poly(acide glutamique). La poly(L-lysine) a été couplée d'une part à l'isothiocyanate de fluorescéine, et d'autre part à la rhodamine.

- On peut aussi imaginer un plan (X, Z) de l'échantillon :

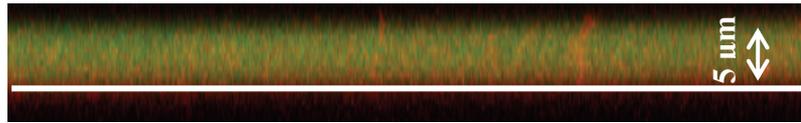


Figure 2.2.3 – 3 : Image d'une section (plan (X, Z) quelconque) d'un film multicouche à base de poly(L-lysine) et d'acide hyaluronique. La poly(L-lysine) a été couplée d'une part à l'isothiocyanate de fluorescéine, et d'autre part à la rhodamine. Le trait blanc correspond à la position approximative de la lame de verre.

Pour les images représentant une des sections (un plan (X, Z)) d'un échantillon marqué avec deux fluorophores, nous avons souvent choisi de représenter séparément le canal de détection propre à chaque fluorophore (cela est également possible pour l'image d'un plan (X, Y) de l'échantillon). Dans ce cas, la figure (2.2.3 – 3) peut aussi être représentée de la manière suivante (figure 2.2.3 - 4) :

Somme des deux canaux (Image précédente)	
Filtre passe bande : λ compris entre 585 et 615 nm Ex : PLL ^{Rho} , PGA ^{AR}	
Filtre passe bande : λ compris entre 505 et 530 nm Ex : PLL ^{FITC}	

Figure 2.2.3 – 4 : Représentation possible de l'image d'une section de l'échantillon de la figure 2.2.3 – 3. Vue individuelle de chaque canal de détection et somme des deux canaux.

2.2.4 Mesure et analyse des intensités de fluorescence

- Paramètres instrumentaux à optimiser

La réalisation d'une image en microscopie confocale est le résultat du compromis entre la qualité de l'image, c'est-à-dire obtenir le meilleur rapport signal / bruit, et la perte minimale de fluorescence par photoblanchiment. Lors de nos travaux, l'analyse de l'intensité de fluorescence de différents échantillons a été nécessaire. De fait, nous nous sommes fixés une méthode pour réaliser de la même manière toutes les images de nos différents échantillons.

Cela nous a permis de comparer les intensités de fluorescence émises par les films multicouches lors de différentes expériences sans biais instrumental.

Avant de décrire notre protocole, nous décrivons les deux jeux de paramètres influant la qualité d'une image :

- les conditions d'excitation et de détection de la fluorescence. Il est possible de jouer sur l'intensité du laser, la sensibilité du détecteur et le niveau de bruit de fond. Augmenter l'intensité du laser augmente l'émission de fluorescence par l'échantillon mais augmente aussi le photoblanchiment. Il est aussi possible de jouer sur le diamètre de l'ouverture du diaphragme ("pinhole") situé devant le système de détection. Une augmentation de ce diamètre permet de mesurer plus de signal, mais diminue la résolution verticale.
- les conditions de balayage du laser sur l'échantillon. La vitesse de balayage, ainsi que le nombre de balayages de l'échantillon, peuvent être modifiés. Il est possible de faire la moyenne, pour chaque pixel de l'image, de l'intensité de fluorescence mesurée au cours de plusieurs passages. Cette méthode, associée à une diminution de la vitesse de balayage qui a pour effet d'accroître le temps d'illumination de chaque pixel, donc l'intensité de sa réponse, permet d'augmenter le rapport signal / bruit, mais induit un photoblanchiment plus important.

Pour pouvoir comparer les intensités de fluorescence obtenues dans différentes expériences, nous avons fixé la valeur de chaque paramètre, excepté la sensibilité du détecteur. Nous expliquons plus précisément dans le paragraphe suivant comment nous procédons à l'estimation des valeurs d'intensité de fluorescence.

- **Estimation des niveaux de fluorescence**

L'intensité de fluorescence mesurée par le système de détection, qui comprend le filtre à longueurs d'onde et un photomultiplicateur, est convertie par l'ordinateur en 256 « niveaux de gris », le niveau le plus faible (aucun signal) étant égal à 0, le niveau le plus fort étant égal à 255. Les mesures de niveaux de gris des images de microscopie confocale ont été réalisées avec le logiciel ImageJ (Rasband WS, NIH, Bethesda, MD).

Dans le cas d'analyses quantitatives des intensités de fluorescence, nous traçons le profil de fluorescence pour tous les échantillons le long de l'axe Z (cf. figure 2.2.2 – 2). Nos

échantillons correspondent à des films d'assemblages polymères déposés dans la plupart des cas de façon uniforme et homogène sur des lamelles de verre. Nous comparons ensuite la valeur maximale obtenue pour chacun des profils (figure 2.2.4 – 1). Il est important de remarquer que les valeurs de niveaux de gris dépendent de la sensibilité du détecteur. Ainsi, si l'on souhaite comparer les intensités de fluorescence (en niveaux de gris) de différents échantillons, il est indispensable de réaliser les images de microscopie confocale à la même sensibilité de détection.

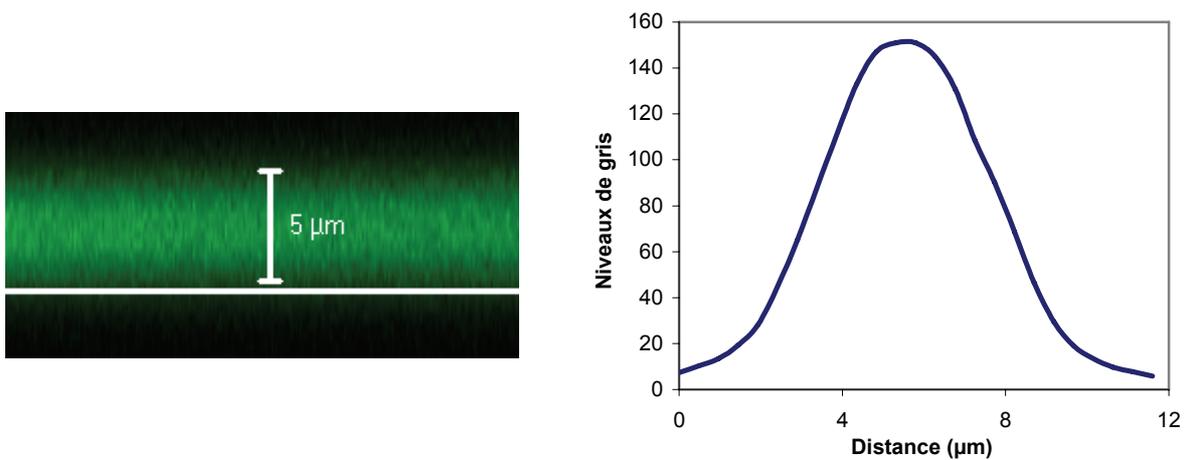


Figure 2.2.4 – 1 : Profil de fluorescence le long de l'épaisseur d'un film multicouche $(\text{PLL} - \text{HA})_{30} - \text{PLL}^{\text{FITC}}$. À gauche, image de microscopie confocale d'une section de l'échantillon. Le trait blanc horizontal représente la position (approximative) du substrat, une lamelle de verre. À droite, représentation de l'intensité de fluorescence en niveaux de gris. L'origine de l'axe des abscisses correspond au bord inférieur de l'image de microscopie.

2.3 Mesure de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment

Une méthode pour mettre en évidence et quantifier la mobilité de molécules dans un milieu consiste à réaliser des expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP), en utilisant des molécules marquées par greffage de fluorophores.

Cette méthode a été développée il y a une trentaine d'années [Peters *et al.* 1974]. Axelrod *et al.* ont montré comment elle pouvait être mise à profit pour estimer quantitativement la valeur du coefficient de diffusion d'une espèce marquée [Axelrod *et al.* 1976]. Les applications des expériences de recouvrement de fluorescence ont été répertoriées par Meyvis *et al.* [Meyvis *et al.* 1999]. Cette technique a par exemple été utilisée pour étudier la diffusion de chaînes de dextran [Gribbon and Hardingham 1998], la diffusion de protéines dans des cellules [McGrath *et al.* 1998] ou sur des substrats comme les films multicouches [Szyk *et al.* 2001]. Il existe deux méthodes de mise en œuvre de la FRAP : photoblanchiment d'une zone unique de l'échantillon ou photoblanchiment avec motif périodique [Smith and McConnell 1978].

Le dispositif permettant de réaliser un blanchiment périodique que nous avons utilisé n'était pas associé à un microscope optique ; il n'offrait donc pas la possibilité de prendre des images de l'échantillon étudié. Néanmoins, ce système de mesure de recouvrement de fluorescence permet de déterminer les coefficients de diffusion avec une plus grande précision que la méthode utilisant le microscope confocal. Les expériences de recouvrement en microscopie confocale conduisent à une précision moindre ; par contre, cette approche permet le suivi visuel de l'évolution du recouvrement de l'échantillon sur les clichés successifs.

Dans les paragraphes qui suivent, nous allons décrire le système de photoblanchiment à franges d'interférence, ainsi que le déroulement d'expériences de recouvrement de fluorescence en microscopie confocale. Pour chaque technique, nous présenterons les méthodes de photoblanchiment pour obtenir un profil non uniforme en concentration de molécules fluorescentes, ainsi que les méthodes de traitement des signaux mesurés.

2.3.1 Photoblanchiment à partir de motifs périodiques

Il y a deux avantages à créer un profil de concentration périodique en molécules fluorescentes dans un échantillon :

- la facilité de l'analyse des résultats
- la précision de l'estimation du coefficient des molécules étudiées.

Nous présentons dans ce qui suit successivement la description du dispositif expérimental, la méthode de photoblanchiment et d'excitation de la fluorescence de l'échantillon puis les méthodes de traitement employées.

• Schéma du dispositif expérimental

La figure (2.3.1 – 1) décrit le dispositif expérimental que nous avons utilisé. Celui-ci a été conçu à l'Institut Charles Sadron (Strasbourg), et les expériences ont été réalisées en collaboration avec le Dr Thierry Charitat. Ce dispositif est du même type que celui décrit par Davoust *et al.* [Davoust *et al.* 1982].

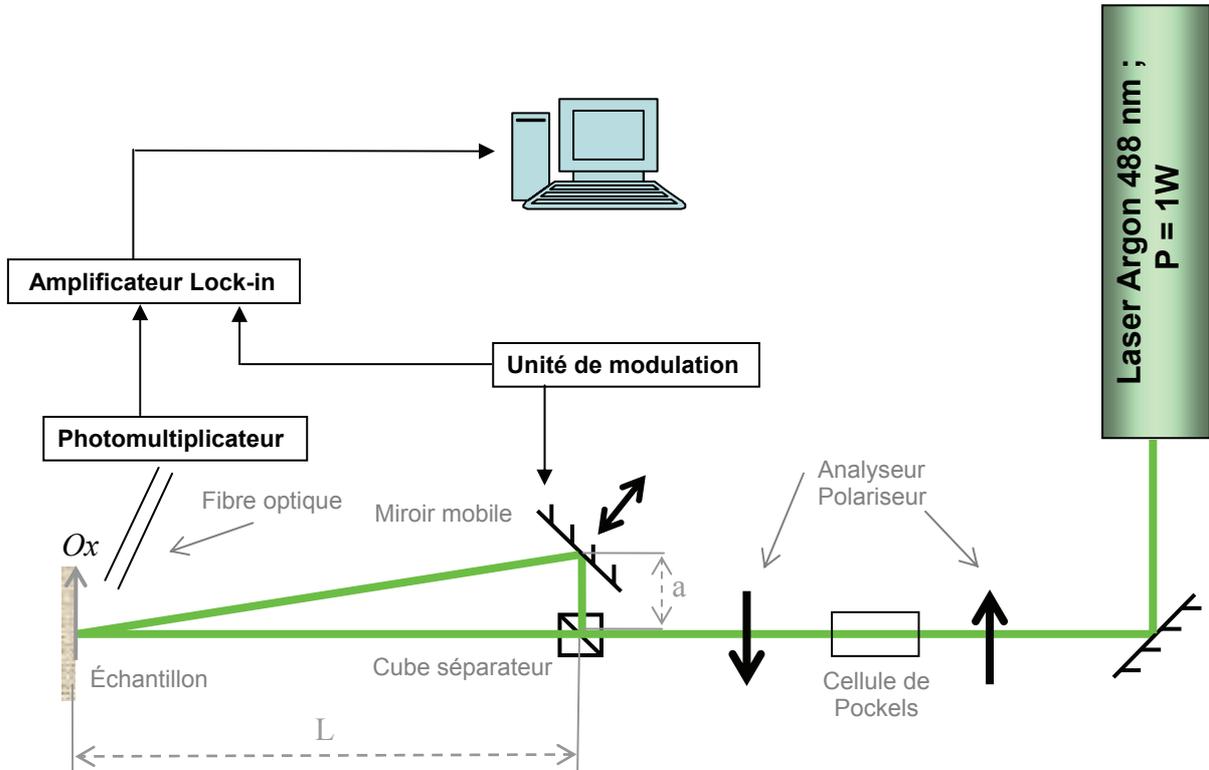


Figure 2.3.1 – 1 : Dispositif à interférences pour expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP).

Ce montage est basé sur un dispositif à interférences. Le faisceau laser est divisé en deux par un cube séparateur. Les deux faisceaux résultants sont focalisés à la surface de l'échantillon où ils forment des franges d'interférence (figure 2.3.1 – 2). Celles-ci sont presque perpendiculaires à l'axe Ox (figure 2.3.1 – 2) et leur intensité est donnée par l'expression :

$$I(\vec{r}) = I[1 + \cos(\vec{q}_0 \cdot \vec{r})] \quad (\text{éq 2.3.1 – 1})$$

Le module du vecteur \vec{q}_0 , fréquence spatiale des franges, est défini par :

$$q_0 = \frac{2\pi}{i} \quad (\text{éq 2.3.1 – 2})$$

où i désigne l'interfrange donné par :

$$i = \frac{\lambda}{2 \sin \frac{\theta}{2}} \approx \frac{\lambda L}{a} \quad (\text{éq 2.3.1 – 3})$$

Par ailleurs,

- \vec{r} est un vecteur contenu dans le plan de la surface de l'échantillon
- I représente l'intensité du faisceau laser
- L est la distance entre l'échantillon et le plan contenant le cube séparateur et le miroir mobile
- a est la distance entre le centre du cube séparateur et le miroir
- λ est la longueur d'onde de la lumière émise par le laser (488 nm)
- θ est l'angle formé par les deux faisceaux incidents (figure 2.3.1 – 2 **(B)**)

Dans nos expériences nous faisons varier l'interfrange (et donc la fréquence spatiale des franges) de 10 à 90 μm en modulant la distance a . Ces franges constituent le motif de blanchiment de la fluorescence de l'échantillon.

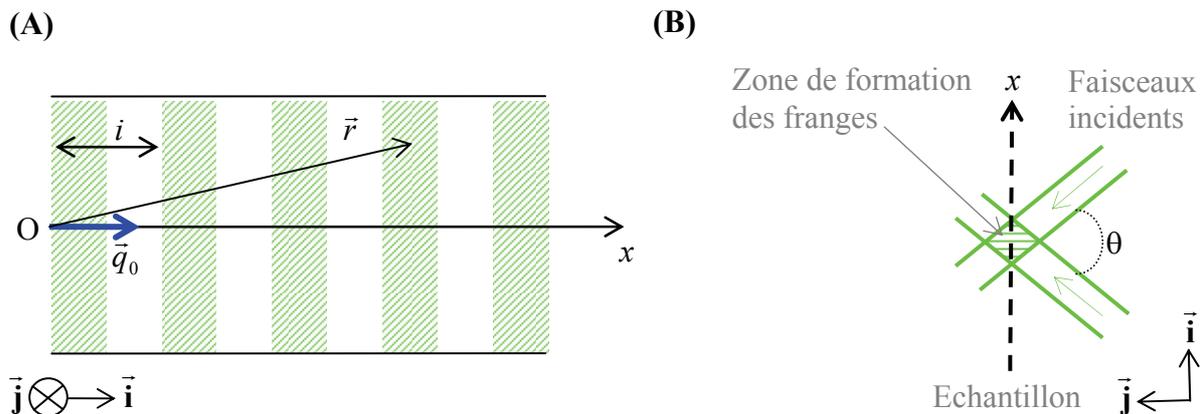


Figure 2.3.1 – 2 : (A) Représentation des vecteurs \vec{r} et \vec{q}_0 de la zone de l'échantillon où se forment les franges d'interférence. L'axe Ox est parallèle au plan formé par les deux faisceaux incidents. Les franges formées par les deux faisceaux sont représentées par des crêneau par souci de simplicité. (B) Principe de la formation des franges d'interférences.

- **Excitation et photoblanchiment de la fluorescence de l'échantillon**

Le faisceau de lecture (excitation de la fluorescence de l'échantillon après le photoblanchiment) et le faisceau d'écriture (ou de photoblanchiment) sont tous deux obtenus à partir du dispositif d'interférences. Leurs intensités lumineuses sont néanmoins différentes, celle du faisceau d'écriture étant beaucoup plus importante que celle du faisceau de lecture.

Afin de pouvoir exciter les molécules fluorescentes de l'échantillon sans les photoblanchir, un couple « polariseur / analyseur » quasiment croisés est placé sur le trajet du faisceau laser avant le cube séparateur, l'intensité est ainsi réduite à son minimum I_0 .

Le blanchiment de fluorescence des espèces marquées contenues dans l'échantillon est obtenu en le soumettant à l'intensité maximale du laser, I_{\max} . La durée d'exposition de l'échantillon à cette intensité maximale varie de une à cinq secondes. La durée de photoblanchiment dépend de l'échantillon car il faut obtenir un contraste suffisant entre les zones blanchies et les zones non blanchies. Pendant le photoblanchiment de l'échantillon, un obturateur placé devant le photomultiplicateur protège ce dernier en coupant le faisceau.

L'impulsion lumineuse est obtenue grâce à une cellule de Pockels placée entre le polariseur et l'analyseur qui sont quasiment croisés. La cellule de Pockels est un dispositif qui permet de transmettre le maximum d'intensité lumineuse au dispositif d'interférences en faisant tourner la polarisation du faisceau laser de la direction de polarisation du polariseur à celle de l'analyseur. Nous contrôlons le temps pendant lequel est alimentée la cellule de Pockels, définissant ainsi le temps de photoblanchiment.

Le rapport entre les intensités I_{\max} et I_0 des faisceaux est en général :

$$\frac{I_{\max}}{I_0} \approx 100 - 1000 \quad (\text{éq 2.3.1 - 4})$$

Le profil de concentration en espèces fluorescentes de l'échantillon immédiatement après le photoblanchiment suit une loi du type :

$$c(\vec{r}, t = 0) = c_0 \mathbf{e}^{-K[1+\cos(\vec{q}_0 \cdot \vec{r})]} \quad (\text{éq 2.3.1 - 5})$$

Les termes compris dans l'équation (2.3.1 - 5) sont définis par :

- c_0 la concentration en molécules fluorescentes dans l'échantillon avant le photoblanchiment
- K le facteur de blanchiment lié à une constante α caractérisant le mécanisme de photoblanchiment des espèces fluorescentes, l'intensité du faisceau I_{\max} et le temps de photoblanchiment Δt_B :

$$K = \alpha I_{\max} \Delta t_B \quad (\text{éq 2.3.1 - 6})$$

Davoust *et al.* ont modélisé l'allure du profil de concentration en espèces fluorescentes d'un échantillon immédiatement après le photoblanchiment pour plusieurs valeurs du facteur de blanchiment K (figure (2.3.1 - 3)). L'équation (2.3.1 - 5) correspondant à l'expression mathématique du profil indique qu'il n'est pas purement sinusoïdal. Néanmoins, sa fréquence spatiale fondamentale est la fréquence spatiale des franges du faisceau laser d'écriture ou de lecture, c'est-à-dire q_0 . Les autres fréquences spatiales contenues dans l'expression du profil sont des harmoniques de la fréquence fondamentale.

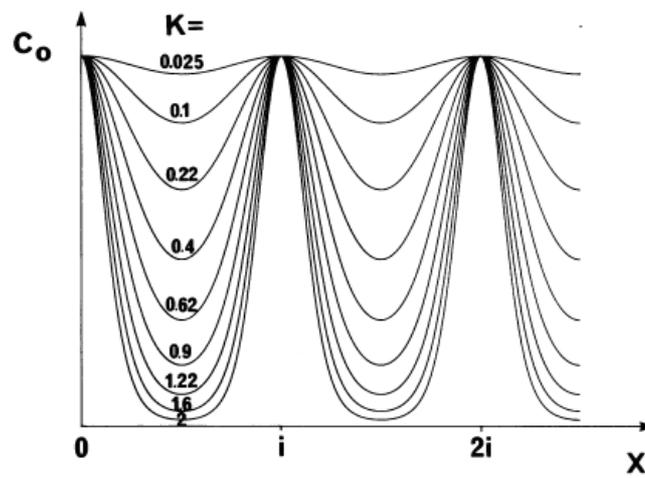


Figure 2.3.1 - 3 : Profils de concentration en molécules fluorescentes obtenus à partir de l'équation 2.3.1 - 5, immédiatement après la fin de l'impulsion lumineuse intense, pour différents facteurs de photoblanchiment K en fonction de la position des franges du faisceau de blanchiment [Davoust *et al.* 1982].

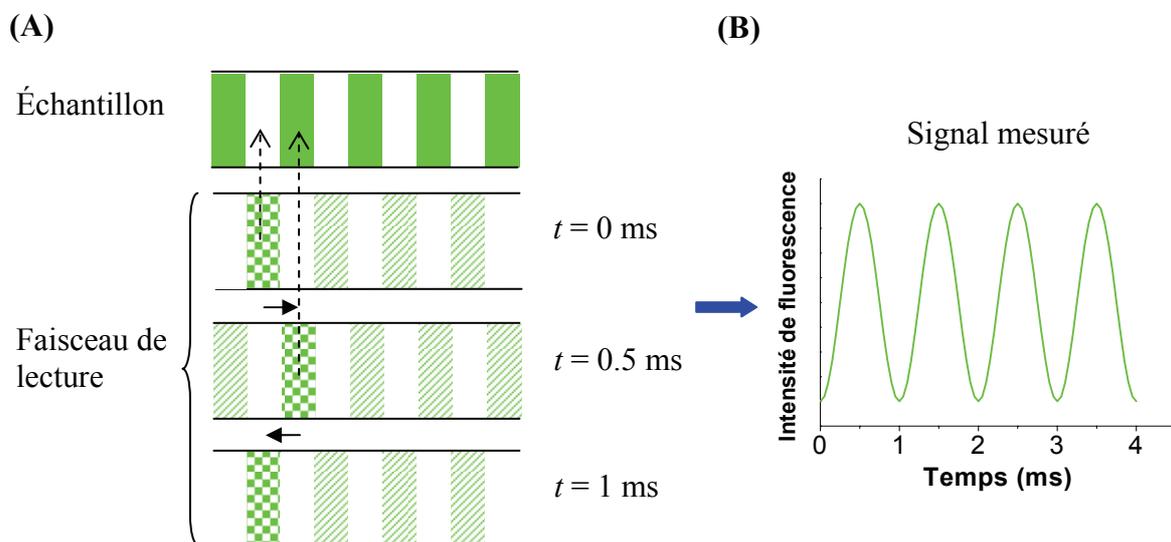
- **Principe de la mesure de l'intensité de fluorescence émise par l'échantillon**

Le signal de fluorescence émis par l'échantillon est collecté par une fibre optique reliée à un photomultiplicateur. Un second obturateur est placé devant l'échantillon. Il permet de hacher le faisceau de lecture qui n'illumine ainsi l'échantillon que pendant 20 s par tranche de 40 s. Cet artifice permet de limiter le photoblanchiment subi par l'échantillon au cours de la mesure.

La position à la surface de l'échantillon des franges du faisceau de lecture est modulée par la vibration du miroir grâce au cristal piézoélectrique sur lequel il est monté. La période des oscillations est égale à 1 ms ($f = 1$ kHz) et l'amplitude est de l'ordre de la largeur des franges. Cette modulation fait osciller la position d'une frange brillante du faisceau de lecture

d'une zone blanchie à une zone non blanchie de l'échantillon (figure (2.3.1 – 4)). La détection synchrone permet de filtrer le signal reçu pour ne conserver que la fréquence caractéristique de la vibration du cristal piézoélectrique. Ainsi, la plupart des sources de bruit sont éliminées ce qui améliore considérablement la qualité des mesures effectuées.

La différence d'intensité de fluorescence entre les zones blanchies et non blanchies est représentative de l'amplitude du profil de concentration en espèces fluorescentes. Le principe du dispositif est de mesurer la relaxation temporelle de l'amplitude de ce profil de concentration. Cette relaxation est due à la diffusion des espèces fluorescentes des zones non blanchies vers les zones blanchies de l'échantillon.



• Traitement des données expérimentales

Le signal fourni par le système de détection « photomultiplicateur + amplificateur à détection synchrone », correspond donc à l'évolution temporelle du contraste entre les zones blanchies et non blanchies.

Davoust et *al.* ont résolu l'équation de diffusion dans le cas d'un profil de concentration périodique :

$$\frac{\partial c(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 c(\vec{r}, t) \quad (\text{éq 2.3.1 - 7})$$

En adoptant les deux hypothèses

- d'une concentration en espèces fluorescentes qui suit un profil périodique dont la fréquence spatiale fondamentale est égale à q_0 et qui contient un nombre infini d'harmoniques,
- et d'un faisceau de lecture à franges d'interférence (excitation des molécules fluorescentes) dont la fréquence spatiale est égale à q_0 ,

ils ont démontré que le signal de fluorescence $F(t)$ émis par un échantillon pouvait être modélisé par une loi du type :

$$F(t) = A_0 + A_1 e^{-\frac{t}{\tau_q}} \quad (\text{éq 2.3.1 - 8})$$

où :

- A_0 correspond à la fraction de population fluorescente immobile
- A_1 correspond à la fraction de population fluorescente mobile
- τ_q est le temps caractéristique de décroissance défini par :

$$\tau_q = (Dq_0^2)^{-1} \quad (\text{éq 2.3.1 - 9})$$

Comme le profil de concentration contient une infinité d'harmoniques de la fréquence q_0 ($2q_0, \dots, nq_0, \dots$), nous aurions pu nous attendre à observer une infinité de temps τ_q dans le signal mesuré. Cependant, le faisceau de lecture étant de forme sinusoïdale pure, celui-ci ne mesure que la décroissance de l'amplitude du profil de concentration dépendant de la fréquence fondamentale q_0 . En fait, comme la méthode de mesure est capable de discerner un seul temps de décroissance, τ_q , elle en permet une estimation très précise. Ainsi, l'estimation du coefficient de diffusion, D , s'en trouve améliorée par rapport à celle que l'on obtiendrait avec l'utilisation d'un faisceau de lecture de profil continu en intensité.

Dans un premier temps, nous avons utilisé l'équation (2.3.1 - 8) pour traiter les données expérimentales obtenues lors des expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment sur nos échantillons. Cependant, pour certains d'entre eux, une loi avec un seul terme de décroissance exponentielle ne donnait pas des ajustements aux points expérimentaux de qualité suffisante. Nous avons donc utilisé une loi avec deux termes

exponentiels (éq 2.3.1 – 10), ce qui permet de rendre compte, si elles existent, de deux espèces fluorescentes mobiles :

$$F(t) = A_0 + A_1 e^{-\frac{t}{\tau_{q_1}}} + A_2 e^{-\frac{t}{\tau_{q_2}}} \quad (\text{éq 2.3.1 – 10})$$

où l'on définit :

- A_1 et A_2 correspondant aux deux espèces mobiles,
- A_0 correspondant aux molécules immobiles,
- τ_{q_1} et τ_{q_2} par les expressions suivantes

$$\tau_{q_1} = (D_1 q_0^2)^{-1} \quad (\text{éq 2.3.1 – 11})$$

$$\tau_{q_2} = (D_2 q_0^2)^{-1} \quad (\text{éq 2.3.1 – 12})$$

Dans les deux dernières équations, D_1 et D_2 sont les coefficients de diffusion des deux espèces mobiles dont les abondances relatives sont A_1 et A_2 , respectivement. Sur la figure (2.3.1 – 5) nous avons représenté les points expérimentaux et les ajustements obtenus pour des échantillons avec une (A) et deux (B) fraction(s) mobile(s). L'ajustement des équations (2.3.1 – 9) ou (2.3.1 – 10) nous fournit le ou les temps caractéristiques de décroissance. En traçant les temps τ_q obtenus pour les expériences réalisées à différentes valeurs de l'interfrange du faisceau d'écriture (et donc à différentes fréquences spatiales q_0) en fonction de $1/q_0^2$, une régression linéaire nous donne le coefficient de diffusion des fractions mobiles (figure 2.3.1 – 6).

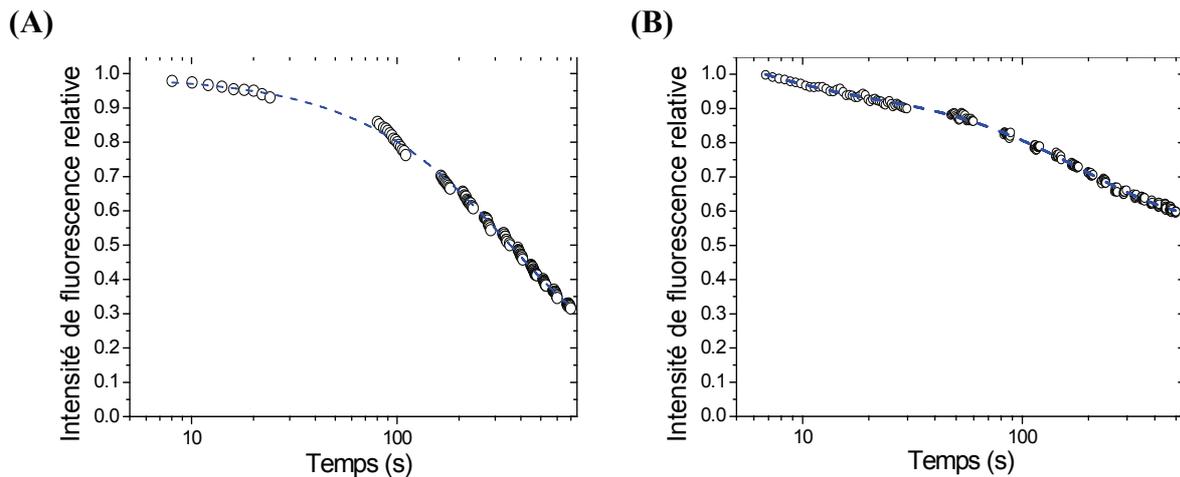


Figure 2.3.1 – 5 : Points expérimentaux et ajustements (tracés en tirets bleus) obtenus pour deux échantillons différents. (A) Film (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} – (HA – PLL)₂₄, $\tau_q = 370$ s, $q_0 = 1047$ cm⁻¹. (B) Film (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC}, $\tau_{q_1} = 7$ s, $\tau_{q_2} = 200$ s, $q_0 = 2180$ cm⁻¹.

Pour obtenir la proportion respective des espèces mobiles et immobiles, il suffit de calculer le rapport (éq 2.3.1 – 13) dans le cas d'une seule espèce mobile ou le rapport (éq 2.3.1 – 14) dans le cas de deux espèces mobiles.

$$f_i = \frac{A_i}{A_0 + A_1}, i = 0 \text{ ou } 1 \quad (\text{éq 2.3.1 – 13})$$

$$f_i = \frac{A_i}{A_0 + A_1 + A_2}, i = 0, 1 \text{ ou } 2 \quad (\text{éq 2.3.1 – 14})$$

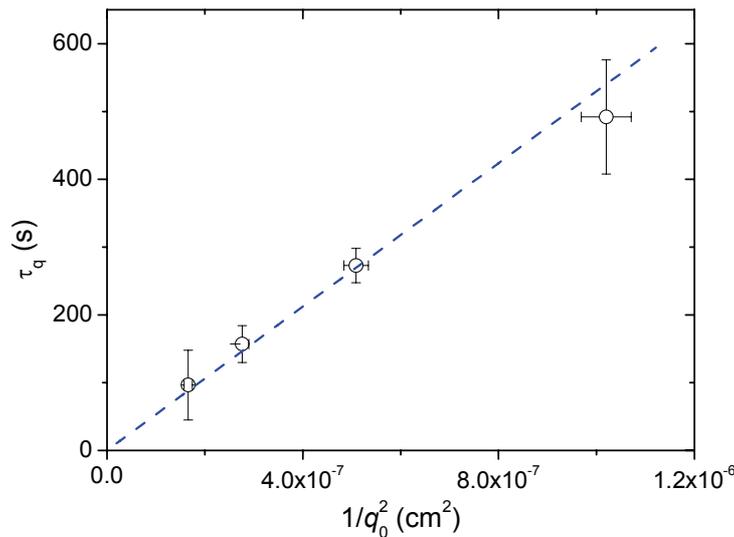


Figure 2.3.1 – 6 : Temps caractéristiques de décroissance de l'amplitude du profil de concentration en molécules fluorescentes d'un film multicouche $(\text{PLL} - \text{HA})_{24} - \text{PLL}^{\text{FITC}} - (\text{HA} - \text{PLL})_{24}$ en fonction de l'inverse du carré de la fréquence spatiale q_0 elle-même reliée à la valeur de l'interfrange (2.3.1 – 3). L'inverse du coefficient de la régression linéaire fournit le coefficient de diffusion. Pour cet exemple, $D = 1.9 \pm 0.2 \text{ cm}^2/\text{s}$. Chaque point correspond à la moyenne de 4 mesures. Les barres d'erreur sur les temps correspondent à l'erreur sur la moyenne de 4 mesures. Les barres d'erreur sur $1/q_0^2$ sont liées à l'incertitude sur l'estimation de l'interfrange.

2.3.2 Photoblanchiment d'une zone unique

Une autre possibilité pour réaliser des expériences de recouvrement et étudier la mobilité de molécules fluorescentes est de blanchir une zone unique et de suivre l'évolution temporelle du recouvrement de fluorescence. Ces expériences sont généralement effectuées à l'aide d'un microscope confocal, car cet instrument possède souvent le dispositif nécessaire [Gribbon and Hardingham 1998].

- **Détails expérimentaux**

Expérimentalement, le volume blanchi de l'échantillon est un cylindre dont l'axe est perpendiculaire à la surface libre de l'échantillon et dont le diamètre est défini par l'expérimentateur. L'échantillon est blanchi sur toute son épaisseur. La figure (2.3.2 – 1) illustre l'étape de blanchiment : à gauche, une vue de dessus (plan (x, y)) de l'échantillon avant le blanchiment est présentée et le contour de la zone qui va être blanchie est dessiné sur l'image. A droite (figure 2.3.2 – 1), la même zone de l'échantillon est visualisée immédiatement après le photoblanchiment. Le temps de blanchiment est variable en fonction de l'échantillon, car il est nécessaire d'obtenir un contraste suffisant entre la zone blanchie et le reste de l'échantillon. En général, le temps de blanchiment est de l'ordre d'une dizaine de secondes et le recouvrement de fluorescence est suivi sur une durée de 10 à 50 minutes dans nos expériences.

Pour ces expériences, nous utilisons un objectif $\times 10$ d'ouverture numérique égale à 0.3. Sa résolution verticale est de l'ordre de $11 \mu\text{m}$, dimension plus grande que l'épaisseur des films que nous étudions, qui est de l'ordre de $5 \mu\text{m}$.

Après l'étape de photoblanchiment, une série d'images de la zone blanchie est réalisée afin de suivre la cinétique de recouvrement. En général, les images recueillies au cours des dix premières minutes sont réalisées à des intervalles de temps de une à deux minutes. Ensuite, cet intervalle est allongé à cinq minutes, et enfin porté à dix minutes au-delà d'un temps d'observation dépassant une demi-heure.

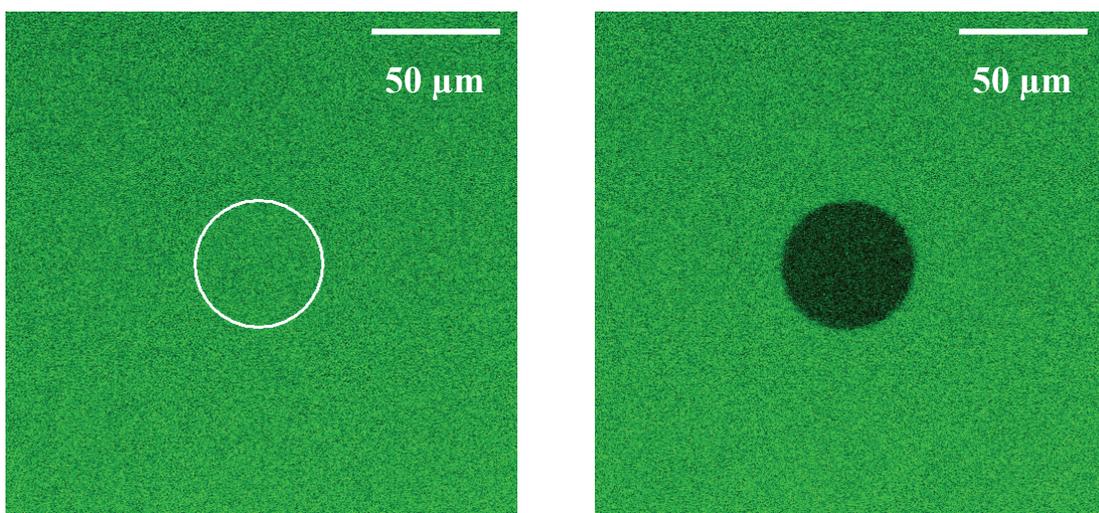


Figure 2.3.2 – 1 : Exemple des étapes de photoblanchiment d'une zone circulaire d'un échantillon. Ici il s'agit d'un film multicouche $(\text{PLL} - \text{HA})_{24} - \text{PLL}^{\text{FITC}}$. Les images suivant le plan (x, y) sont obtenues en microscopie confocale. A gauche : image du film avant le photoblanchiment. Le cercle blanc délimite le contour de la zone à blanchir. Image de droite : échantillon 10 secondes après la fin du photoblanchiment.

- **Méthodes de traitement des données expérimentales**

Il existe plusieurs modèles pour extraire le coefficient de diffusion et la proportion d'espèces mobiles au sein de l'échantillon à partir des images de microscopie confocale [Axelrod *et al.* 1976 , Soumpasis 1983]. Nous utilisons les méthodes théoriques développées par Picart *et al.* [Picart *et al.* 2005] qui présentent deux façons de traiter les données.

La première méthode exploite la cinétique de recouvrement de fluorescence de la zone blanchie. Pour cela nous mesurons le rapport de l'intensité lumineuse de la zone blanchie à celle d'une zone éloignée de la zone blanchie de même aire. Ce rapport correspond au rapport des concentrations de molécules fluorescentes dans les mêmes zones. Dans le cas idéal où le profil de concentration est à bord net (pas d'effet de couronne, c'est-à-dire effet de diffusion négligeable pendant le temps de blanchiment), le rapport théorique s'exprime par [Picart *et al.* 2005] :

$$\frac{c(\tau)}{c_0} = \alpha + p(1 - \alpha)e^{-\frac{2}{\tau} \left[\mathbf{I}_0\left(\frac{2}{\tau}\right) + \mathbf{I}_1\left(\frac{2}{\tau}\right) \right]} \quad (\text{éq 2.3.2 - 1})$$

Dans cette équation, le temps t , mesuré à compter de l'arrêt du blanchiment, est introduit par l'intermédiaire de la variable sans dimension, τ , définie par :

$$\tau = \frac{4Dt}{a^2} \quad (\text{éq 2.3.2 - 2})$$

Les autres symboles apparaissant dans les équations (2.3.2-1) et (2.3.2-2) sont définis comme suit :

- a est le rayon de la zone blanchie.
- α correspond au rapport d'intensité entre la zone blanchie et une zone non blanchie juste après le blanchiment, dans l'hypothèse d'un blanchiment uniforme sur l'aire illuminée.
- D est le coefficient de diffusion.
- p est la fraction d'espèces mobiles.
- \mathbf{I}_0 et \mathbf{I}_1 sont les fonctions de Bessel modifiées de première espèce d'ordres 0 et 1, respectivement.

Il est ainsi possible d'extraire le coefficient de diffusion D ainsi que la fraction p des espèces mobiles en optimisant les valeurs de D et p pour ajuster la forme théorique de la cinétique de recouvrement à son évolution expérimentale.

Rappelons que la méthode qui vient d'être décrite repose sur l'hypothèse que le blanchiment est uniforme sur la zone irradiée. Toutefois, expérimentalement, le photoblanchiment n'est pas rigoureusement instantané. Le profil de concentration obtenu à la fin de la phase de blanchiment est donc perturbé par la diffusion des espèces marquées. En d'autres termes, la concentration en espèces fluorescentes n'est pas uniforme dans la zone blanchie ni dans une région annulaire entourant la zone blanchie (effet de couronne). Cette remarque nous amène à la seconde méthode qui tient compte de ce phénomène.

La seconde méthode nécessite de disposer des profils de concentration des molécules fluorescentes le long d'une droite portée par un diamètre de la zone blanchie (trait rouge de la figure 2.3.2 – 2 ; partie gauche). Nous remarquons que le profil obtenu (figure 2.3.2 – 2; partie droite) a la forme d'un puits dont les parois ne sont pas verticales et le fond n'est pas plat. Dans ces conditions, le premier profil déterminé après la phase de blanchiment est considéré comme représentant les conditions initiales de l'équation de diffusion. Cette équation permettrait de prévoir le profil de concentration de l'espèce marquée à tout temps ultérieur, si D et p étaient connus. Un programme, développé à l'Unité 595 de l'INSERM, permet de simuler les profils correspondant aux temps expérimentaux disponibles et de rechercher le coefficient de diffusion, D , et la proportion de molécules mobiles, p , qui permettent le meilleur accord entre les profils prédits par le modèle et les profils mesurés sur toute la durée de l'observation [Picart *et al.* 2005].

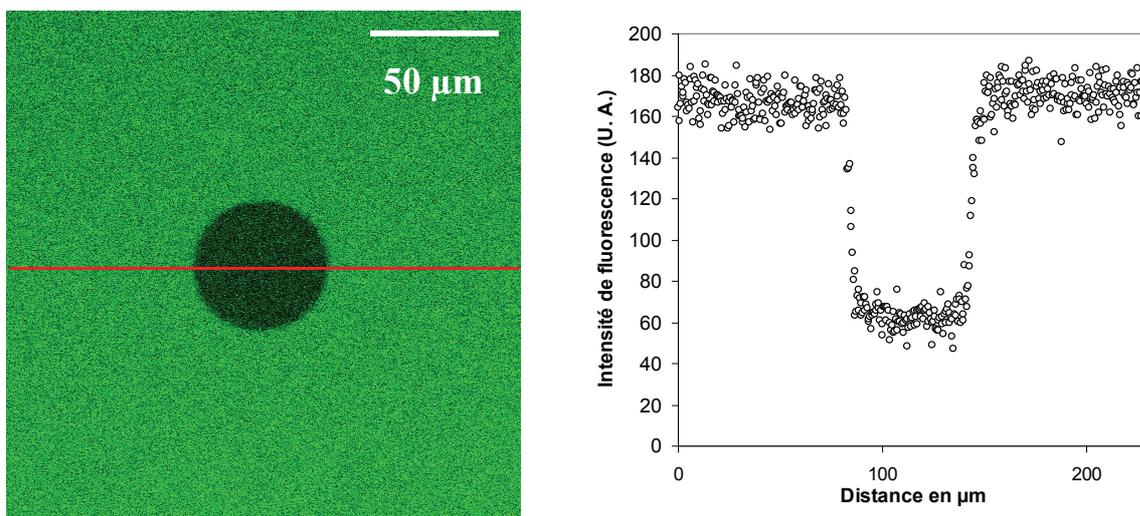


Figure 2.3.2 – 2 : Obtention des profils de fluorescence. Image obtenue en CLSM à partir d'un film multicouche $(PLL - HA)_{24} - PLL^{FITC}$ montrant la zone circulaire blanchie et la ligne le long de laquelle est mesurée l'intensité lumineuse (à gauche) A titre d'exemple, le profil obtenu 10 s après la fin de la phase de blanchiment est représenté sur la partie droite.

- **Expériences alternatives**

L'analyse des coefficients de diffusion d'espèces présentes au sein d'un film multicouche n'est pas requise systématiquement. Souvent, nous n'avons besoin que de renseignements qualitatifs sur la présence ou non d'un phénomène de diffusion. Dans ce cas, nous nous sommes contentés de tracer les profils de fluorescence et d'observer l'évolution entre les profils de début (immédiatement après le photoblanchiment) et de fin d'expérience (un temps long après le photoblanchiment). Ainsi, nous constatons la présence ou non de diffusion à l'échelle du temps de l'expérience.

2.4 Microbalance à cristal de quartz

La microbalance à cristal de quartz a été développée à la fin des années 1950 pour contrôler et mesurer la masse d'un film métallique déposé sur le cristal de quartz [Sauerbrey 1959]. Cette technique est basée sur la variation de la fréquence de résonance du cristal en fonction de la masse du film 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 [Nomura and Okuhara 1982]. Cette extension des possibilités de l'instrument nécessite outre la mesure des fréquences de résonance, celle de l'amortissement des vibrations dû à la dissipation de l'énergie dans le film déposé et le liquide environnant. Dès lors, elle a été nommée microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation, QCM-D). La microbalance à cristal de quartz a ainsi permis d'étendre les mesures à de nombreux autres domaines d'études, notamment pour décrire les processus d'adsorption de protéines et de vésicules sur diverses surfaces [Rodahl *et al.* 1997], ou encore pour mesurer l'adhésion et l'étalement de cellules sur des surfaces d'oxydes métalliques [Modin *et al.* 2006].

2.4.1 Principe de mesure de la microbalance à cristal de quartz

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 correspondant au dépôt d'un film. Les matériaux piézoélectriques, comme le quartz, se déforment sous l'action d'un champ électrique et réciproquement une déformation du matériau génère une différence de potentiel.

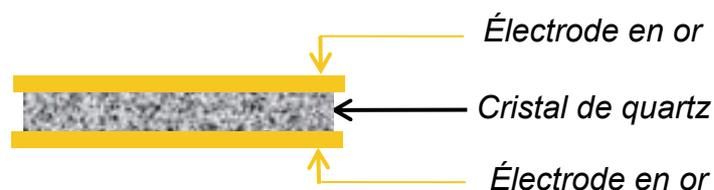


Figure 2.4.1 – 1 : Schéma d'un cristal de quartz pour microbalance

La lame de quartz est intercalée entre deux minces couches d'or qui servent d'électrodes (figure 2.4.1 – 1). En appliquant une tension alternative 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. 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, de masse M définie par :

$$M = \frac{m_q}{2} \quad (\text{éq 2.4.1 – 1})$$

où m_q est la masse du cristal [Mecea 1993]. La pulsation de résonance Ω_r de l'oscillateur non amorti peut s'écrire :

$$\Omega_r = \sqrt{\frac{k}{M}} \quad (\text{éq 2.4.1 – 2})$$

où k est la constante de raideur du cristal. Le dépôt d'un film parfaitement solidaire du cristal, de masse m , induit une augmentation de la masse totale de l'oscillateur dont la nouvelle pulsation de résonance ω_r s'écrit:

$$\omega_r = \sqrt{\frac{k}{M+m}} \approx \Omega_r \left(1 - \frac{m}{2M}\right) \quad (\text{éq 2.4.1 – 3})$$

La différence de pulsation de résonance s'exprime sous la forme :

$$\Delta\omega = \frac{-m\Omega_r}{2M} \quad (\text{éq 2.4.1 – 4})$$

La différence de fréquence s'écrit donc de la manière suivante (relation de Sauerbrey) :

$$\Delta f = \frac{-mf_r}{2M} = -\frac{m}{C} \quad (\text{éq 2.4.1 – 5})$$

où C est la constante de Sauerbrey définie par [Sauerbrey 1959]:

$$C = \frac{2M}{f_r} \quad (\text{éq 2.4.1 – 6})$$

Le principe de la mesure est donc de suivre l'évolution de la fréquence de résonance au cours du temps, soit lors du dépôt des polyélectrolytes dans notre cas. On peut ainsi déterminer la masse du film déposé à la surface du cristal (figure 2.4.1 – 2). L'augmentation de la masse déposée est contrôlée en suivant l'évolution des harmoniques d'ordre ν ($\nu = 1, 3, \dots$) de la fréquence de résonance du cristal :

$$m = -C \frac{\Delta f_\nu}{\nu} \quad (\text{éq 2.4.1 – 7})$$

Les expressions précédentes ne sont valables que pour un cristal de quartz placé dans le vide ou dans l'air.

La relation de Sauerbrey peut s'appliquer de façon approchée à un dépôt solide au contact d'un liquide, si la dissipation d'énergie y est suffisamment faible [Rodahl and Kasemo 1996]. Si cette condition est satisfaite, les rapports $\Delta f_v/v$ sont indépendants du numéro de l'harmonique, v .

Les films multicouches que nous étudions sont très hydratés et se comportent généralement comme des gels lorsqu'ils deviennent épais. L'estimation réaliste de la masse déposée à la surface du cristal ne relève alors plus de l'usage de la relation de Sauerbrey. Il devient ainsi indispensable d'exploiter l'information contenue dans la phase de relaxation de l'oscillation du cristal (figure 2.4.1 – 2), c'est-à-dire le facteur de dissipation, D , relié au temps caractéristique d'amortissement des oscillations après arrêt de la tension excitatrice du cristal.

Etablir des relations entre les caractéristiques physiques d'un film (module élastique de cisaillement, viscosité de cisaillement, masse volumique et épaisseur) reposant sur un cristal dans un environnement liquide et les fréquences de résonance et les facteurs de dissipation mesurés exige une modélisation relativement complexe que nous ne décrivons pas ici, étant donné que la QCM-D a été un instrument que nous n'avons utilisé qu'occasionnellement. Une description très détaillée, qui reprend et généralise le travail de Voinova *et al.* [Voinova *et al.* 1999], sera disponible dans un ouvrage à paraître en 2007 [Lavalley *et al.* 2007 (à paraître)].

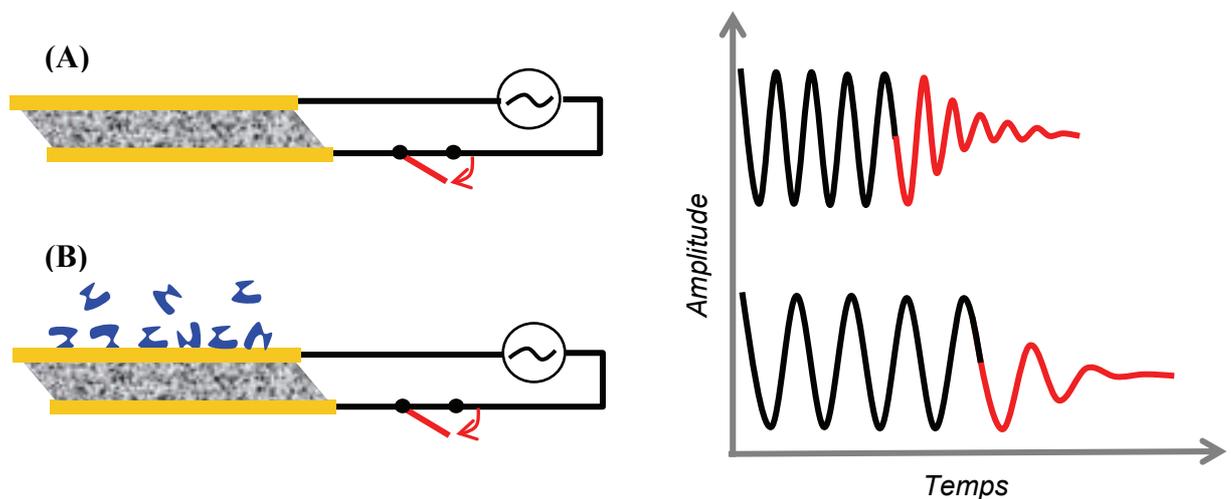


Figure 2.4.1 – 2 : **(A)** Le cristal en contact avec le solvant (solution aqueuse de NaCl, par exemple) mis sous tension oscille à sa fréquence de résonance (courbe noire). Après coupure de l'excitation électrique, l'oscillation est amortie (courbe rouge). **(B)** Lors du dépôt d'objets (chaînes de polyélectrolytes dissous dans le solvant, par exemple) sur le cristal (en bleu) et pendant la mise sous tension, la fréquence de résonance du cristal diminue (courbe noire). Après la coupure de l'excitation, on remarque un amortissement plus rapide dû à la dissipation d'énergie supplémentaire par rapport à la situation (A), engendrée par le dépôt qui se comporte comme un milieu viscoélastique.

2.4.2 Dispositif expérimental

L'appareil que nous avons utilisé est de la marque Q-Sense (Q-Sence AB, Göteborg, Suède) et du 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). La constante de Sauerbrey des cristaux utilisés est égale à $17.7 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{Hz}^{-1}$.

Une expérience de QCM consiste à construire *in situ* un film multicouche par une injection alternée des solutions de polycations et de polyanions (8 minutes d'adsorption suivie de 8 minutes de rinçage). Le volume injecté est de l'ordre de 2 mL. La température de mesure est fixée à 25°C. Les solutions de polyélectrolytes et de rinçage sont systématiquement dégazées pour éviter la formation de bulles d'air dans la cellule de mesure. Avant chaque expérience, le cristal et la cellule de mesure sont nettoyés avec une solution de Hellmanex (détergent anionique) à 2% puis une solution d'acide chlorhydrique 0.1 M pendant une demi-heure pour chaque solution.

Bibliographie

- D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, and W. W. Webb. **1976** Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.* 16:1055-1069.
- A. Boyde. **1988**. Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. *Scanning* 10:128-138.
- J. Davoust, P. F. Devaux, and L. Leger. **1982**. Fringe pattern photobleaching, a new methode for the measurement of transport-coefficients of biological macromolecules. *EMBO J.* 1:1233 - 1238.
- P. Gribbon, and T. E. Hardingham. **1998**. Macromolecular diffusion of biological polymers measured by confocal fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys. J.* 75:1032-1039.
- P. Lavalle, B. Senger, and P. Schaaf. **2007 (à paraître)**. Nanobiotechnologies, Paris.
- J. L. McGrath, J. H. Hartwig, Y. Tardy, and C. F. Dewey, Jr. **1998**. Measuring actin dynamics in endothelial cells. *Microsc. Res. Tech.* 43:385-394.
- V. Mecea. **1993**. Loaded vibrating quartz sensors *Sens. Actuators, A* 40:1-27.
- T. K. Meyvis, S. C. De Smedt, P. Van Oostveldt, and J. Demeester. **1999**. Fluorescence recovery after photobleaching: a versatile tool for mobility and interaction measurements in pharmaceutical research. *Pharm. Res.* 16:1153-1162.
- C. Modin, A. L. Stranne, M. Foss, M. Duch, J. Justesen, J. Chevallier, L. K. Andersen, A. G. Hemmersam, F. S. Pedersen, and F. Besenbacher. **2006**. QCM-D studies of attachment and differential spreading of pre-osteoblastic cells on Ta and Cr surfaces. *Biomaterials* 27:1346-1354.

- T. Nomura, and M. Okuhara. **1982**. Frequency shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids. *Anal. Chim. Acta* 142:281-284.
- R. Peters, J. Peters, K. H. Tews, and W. Bahr. **1974**. A microfluorimetric study of translational diffusion in erythrocyte membranes. *Bioch. Biophys. Acta* 367:282-294.
- C. Picart, J. Mutterer, Y. Arntz, J.-C. Voegel, P. Schaaf, and B. Senger. **2005**. Application of fluorescence recovery after photobleaching to diffusion of a polyelectrolyte in a multilayer film. *Microsc. Res. Tech.* 66:43-57.
- M. Rodahl, F. Hook, C. Fredriksson, C. A. Keller, A. Krozer, P. Brzezinski, M. Voinova, and B. Kasemo. **1997**. Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion. *Faraday Discuss.*:229-246.
- M. Rodahl, and B. Kasemo. **1996**. On the measurement of thin liquid overlayers with the quartzcrystal microbalance. *Sens. Actuators, A* 54:448-456.
- G. Sauerbrey. **1959**. Verwendung von Schwingquartzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Z. Phys.* 155:206-222.
- B. A. Smith, and H. M. McConnell. **1978**. Determination of molecular motion in membranes using periodic pattern photobleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75:2759-2763.
- L. Song, E. J. Hennink, I. T. Young, and H. J. Tanke. **1995**. Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 68:2588-2600.
- L. Song, C. A. Varma, J. W. Verhoeven, and H. J. Tanke. **1996**. Influence of the triplet excited state on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy. *Biophys. J.* 70:2959-2968.
- D. M. Soumpasis. **1983** Theoretical-analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys. J.* 41:95-97.

- L. Szyk, P. Schaaf, C. Gergely, J. C. Voegel, and B. Tinland. **2001**. Lateral mobility of proteins adsorbed on or embedded in polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 17:6248-6253.
- M. V. Voinova, M. Rodahl, M. Jonson, and B. Kasemo. **1999**. Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces : continuum mechanics approach. *Phys. Scr.* 59:391-396.

Chapitre 3 Echange et diffusion dans le film poly(L-lysine) – acide hyaluronique

3.1 Cadre de l'étude	94
3.2 Phénomènes d'échange	97
3.2.1 <i>Cinétique d'adsorption de la poly(L-lysine)</i>	97
3.2.2 <i>Dosage de la PLL^{FITC} dans un film</i>	99
3.2.3 <i>Discussion</i>	104
3.3 Diffusion de polyélectrolytes dans le film poly(L-lysine) – acide hyaluronique	106
3.3.1 <i>Etude de solutions de molécules fluorescentes</i>	106
3.3.2 <i>Analyse des films marqués en surface</i>	110
3.3.3 <i>Analyse des films marqués en cours de construction</i>	114
3.3.4 <i>Discussion</i>	119
3.4 Conclusion du chapitre	122
<i>Bibliographie</i>	124

3.1 Cadre de l'étude

Deux types de films multicouches sont décrits dans la littérature : ceux dont la masse augmente linéairement [Decher 1997] et ceux dont la masse augmente exponentiellement [Elbert *et al.* 1999] avec le nombre de couches déposées. Dans ce chapitre, nous présentons un travail portant sur le système poly(L-lysine) – acide hyaluronique (PLL – HA), un exemple bien connu de films à croissance exponentielle [Picart *et al.* 2001].

La croissance exponentielle a été attribuée à la capacité d'au moins l'un des polyélectrolytes à diffuser dans toute l'épaisseur du film lors de son dépôt, et à diffuser vers l'extérieur du film lors du dépôt de l'autre polyélectrolyte [Picart *et al.* 2001]. La preuve expérimentale du phénomène de diffusion a été obtenue par microscopie confocale : des chaînes de poly(L-lysine) marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (PLL^{FITC}) déposées sur un film (PLL – HA) ont diffusé dans toute l'épaisseur du film [Picart *et al.* 2002]. Cependant, après le dépôt d'une couche supplémentaire d'acide hyaluronique, la fluorescence verte se maintenait dans le film, prouvant ainsi que toutes les chaînes de PLL^{FITC} emmagasinées dans le film n'avaient pas diffusé vers l'extérieur du film. Cette observation a été expliquée par un échange entre les chaînes de PLL constituant le film et les chaînes de PLL^{FITC} ayant diffusé dans le film. Ce phénomène est compatible avec la croissance exponentielle qui ne requiert qu'un nombre de chaînes de PLL sortant du film qui soit proportionnel à l'épaisseur du film, que ces chaînes soient marquées ou non.

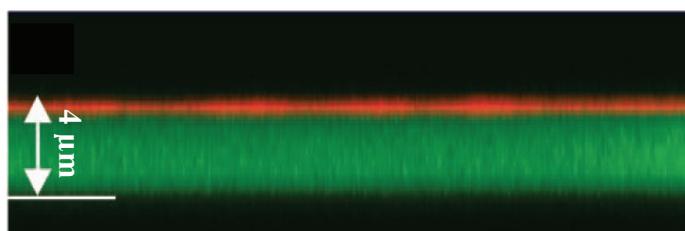


Figure 3.1 – 1 : Observation en microscopie confocale de la section en z d'un film $(\text{PLL} - \text{HA})_{18} - \text{PLL}^{\text{FITC}} - \text{HA}^{\text{TR}} - \text{PLL}$. La fluorescence verte est émise par la PLL^{FITC} et la fluorescence rouge est émise par le HA^{TR} [Picart *et al.* 2002].

Dans la première partie de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à ce phénomène d'échange entre les chaînes de PLL marquées déposées sur le film et les chaînes de PLL non marquées ayant participé à la construction de la multicouche. La cinétique d'adsorption a été examinée pour différentes concentrations de la solution de PLL^{FITC} , en vue de déterminer le

temps nécessaire pour atteindre la saturation du film en PLL^{FITC}. L'analyse de la fluorescence d'un film où seul le dernier dépôt implique la PLL marquée a permis de quantifier la concentration de la PLL^{FITC} marquant toute l'épaisseur du film. Celle-ci a ensuite été comparée à la concentration de la PLL^{FITC} d'un film où toutes les couches de PLL sont marquées.

Les films à croissance exponentielle suscitent un grand intérêt car ils peuvent être utilisés comme réservoirs à biomolécules (protéines, peptides, médicaments). Récemment au laboratoire, il a été montré que deux réservoirs (PLL – HA) peuvent être séparés par une barrière (PDADMAC – PSS). Cette barrière a la capacité de s'ouvrir et de se fermer par étirement mécanique du film. En configuration ouverte, les molécules de PLL peuvent diffuser d'un compartiment à l'autre [Mertz *et al.* 2007].

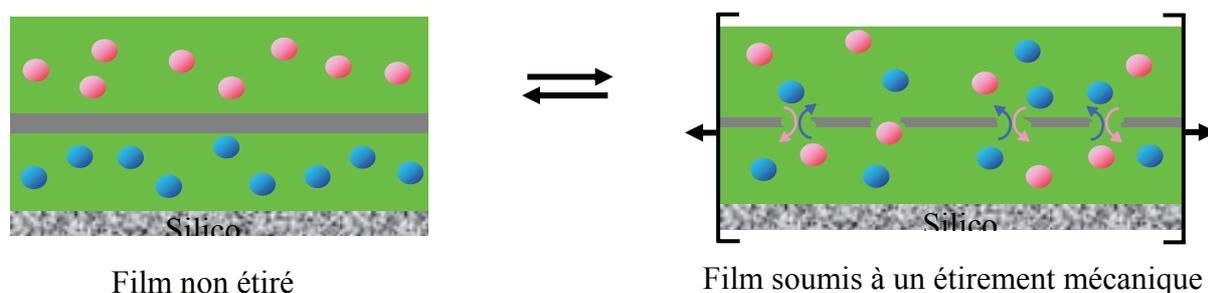


Figure 3.1 – 2 : Schéma d'un film multicouche de construction (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} – (PSS – PDADMAC)₅ – (HA – PLL)₃₀ – HA – PLL^{Rho} déposé sur un substrat en silicone. Le trait gris foncé correspond à la barrière PSS – PDADMAC, qui forme sous étirement des nanovalves permettant la diffusion des chaînes de poly(L-lysine) marquées d'un réservoir (PLL – HA) à l'autre [Mertz *et al.* 2007].

Une connaissance plus précise des phénomènes de diffusion pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de la croissance exponentielle et comment les molécules diffusent au sein de différentes organisations de films multicouches. Dans la seconde partie de ce chapitre, nous nous sommes donc concentrés sur la diffusion de la PLL^{FITC} dans le film à croissance exponentielle (PLL – HA). Un travail avait déjà été réalisé au laboratoire sur ce système [Picart *et al.* 2005]. Les expériences de FRAP par photoblanchiment d'une zone unique avaient été réalisées par microscopie confocale selon la méthode décrite au paragraphe 2.3.2 sur des films (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} et (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} – (HA – PLL)₂₄. Ces expériences avaient permis d'identifier une population mobile et une population immobile de PLL^{FITC} dans le film. Les résultats sur la fraction mobile de PLL^{FITC} ainsi que son coefficient de diffusion pour les deux types d'échantillons sont résumés dans le tableau 3.1 – 1.

	Coefficient de diffusion (cm ² /s)	Fraction de chaînes de PLL mobiles
(PLL – HA) ₂₄ – PLL ^{FITC}	2.2 10 ⁻⁹	39%
(PLL – HA) ₂₄ – PLL ^{FITC} – (HA – PLL) ₂₄	3.8 10 ⁻¹⁰	40%

Tableau 3.1 – 1 : Estimation du coefficient de diffusion et de la proportion de chaînes mobiles de PLL^{FITC} dans deux types de films (PLL – HA) marqués à différentes étapes de la construction [Picart *et al.* 2005].

Cette technique de photoblanchiment d'une zone unique n'est cependant pas assez fine pour permettre de distinguer plusieurs populations mobiles. De plus, les incertitudes expérimentales font que seules des estimations des ordres de grandeur de la fraction mobile et du coefficient de diffusion correspondant sont possibles. C'est pourquoi nous avons utilisé une technique de mesure de recouvrement de fluorescence basée sur un dispositif à interférences qui a été décrite au paragraphe 2.3.1. Cette technique FRAP est plus précise que la méthode par microscopie confocale et permet notamment :

- de vérifier que le recouvrement de fluorescence suit une loi de diffusion brownienne,
- de discriminer différentes populations mobiles si elles existent,
- de déterminer avec précision les coefficients de diffusion.

La technique a été initialement testée sur des polyélectrolytes fluorescents mis en solutions et qui servent à marquer nos échantillons. Les résultats ont permis de valider la configuration expérimentale. Les résultats de Picart *et al.* suggèrent que la position du dépôt de PLL^{FITC} influe significativement sa mobilité dans le film. C'est pourquoi deux types de films multicouches ont été étudiés : les films dont la dernière couche déposée est une couche de poly(L-lysine) marquée, ainsi que les films dont une couche de PLL en cours de construction a été remplacée par une couche de PLL^{FITC}. Pour ce type d'échantillon, la position du dépôt de la couche de PLL^{FITC} a été modulée afin de contrôler l'influence d'un enfouissement plus ou moins profond sur la mobilité des chaînes de PLL^{FITC}. Le vieillissement de ces échantillons sur 5 jours a aussi été examiné. En fin de chapitre, une interprétation des résultats est proposée concernant l'organisation des multicouches (PLL – HA).

3.2 Phénomènes d'échange

Ce travail a été réalisé afin de quantifier le nombre de chaînes de PLL d'un film (PLL – HA)₃₀ remplacées lors du dépôt de PLL^{FITC} sur le film, à concentration variable de PLL^{FITC} dans la solution. L'analyse par microscopie confocale de l'intensité de fluorescence des films due au dépôt de PLL^{FITC} doit permettre de donner un caractère quantitatif aux observations sur l'échange des chaînes de PLL décrites par Picart *et al.* [Picart *et al.* 2002].

Les films (PLL – HA) ont été construits à partir de solutions aqueuses de polyélectrolytes concentrées à 1 mg / mL en présence de NaCl à 0.15 M, tandis que la concentration des solutions de PLL^{FITC} était variable suivant le but de chaque expérience. Le pH de toutes les solutions (polyélectrolytes et rinçage) a été ajusté à 6.2 avec une solution de 0.01 M de NaOH.

Les expériences que nous avons réalisées ont cherché à répondre à deux préoccupations :

- La cinétique d'adsorption de la PLL^{FITC} déposée sur une multicouche (PLL – HA)₃₀ a été étudiée pour différentes concentrations des solutions de PLL^{FITC}. Cela a permis de déterminer le temps au bout duquel le film n'emmagasinait plus de chaînes de PLL^{FITC}, donc où (i) le film s'était rempli de PLL^{FITC} libres et (ii) toutes les chaînes échangeables de PLL du film avaient été remplacées par des chaînes de PLL^{FITC}, sous l'hypothèse que le nombre de chaînes de PLL^{FITC} présentes initialement dans la solution était en fort excès par rapport au nombre de ces chaînes introduites dans le film.
- La quantité de chaînes de PLL^{FITC} dans un film (PLL^{FITC} – HA)₃₀ – PLL^{FITC}, c'est-à-dire construit exclusivement avec la forme marquée de la PLL, a été comparée à la quantité de chaînes de PLL^{FITC} contenues dans un film (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} en vue de connaître la fraction de chaînes de PLL remplacées par des chaînes de PLL^{FITC}. Il faut noter que la fluorescence dans le deuxième film est due à la nouvelle couche (HA – PLL^{FITC}) formée.

3.2.1 Cinétique d'adsorption de la poly(L-lysine)

La cinétique d'adsorption de la PLL^{FITC} déposée sur un film (PLL – HA)₃₀ a été analysée pour trois concentrations de la solution (0.5, 1 et 4 mg / mL) (figure 3.2.1 – 1). Les

mesures de l'intensité de fluorescence ont été réalisées par microscopie confocale : chaque point représenté sur la figure correspond à l'image de microscopie d'une zone différente de l'échantillon, et l'intensité a été mesurée selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.4.

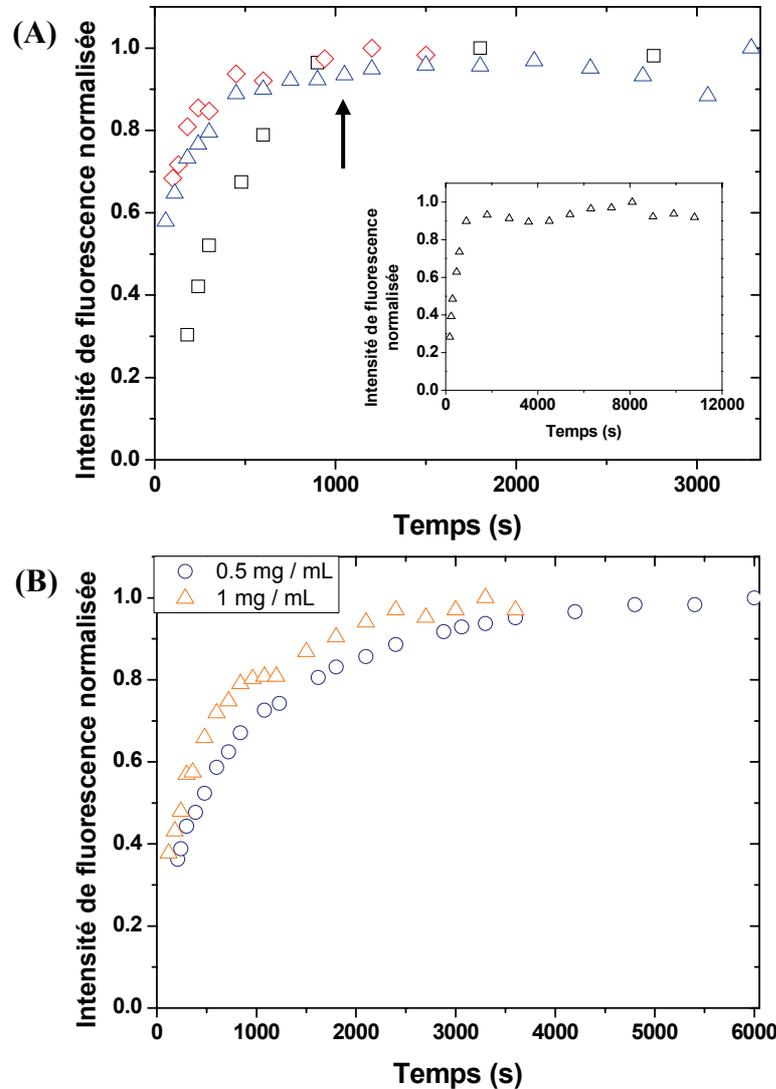


Figure 3.2.1 – 1 : (A) Cinétique d'adsorption de la PLL^{FITC} pour une solution de concentration 4 mg / mL déposée sur d'un film (PLL – HA)₃₀. Les trois symboles correspondent à trois expériences indépendantes. Le graphique inséré correspond au suivi de la cinétique pendant plus de 3 heures. (B) Cinétique d'adsorption de la PLL^{FITC} pour une solution de concentration de 0.5 mg / mL (○) et 1 mg / mL (△) déposée sur d'un film (PLL – HA)₃₀.

L'étude des différentes cinétiques révèle que :

- pour toutes les expériences, l'intensité de fluorescence atteint un plateau,
- le temps pour atteindre ce plateau est d'autant plus court que la concentration de la solution est importante. A 4 mg / mL, ce temps est de l'ordre de 1000 s, à 1 mg / mL il est de l'ordre de 2500 s et à 0.5 mg / mL il est de l'ordre de 5000 s.

- la cinétique d'adsorption d'une solution à 4 mg / mL montre que le plateau se maintient pendant presque 4 heures, démontrant qu'aucun processus impliquant le remplacement d'une chaîne de PLL par une chaîne de PLL^{FITC} ne se produit plus dans le film à cette échelle de temps. Tous les phénomènes d'échange se sont réalisés et le film est donc saturé en PLL^{FITC} au bout d'environ 1000 secondes. Les fluctuations observées sur ce plateau sont très probablement dues à l'hétérogénéité de l'échantillon ou à des fluctuations du laser d'excitation.
- le premier point est mesuré au bout de 100 secondes environ : l'intensité de fluorescence du film mesurée peut correspondre jusqu'à 60% de l'intensité atteinte au plateau. Au bout de ce temps, le film apparaît totalement marqué en vert. Cela indique que des chaînes de PLL^{FITC} ont diffusé dans toute l'épaisseur du film. Celles-ci peuvent s'échanger avec des chaînes de PLL non marquées constituant le film. Ces dernières, devenues libres, seraient alors progressivement remplacées par des chaînes de la solution, ce qui contribue à l'augmentation de l'intensité de la fluorescence du film jusqu'à l'apparition du plateau.

Les résultats de ce premier paragraphe ont permis d'obtenir avec précision la cinétique d'adsorption de la PLL^{FITC} sur un film constitué de 30 paires de couches (PLL – HA)₃₀. Dans le paragraphe suivant, nous allons décrire une méthode pour convertir les intensités de fluorescence en concentrations de PLL^{FITC} dans les films.

3.2.2 Dosage de la PLL^{FITC} dans un film

L'estimation de la fraction échangeable de PLL dans une multicouche peut se faire par l'analyse de l'intensité de fluorescence de multicouches sur lesquelles au moins une couche de PLL^{FITC} a été déposée. L'intensité de fluorescence d'un film est reliée à la concentration dans le film de l'espèce fluorescente (dans ce cas la PLL^{FITC}). Nous avons donc cherché à établir une loi de conversion intensité / concentration à partir de l'examen de solutions de PLL^{FITC} au microscope confocal.

L'analyse de l'intensité de fluorescence du film (PLL^{FITC} – HA)₃₀ – PLL^{FITC} est supposée donner la concentration maximale de PLL dans un film (PLL – HA). Cette concentration maximale est cependant dépendante des conditions de construction du film : temps de dépôt, concentration des solutions de polyélectrolytes. La mesure de l'intensité de

fluorescence des films (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} permet ainsi de déterminer la concentration de chaînes de PLL^{FITC} due au seul dernier dépôt par rapport à la quantité totale de chaînes de PLL dans un film.

- **Calibration du microscope confocal**

L'analyse des intensités de fluorescence s'est déroulée de la manière suivante :

- Une droite de conversion de l'intensité de fluorescence d'un échantillon en concentration en PLL^{FITC} a été réalisée à partir d'une gamme de solutions de PLL^{FITC} de concentrations connues. Cette étape a permis de calibrer le microscope confocal et de vérifier la linéarité du détecteur. Le microscope a ainsi pu être utilisé comme appareil de mesure d'intensité de fluorescence de la PLL^{FITC}. Comme cela a été mentionné au paragraphe 2.2.4, le résultat de la mesure de l'intensité de fluorescence est fourni en niveau de gris, compris entre 0 et 255. Ce résultat dépend de la sensibilité du détecteur. De fait, chaque droite de calibration n'est valable que pour une sensibilité donnée du détecteur.
- La conversion des intensités de fluorescence des films en concentration en PLL^{FITC} se fait ensuite en reportant la valeur en niveau de gris sur la droite de calibration. Pour les films dont l'intensité de fluorescence sature le détecteur à la sensibilité utilisée pour réaliser la calibration, il est obligatoire de réaliser une nouvelle droite de calibration à une sensibilité plus faible pour laquelle il n'y a plus de saturation.

La calibration du microscope confocal avec des solutions de PLL^{FITC} de concentrations 0.1 ; 0.5 ; 1 ; 2 ; 4 et 5 mg / mL donne la droite suivante (figure 3.2.2. – 1) :

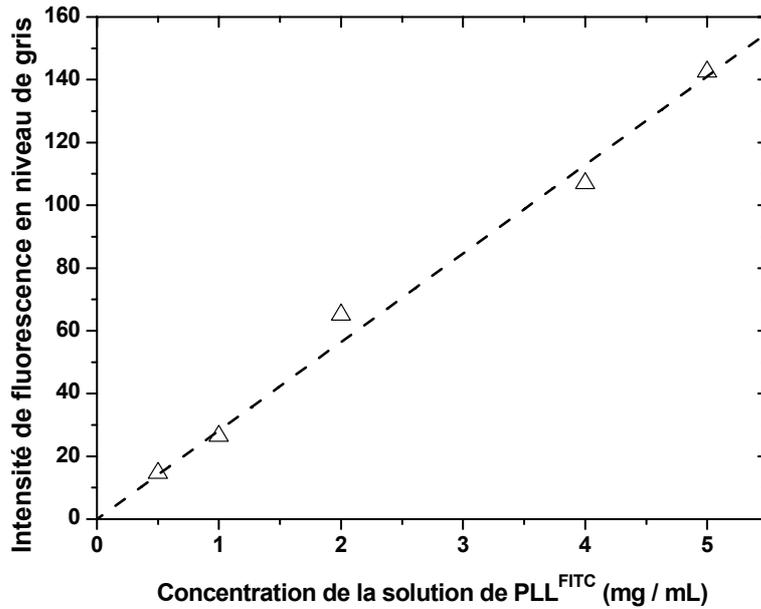


Figure 3.2.2 – 1 : Intensité de fluorescence émise par des solutions de PLL^{FITC} de différentes concentrations mesurée en microscopie confocale.

• Résultats expérimentaux

Une fois la calibration du microscope confocal réalisée, des solutions de PLL^{FITC} de 2, 4 et 5 mg / mL ont été déposées pendant 1, 5, 15 et 50 minutes sur un film (PLL – HA)₃₀ avant le rinçage final avec la solution de NaCl. Le temps de 50 minutes est suffisant pour les trois concentrations utilisées pour saturer le film en PLL^{FITC} si l'on se réfère aux résultats reportés sur la figure 3.2.1 – 1. Le dépôt de solutions concentrées (2, 4 et 5 mg / mL) permet d'une part de réduire les temps d'expérience et d'autre part d'assurer le contact de la multicouche avec un réservoir virtuellement infini de chaînes de polyélectrolytes, condition indispensable pour l'étude des phénomènes d'échange. Compte tenu du volume de solution qu'il est possible de déposer au-dessus du film, seules des solutions concentrées permettent de satisfaire cette condition.

La figure 3.2.2 – 2 présente l'estimation (après le rinçage) de la concentration en PLL^{FITC} dans la multicouche en fonction du temps de dépôt, pour différentes concentrations de la solution déposée. Les observations principales sur ces expériences sont :

- le dépôt de ces trois solutions de concentrations différentes ne modifie pas la concentration finale de PLL^{FITC} dans le film quel que soit le temps de dépôt envisagés. Les cinétiques sont donc identiques.
- l'évolution de la concentration dans le film en fonction du temps de dépôt semble suivre l'allure de la cinétique d'adsorption (cf. figure 3.2.1 – 1), malgré

l'étape de rinçage. Celle-ci ne modifie donc pas la quantité de PLL^{FITC} dans le film de manière appréciable.

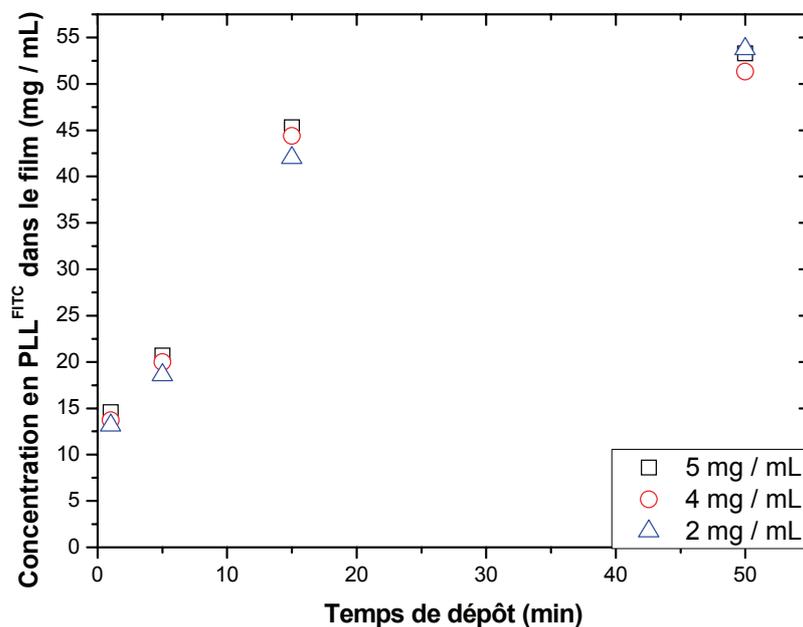


Figure 3.2.2 – 2 : Concentration estimée en PLL^{FITC} d'un film (PLL – HA)₃₀ pour différents temps de dépôt et différentes concentrations de la solution de PLL^{FITC} déposée, après rinçage (10 minutes) avec une solution de NaCl à 0.15 M.

Le film (PLL^{FITC} – HA)₃₀ – PLL^{FITC} a été construit suivant le même protocole expérimental que le film (PLL – HA)₃₀, c'est-à-dire à partir de solutions de polyélectrolytes concentrées à 1 mg / mL et à 0.15 M en NaCl, déposées pendant 10 minutes. Ce temps est suffisant pour que les chaînes libres de PLL^{FITC} diffusent dans toute l'épaisseur du film et le sature. L'analyse de l'intensité de fluorescence de ce film permet d'estimer la concentration totale en PLL^{FITC} à 140 mg / mL. Cette valeur correspond à la concentration maximale de PLL^{FITC} que le film peut atteindre compte tenu des conditions de construction. Ces résultats sont supposés représentatifs de la concentration en PLL d'un film (PLL – HA)₃₀ – PLL. On peut comparer la concentration maximale aux résultats précédents (figure 3.2.2 – 2) concernant les concentrations en PLL^{FITC} des films (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC}. Cela permet de déterminer la contribution des chaînes apportées lors du dernier dépôt de PLL^{FITC} (figure 3.2.2 – 3) à la concentration totale de chaînes de PLL dans le film.

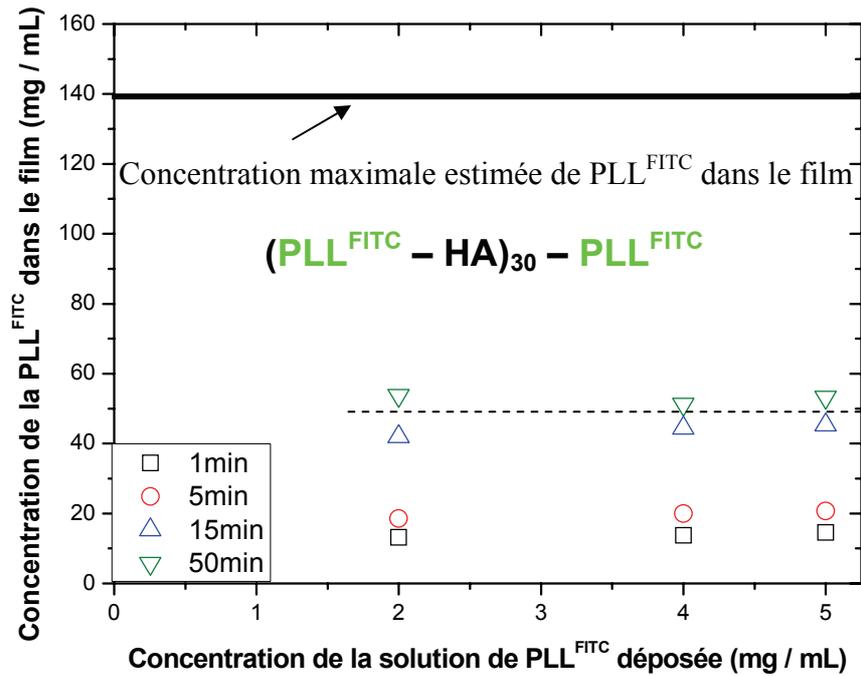


Figure 3.2.2 – 3 : Comparaison de la concentration en PLL^{FITC} d'un film (PLL^{FITC} - HA)₃₀ - PLL^{FITC} et de films (PLL - HA)₃₀ - PLL^{FITC} pour lesquels le temps de dépôt et la concentration de la solution de PLL^{FITC} déposée ont été modulés.

La saturation en PLL^{FITC} d'un film constitué de 30 paires de couches de (PLL - HA) par le dépôt d'une couche de PLL^{FITC} amène à une concentration d'environ 50 mg / mL dans le film, ce qui correspond à environ 35% de la concentration maximale estimée de PLL dans un tel film. Dans ces 35%, on trouve les chaînes de PLL^{FITC} qui se sont adsorbées, celles qui ont diffusé dans toute l'épaisseur du film et enfin celles qui se sont échangées avec des chaînes de PLL originellement complexées dans le film.

Dans la troisième partie de ce chapitre, il sera montré que les chaînes libres de PLL^{FITC} représentent 20% de la quantité totale de chaînes de PLL^{FITC} déposées. D'après les résultats obtenus ci-dessus, 35% des chaînes de PLL du film sont apportés par le dernier dépôt ; la fraction de chaînes libres correspondrait donc à 7% du nombre total de chaînes de PLL. Ainsi, moins de 28% des chaînes de PLL constitutives du film auraient été remplacées par des chaînes de PLL^{FITC}. Une partie des chaînes de PLL^{FITC} participe en effet à la construction de la nouvelle couche.

3.2.3 Discussion

L'ensemble de cette étude repose sur l'hypothèse de l'équivalence de comportement dans les films multicouches de la PLL et de la PLL^{FITC}. Les informations du fournisseur des produits indiquent qu'il y a en moyenne 2.5 molécules de FITC (figure 3.2.3 – 1 (A)) par chaîne de poly(L-lysine). Chaque chaîne de masse molaire moyenne égale à 66 700 g/mol est constituée en moyenne de 500 monomères, et porte une charge positive par monomère (figure 3.2.3 – 1 (B)) car la fonction amine de chaque monomère est protonée au pH de travail (pH = 6.2). A ce pH, la fonction carboxylique de la FITC est déprotonée et se trouve sous la forme d'une fonction carboxylate portant alors une charge négative.

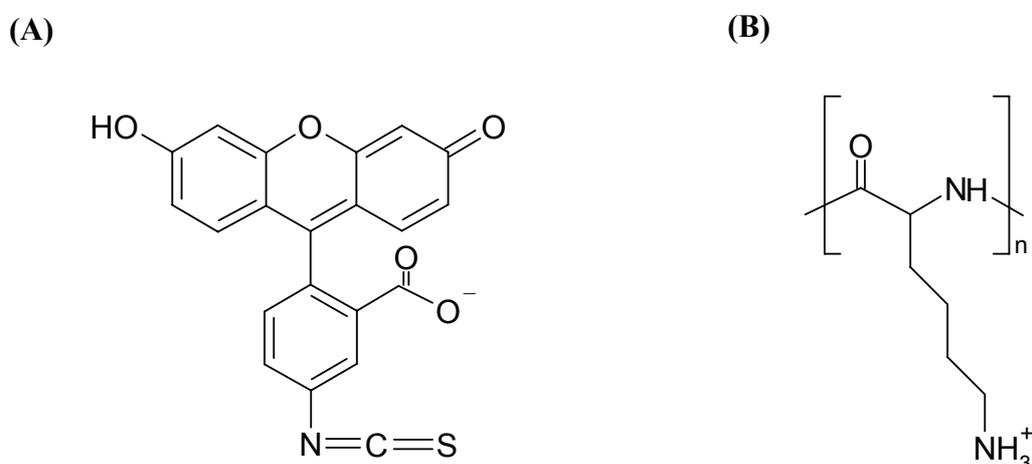


Figure 3.2.3 – 1 : Structure d'une molécule d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (A) et de la poly(L-lysine) (B) à pH = 6.2.

Le greffage des molécules de FITC à des chaînes de poly(L-lysine) se déroule en milieu basique (pH = 10). Quelques fonctions amines de chaque chaînes de PLL (en moyenne 2.5) vont se coupler à la fonction isothiocyanate de la FITC (figure 3.2.3 – 2). Il y a donc 2.5 charges positives qui disparaissent en moyenne de chaque chaîne de PLL, et qui sont remplacées par les charges négatives portées par les molécules greffées de FITC. Il y a donc au final une perte de 1% des charges positives de chaque chaîne (0.5% par greffage + 0.5% par annulation de charges). Nous avons supposé que ce faible taux de marquage n'impliquait pas de modification sur les chaînes de poly(L-lysine) autre que de les rendre détectables en microscopie confocale. Nous avons ainsi admis qu'un film (PLL^{FITC} – HA) se construisait de la même manière qu'un film (PLL – HA).

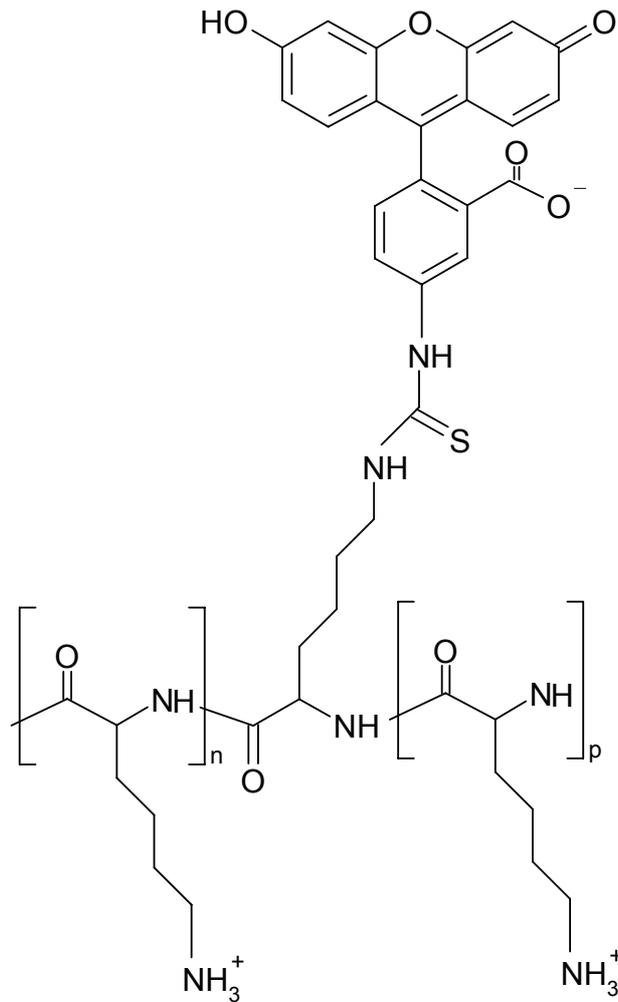


Figure 3.2.3 – 2 : Structure d'une chaîne de poly(L-lysine) greffée à l'isothiocyanate de fluorescéine. En moyenne, il y a 2.5 motifs de FITC par chaîne de poly(L-lysine).

3.3 Diffusion de polyélectrolytes dans le film poly(L-lysine) – acide hyaluronique

3.3.1 Etude de solutions de molécules fluorescentes

Nous avons présenté au paragraphe 2.3.1 la méthode de mesure du recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) au moyen d'un dispositif à interférences. Après le photoblanchiment, le profil de concentration de l'espèce fluorescente présente un motif périodique. Le principe de la mesure consiste à suivre la relaxation temporelle de l'amplitude de ce profil de concentration, c'est-à-dire la différence d'intensité de fluorescence entre les zones non blanchies et blanchies (figure 3.3.1 - 1). Cette relaxation est due à la diffusion des espèces fluorescentes des zones non blanchies vers les zones blanchies de l'échantillon. Au paragraphe 2.3.1, il a été démontré que la relaxation suivait une loi de type :

$$F(t) = A_0 + A_1 e^{-\frac{t}{\tau_q}} \quad (\text{éq 3.3.1 - 1})$$

où :

- A_0 correspond à la fraction immobile de la population fluorescente
- A_1 correspond à la fraction mobile de la population fluorescente
- τ_q est le temps caractéristique de recouvrement de fluorescence défini par :

$$\tau_q = (Dq_0^2)^{-1} \quad (\text{éq 3.3.1 - 2})$$

où :

- D est le coefficient de diffusion de l'espèce fluorescente
- $q_0 = \frac{2\pi}{i}$ correspond à la fréquence spatiale des franges et où i est la largeur de l'interfrange

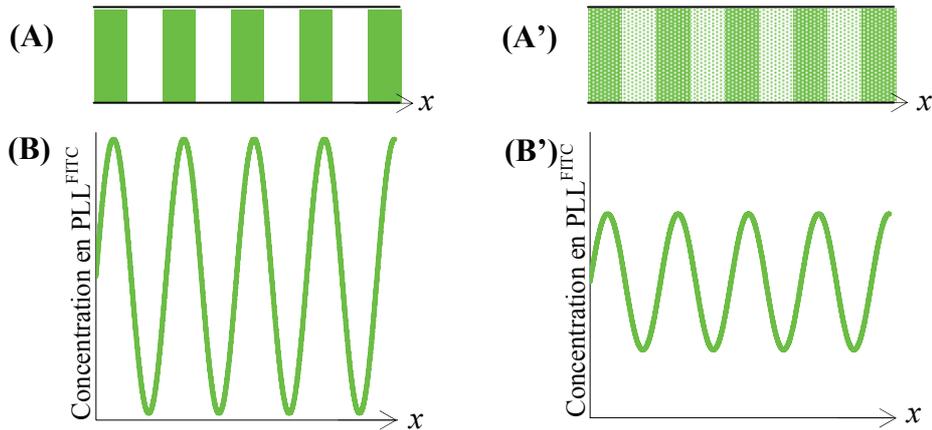


Figure 3.3.1 – 1 : Principe de la relaxation de l'amplitude du profil de concentration de la PLL^{FITC} dans la multicouche. Représentation de la concentration de la PLL^{FITC} dans la multicouche et tracé du profil de concentration immédiatement après le photoblanchiment (A) et (B) puis après plusieurs dizaines de secondes d'acquisition (A') et (B'). La schématisation par des crêneaux et des courbes sinusoïdales a été employée par souci de simplicité.

En réalisant plusieurs expériences à différentes valeurs d'interfrange, on obtient autant de temps caractéristiques τ_q . Le tracé de ces temps en fonction de l'inverse du carré de la fréquence spatiale q_0 , elle-même reliée à la valeur de l'interfrange i , permet ainsi d'obtenir le coefficient de diffusion de l'espèce fluorescente étudiée.

Nous avons cherché à mesurer le coefficient de diffusion de différentes molécules fluorescentes en solution en photoblanchissant un motif périodique :

- PLL^{FITC} (Masse molaire : 66 700 g/mol, produit commercialisé)
- PLL^{FITC} (Masse molaire : 300 000 g/mol, synthèse au laboratoire)
- HA^{FITC} (Masse molaire : 400 000 g/mol, synthèse au laboratoire)
- FITC (Masse molaire : 389 g/mol, produit commercialisé)

Ces expériences étaient importantes pour permettre de vérifier d'une part que le montage expérimental était adapté à la mesure du coefficient de diffusion des sondes fluorescentes utilisées au cours de l'étude, et d'autre part que la diffusion des chaînes était de nature brownienne.

La figure 3.3.1 – 2 montre une acquisition type pour ces échantillons. L'équation 3.3.1 – 1 modélise très bien la décroissance et permet d'obtenir le temps de décroissance τ_q . Le paramètre A_0 nul indique qu'il n'y a pas de population immobile ce qui était attendu pour des molécules en solution.

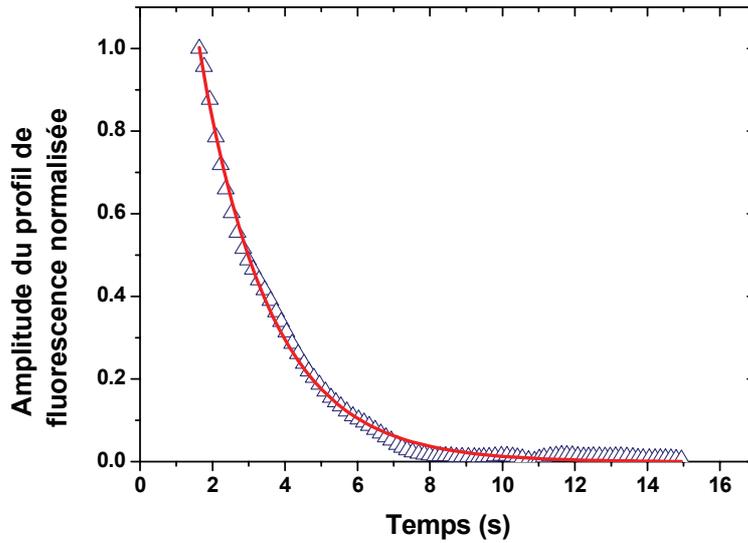


Figure 3.3.1 – 2 : Relaxation de l'amplitude du profil de concentration de la PLL^{FITC} en solution à 0.5 mg / mL après photoblanchiment d'un motif périodique (Δ). Dans cet exemple, $q_0 = 828 \text{ cm}^{-1}$ et l'ajustement des points expérimentaux par l'expression (3.3.1 – 1) donne pour temps caractéristique de décroissance $\tau_q = 1.9 \text{ s}$ (courbe rouge).

La figure 3.3.1 – 3 résume les résultats obtenus pour les deux solutions de PLL^{FITC} ainsi que pour la solution de HA^{FITC}. Chaque point correspond au temps moyen obtenu à partir de dix expériences pour une valeur donnée de l'interfrange i ou de q_0 . Le recouvrement de fluorescence a été étudié pour chaque solution pour trois valeurs de q_0 . Les faits importants qui ressortent de ces expériences sont les suivants :

- Un ajustement des temps caractéristiques moyens de recouvrement par l'équation 3.3.1 – 2 est possible, montrant ainsi que la diffusion des polyélectrolytes en solution est brownienne.
- Les valeurs des coefficients de diffusion obtenus sont du même ordre que celles données dans la littérature. Une seule population mobile a été détectée pour chaque solution. Cela indique que les solutions sont mono modes en masse molaire mais n'indique pas la dispersion de la masse molaire des chaînes de polyélectrolytes.

Ces résultats fourniront des points de comparaison pour les coefficients de diffusion des fractions mobiles de PLL^{FITC} dans les films.

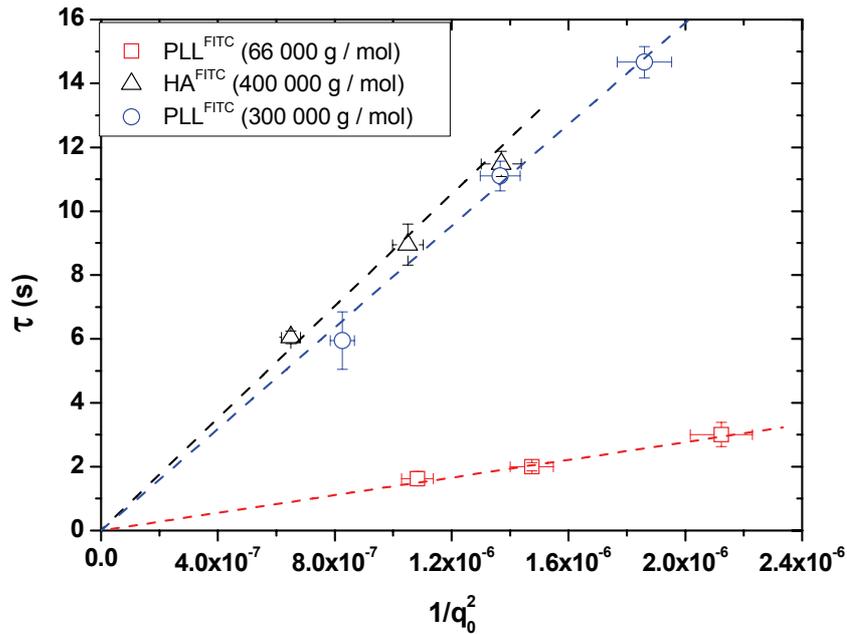


Figure 3.3.1 – 3 : Temps caractéristiques moyens de recouvrement de fluorescence en fonction de l'inverse du carré de la fréquence spatiale q_0 , elle-même reliée à la valeur de l'interfrange i . (□) PLL^{FITC} de masse molaire 66 000 g / mol (○) PLL^{FITC} de masse molaire 300 000 g / mol (Δ) HA^{FITC} de masse molaire 400 000 g / mol. Chaque temps correspond à la moyenne de dix mesures expérimentales. Les barres d'erreur sur les temps correspondent à l'erreur sur la moyenne des dix mesures. Les barres d'erreur sur $1/q_0^2$ sont liées à l'incertitude sur l'estimation de l'interfrange i .

Solution (0.5 mg / mL)	Coefficient de diffusion (cm ² /s)
PLL ^{FITC} (66 700 g/mol)	$7.8 (\pm 2.6) \cdot 10^{-7}$
PLL ^{FITC} (300 000 g/mol)	$1.2 (\pm 0.2) \cdot 10^{-7}$
HA ^{FITC} (400 000 g/mol)	$1.3 (\pm 0.1) \cdot 10^{-7}$
FITC (389 g/mol)	$> 1 \cdot 10^{-6}$

Tableau 3.3.1 – 1 : Coefficients de diffusion de différentes solutions de molécules fluorescentes obtenus par expérience de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment.

Les résultats obtenus sont cohérent avec ceux de la littérature [Esquenet 2003, Hong and Granick 2005]. Les conditions expérimentales sont différentes (masse molaire, concentration, taux de sel), mais l'ordre de grandeur du coefficient de diffusion reste le même.

3.3.2 Analyse des films marqués en surface

Les résultats présentés dans ce paragraphe concernent la diffusion de la PLL^{FITC} dans le film (PLL – HA) lorsque celle-ci a été déposée en dernière couche. Deux types de ces multicouches ont été étudiés :

- (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC}
- (PLL – HA)₄₈ – PLL^{FITC}

Les deux films ont dépassé le nombre de paires de couches nécessaire à la transition exponentielle / linéaire de la croissance (cf. § 1.2) [Porcel *et al.* 2006]. Il est ainsi probable que la PLL^{FITC} se comporte de manière similaire dans les deux films multicouches.

- **Méthode d'analyse**

Pour toutes les expériences concernant les films dont la dernière couche est une couche de PLL^{FITC}, les résultats expérimentaux ne sont pas correctement décrits avec une seule population mobile (figure 3.3.2 – 1). Nous avons donc été amenés à introduire une seconde population mobile. L'ajustement par la loi

$$F(t) = A_0 + A_1 e^{-\frac{t}{\tau_{q_1}}} + A_2 e^{-\frac{t}{\tau_{q_2}}} \quad (\text{éq 3.3.2 – 1})$$

s'est ainsi montré beaucoup plus fidèle à l'allure de la courbe expérimentale. La figure 3.3.2 – 1 représente une courbe d'acquisition typique du recouvrement de fluorescence ainsi que l'ajustement par les expressions 3.3.1 – 1 et 3.3.2 – 1. On remarque la différence de qualité d'ajustement selon l'expression utilisée. Le recours à l'expression 3.3.2 – 1, qui contient deux termes décroissant en fonction du temps, suggère l'existence de deux fractions mobiles. La relaxation de l'amplitude du profil de concentration en espèces fluorescentes d'un échantillon présente la même allure quelle que soit la valeur du paramètre q_0 .

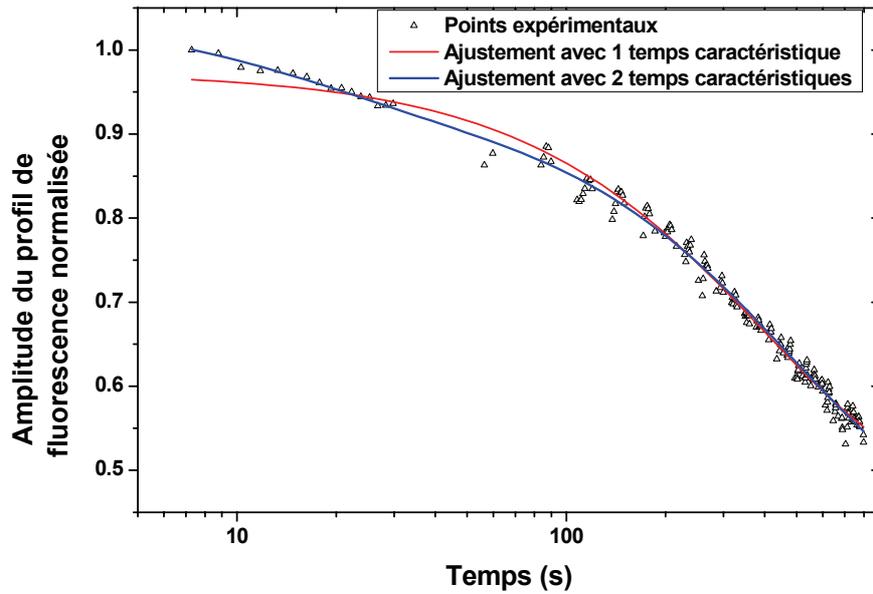


Figure 3.3.2 – 1 : Relaxation de l'amplitude du profil de concentration de la PLL^{FITC} dans un film (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC}. L'ajustement des points expérimentaux avec une loi de type 3.3.1 – 1 (courbe rouge) n'est pas satisfaisant comparé à l'ajustement avec une loi de type 3.3.2 – 1 (courbe bleue). Pour cet exemple $q_0 = 1211 \text{ cm}^{-1}$, $\tau_{q_1} = 20 \text{ s}$ et $\tau_{q_2} = 485 \text{ s}$.

• Résultats

Les résultats sont résumés dans le tableau 3.3.2 – 1 : deux fractions mobiles de PLL^{FITC} coexistent dans le film (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC}, une rapide et une lente. La première fraction représente un peu moins de 20% des espèces fluorescentes et son coefficient de diffusion est de l'ordre de $1.10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$, soit environ 80 fois plus petit que le coefficient de diffusion de la PLL^{FITC} en solution. La seconde fraction représente 40% des espèces fluorescentes et son coefficient est de l'ordre de $1.10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$, soit environ 800 fois plus petit que celui de la PLL^{FITC} en solution. Cette valeur est aussi très comparable à celle obtenue par Picart *et al.* [Picart *et al.* 2005]. Dans ces travaux, des expériences de FRAP en microscopie confocale sur des échantillons (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} ont conduit à un coefficient de diffusion de l'ordre de $2.10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour une fraction de 39% des espèces fluorescentes. Compte tenu de l'incertitude liée aux mesures réalisées avec le microscope confocal, il est raisonnable de considérer que les résultats obtenus par ces deux techniques convergent. Néanmoins, nos expériences mettent en évidence une espèce mobile supplémentaire, dont le coefficient de diffusion est d'un ordre de grandeur plus important que celui de la fraction mobile lente. Les expériences présentées au paragraphe 3.3.3 vont permettre de mieux préciser la nature de ces deux populations mobiles.

Echantillon	(PLL – HA) ₂₄ – PLL ^{FITC}		(PLL – HA) ₄₈ – PLL ^{FITC}	
	Coefficient de diffusion (cm ² /s)	Proportion	Coefficient de diffusion (cm ² /s)	Proportion
Fraction mobile lente	(0.53 ± 0.01).10 ⁻¹⁰	(42 ± 10)%	(1.1 ± 0.1).10 ⁻⁹	(43 ± 5)%
Fraction mobile rapide	(0.95 ± 0.11).10 ⁻⁹	(17 ± 10)%	(1.2 ± 0.2).10 ⁻⁸	(18 ± 5)%
Fraction immobile	\	(41 ± 9)%	\	(38 ± 5)%

Tableau 3.3.2 – 1 : Coefficients de diffusion et proportions des fractions mobiles et immobile de deux constructions du film (PLL – HA)_n – PLL^{FITC} obtenus par expérience de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment.

La figure 3.3.2 – 2 représente les temps caractéristiques moyens de décroissance (temps longs pour la fraction lente (**B**), temps courts pour la fraction rapide (**A**)) en fonction de $\frac{1}{q_0^2}$, où $q_0 = \frac{2\pi}{i}$ et i est l'interfrange créée par le dispositif expérimental. Chaque point correspond au temps moyen obtenu à partir de quatre mesures expérimentales répétées sur des zones différentes d'une même préparation. Les barres d'erreur représentent l'erreur sur la moyenne des mesures. Le symbole (○) représente les données expérimentales pour l'échantillon (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} et le symbole (Δ) représente les données expérimentales pour l'échantillon (PLL – HA)₄₈ – PLL^{FITC}. L'ajustement des temps caractéristiques moyens de recouvrement de fluorescence par la loi $\tau_q = (Dq_0^2)^{-1}$ permet d'obtenir le coefficient de diffusion et montre que les deux populations diffusent de manière brownienne dans la multicouche.

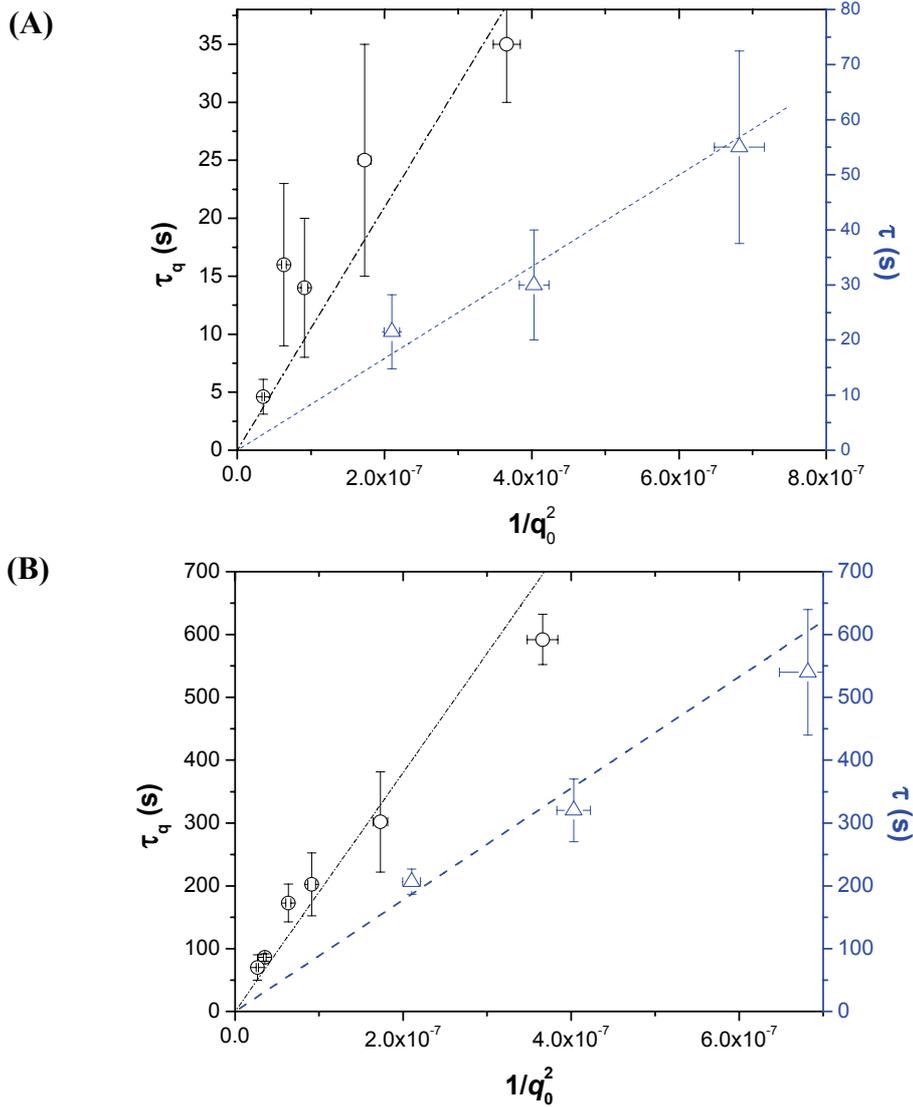


Figure 3.3.2 – 2 : Temps caractéristiques moyens de recouvrement de fluorescence en fonction de l'inverse du carré de la fréquence spatiale q_0 , elle-même reliée à la valeur de l'interfrange i . Les lois de diffusion ont été obtenues pour deux échantillons différents (\circ) (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} et (Δ) (PLL – HA)₄₈ – PLL^{FITC}. Chaque temps correspond à la moyenne de quatre mesures expérimentales. Les barres d'erreur sur les temps représentent l'erreur sur la moyenne des quatre mesures. Les barres d'erreur sur $1/q_0^2$ sont liées à l'incertitude sur l'estimation de l'interfrange i . **(A)** Loi de diffusion pour la fraction mobile rapide : (\circ) $D = (9.5 \pm 1.1) \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Δ) $D = (1.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ **(B)** Loi de diffusion pour la fraction mobile lente : (\circ) $D = (5.3 \pm 0.1) \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Δ) $D = (1.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Les résultats de ces deux types d'échantillons sont un peu différents en ce qui concerne la valeur des coefficients de diffusion. Cela provient sans doute de l'utilisation de deux lots de poly(L-lysine) différents pour l'élaboration des multicouches. Cette différence peut aussi provenir de l'hétérogénéité de surface de chaque échantillon d'une construction donnée, ainsi que l'hétérogénéité entre les échantillons. Cette hétérogénéité se remarque notamment à

travers le fait que les barres d'erreur peuvent être importantes bien que chaque temps caractéristique moyen corresponde au comportement moyen de l'échantillon sur 5% de sa surface. A titre de comparaison, une mesure de FRAP en microscopie confocale ne concerne une mesure de diffusion au sein de l'échantillon que sur 0.1% de sa surface totale.

Il est particulièrement intéressant de remarquer que la diffusion de la PLL^{FITC} pour les deux types de multicouches présente les mêmes caractéristiques :

- il existe deux fractions mobiles dont les pourcentages de populations et les coefficients de diffusion ont un ordre de grandeur voisin,
- il y a une population immobile à l'échelle de temps de l'expérience et de proportion semblable.

Ces résultats montrent que la PLL^{FITC} diffuse de la même manière dans des films d'épaisseurs différentes mais dont chacun a dépassé le nombre de paires de couches nécessaires à la transition exponentielle / linéaire de la croissance.

Il est aussi remarquable que les points expérimentaux peuvent être modélisés par l'équation 3.3.1 – 2 attestant ainsi que les populations mobiles diffusent de manière brownienne.

3.3.3 Analyse des films marqués en cours de construction

Dans ce paragraphe, les résultats présentés concernent des expériences de FRAP réalisées sur des films (PLL – HA) qui ont été marqués par une couche de PLL^{FITC} au cours de la construction. La position de la couche de PLL^{FITC} a été modulée afin d'étudier l'influence de son enfouissement sur sa capacité à diffuser latéralement dans la multicouche. Les échantillons analysés ont tous la même strate de base, c'est-à-dire (PLL – HA)₂₄ :

- (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} – HA
- (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} – (HA – PLL)₁
- (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} – (HA – PLL)₆
- (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} – (HA – PLL)₂₄

- **Dernière couche : acide hyaluronique**

Les résultats des expériences de FRAP sur des échantillons (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} – HA sont décisifs pour comprendre la nature des deux espèces diffusantes. D'après le modèle

expliquant la croissance exponentielle, le dépôt d'une couche d'acide hyaluronique sur le film le vide des chaînes libres de poly(L-lysine). L'ajustement des temps caractéristiques de recouvrement par l'équation 3.3.3 – 1, c'est-à-dire la loi de diffusion brownienne à laquelle on ajoute une constante τ_0 :

$$\tau_q = (Dq_0^2)^{-1} + \tau_0 \quad (\text{éq 3.3.3 – 1})$$

reproduit plus fidèlement l'évolution du temps caractéristique de recouvrement de fluorescence en fonction de $1/q_0^2$ que l'équation 3.3.1 – 2 ne le fait. La PLL^{FITC} semble diffuser de manière brownienne, mais un phénomène supplémentaire, traduit par le terme τ_0 , se produit. Ce temps pourrait correspondre à un temps de piégeage de la PLL^{FITC} dans des complexes.

Les expériences de FRAP sur de tels échantillons ont révélé une seule fraction mobile, qui représente (70±3)% des chaînes fluorescentes. Le coefficient de diffusion de celle-ci correspond à celui de la fraction la plus lente des échantillons (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} : $D = (1.5 \pm 0.3) \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$. La fraction rapide semble donc avoir disparu avec le dépôt d'acide hyaluronique. Cette fraction rapide est très probablement la population de chaînes libres du modèle de la croissance exponentielle. La fraction mobile lente pourrait être une population de PLL^{FITC} complexée à des chaînes de HA et liées faiblement au film.

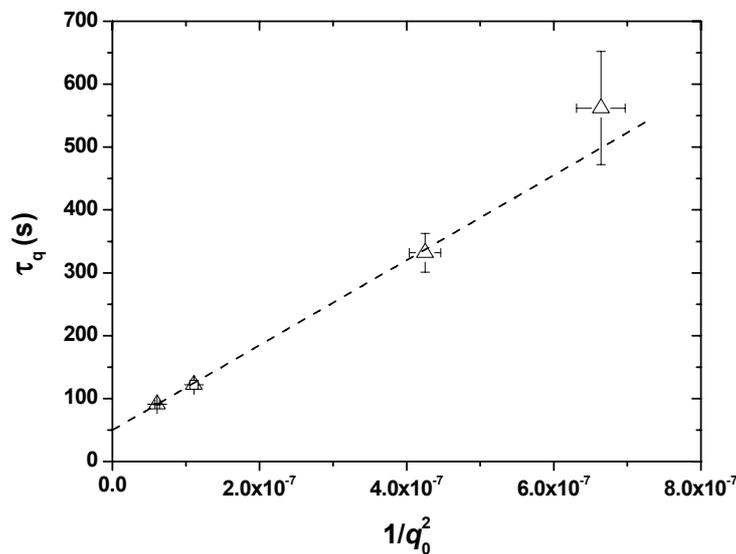


Figure 3.3.3 – 1 : Temps caractéristiques moyens de recouvrement de fluorescence en fonction de l'inverse du carré de la fréquence spatiale q_0 , elle-même reliée à la valeur de l'interfrange i pour un échantillon (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} – HA. Chaque temps correspond à la moyenne de quatre mesures expérimentales. Les barres d'erreur sur les temps représentent l'erreur sur la moyenne des mesures. Les barres d'erreur sur $1/q_0^2$ sont liées à l'incertitude sur l'estimation de l'interfrange i . L'ajustement des points (traits pointillés) a été réalisé par la loi $\tau_q = (Dq_0^2)^{-1} + \tau_0$ (éq 3.3.3 – 1) et donne pour coefficient de diffusion : $D = (1.5 \pm 0.3) \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$, et $\tau_0 = (50 \pm 4) \text{ s}$.

• **Dépôt de (HA – PLL)_n**

On dépose une, six ou vingt-quatre paires de couches de (HA – PLL) sur le film (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC}. Les phénomènes de diffusion ont été observés 24 et 120 heures après le dépôt de la PLL^{FITC}. La figure 3.3.3 – 2 représente une courbe d’acquisition typique du recouvrement de fluorescence pour ces échantillons. L’équation 3.3.1 – 1 reproduit correctement l’évolution temporelle de l’amplitude du profil de fluorescence des échantillons après le photoblanchiment, et suggère donc l’existence d’une fraction mobile unique.

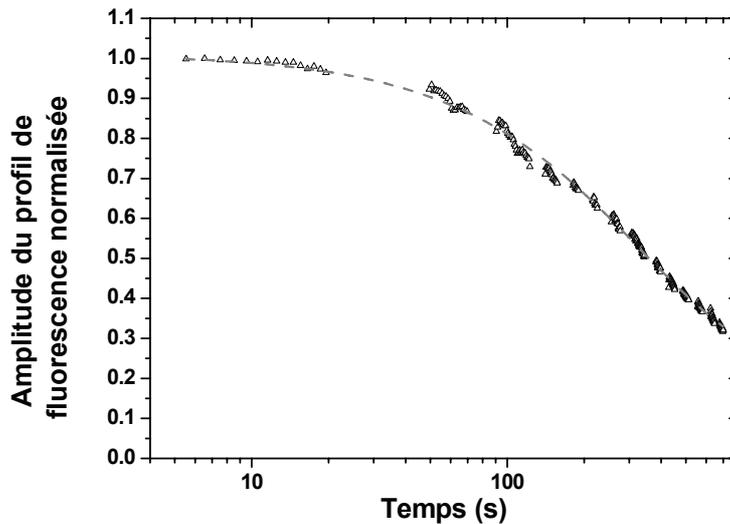


Figure 3.3.3 – 2 : Relaxation de l’amplitude du profil de concentration de la PLL^{FITC} dans un film (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} – (HA – PLL)₂₄. Pour cet exemple $q_0 = 1160 \text{ cm}^{-1}$ et $\tau_q = 336 \text{ s}$.

Plusieurs points sont à remarquer pour ces résultats :

- une seule fraction mobile a été observée, et celle-ci correspond à la fraction mobile lente du film (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC}. Pourtant, chaque construction se termine par une couche de poly(L-lysine). Il est probable que des chaînes de PLL^{FITC} complexées et échangeables par des chaînes de PLL se retrouvent libres dans le film. Celles-ci peuvent alors diffuser hors du film vers la solution de PLL en contact du film. Le volume de la solution de PLL étant infiniment grand devant le volume du film, les chaînes de PLL^{FITC} se trouvent très diluées. Après le rinçage, elles représentent donc une fraction infiniment petite de la population de chaînes libres présente dans le film, celle-ci est alors indétectable.
- La profondeur d’enfouissement ne semble pas jouer de rôle majeur sur la diffusion des chaînes de PLL^{FITC}. Cela semble en adéquation avec le fait qu’un

film (PLL – HA)_n apparaît totalement marqué en vert au microscope confocal quelle que soit la position de dépôt de la PLL^{FITC}. Celle-ci s'échange avec la PLL déposée à des cycles précédents et ultérieurs qui a été complexée par un dépôt d'acide hyaluronique. Ainsi, quel que soit l'enfouissement, il s'agit probablement de la diffusion des complexes PLL^{FITC} – HA qui est toujours observée.

- Les coefficients de diffusion (de 2.4 à 3.2.10⁻⁹ cm²/s après 24 heures) et la proportion des populations mobiles (environ 75%) et immobiles (environ 25%) ont des valeurs particulièrement proches pour les différents enfouissements (Tableau 3.3.3 – 1). Néanmoins, il y a une différence avec les proportions de populations des échantillons marqués en surface par une couche de PLL^{FITC} pour lesquels 60% des chaînes de PLL^{FITC} sont mobiles et 40% sont immobiles.
- Le vieillissement de l'échantillon sur 120 heures ne semble pas très marqué : il y a une diminution systématique du coefficient de diffusion entre 24 et 120 heures, mais en général, celle-ci est contenue dans les barres d'erreur. De plus, il n'y a pas d'évolution de la proportion de chaque fraction.
- L'expression utilisée pour ajuster les temps moyens caractéristiques de recouvrement de fluorescence est de la forme 3.3.3 – 1 (figure 3.3.3 – 3). L'équation 3.3.1 – 2 ne reproduisait pas avec qualité l'évolution des temps moyens caractéristiques en fonction de $1/q_0^2$. La signification physique du terme τ_0 pourrait correspondre à un temps de piégeage des chaînes de PLL^{FITC} dans les complexes, mais aucune preuve expérimentale n'appuie cette hypothèse.

(PLL – HA) – PLL^{FITC} – (HA – PLL)₂₄				
	24h		120h	
	Coefficient de diffusion (cm²/s)	Proportion	Coefficient de diffusion (cm²/s)	Proportion
Fraction mobile	(2.6 ± 0.3).10 ⁻⁹	(72 ±2)%	(2.1 ± 0.3).10 ⁻⁹	(71 ±2)%
Fraction immobile	\	(28 ±2)%	\	(29 ±2)%
(PLL – HA) – PLL^{FITC} – (HA – PLL)₆				
	24h		120h	
	Coefficient de diffusion (cm²/s)	Proportion	Coefficient de diffusion (cm²/s)	Proportion
Fraction mobile	(2.4 ± 0.2).10 ⁻⁹	(78 ±2)%	(1.2 ± 0.1).10 ⁻⁹	(77 ±5)%
Fraction immobile	\	(22 ±2)%	\	(23 ±2)%
(PLL – HA) – PLL^{FITC} – (HA – PLL)₁				
	24h		120h	
	Coefficient de diffusion (cm²/s)	Proportion	Coefficient de diffusion (cm²/s)	Proportion
Fraction mobile	(3.2 ± 0.2).10 ⁻⁹	(75 ±5)%	(2.8 ± 0.3).10 ⁻⁹	(78 ±6)%
Fraction immobile	\	(25 ±2)%	\	(22 ±2)%

Tableau 3.3.3 – 1 : Coefficients de diffusion et proportions des fractions mobiles et immobiles de trois constructions du film (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} – (HA – PLL)_n obtenus par expérience de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment.

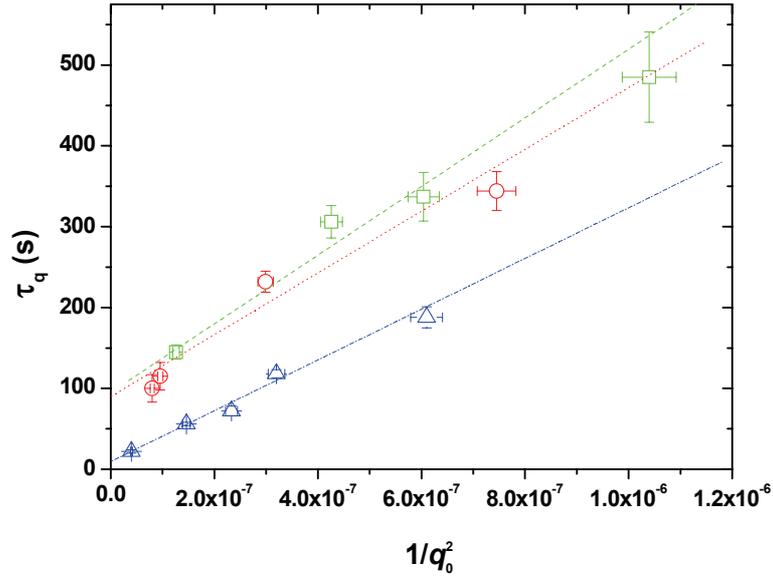


Figure 3.3.3 – 3 : Temps caractéristiques moyens de recouvrement de fluorescence en fonction de l'inverse du carré de la fréquence spatiale q_0 , elle-même reliée à la valeur de l'interfrange i pour des échantillons (résultats obtenus après 24h). (○) (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} – (HA – PLL)₂₄, (□) (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} – (HA – PLL)₆, (△) (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} – (HA – PLL)₁. Chaque temps correspond à la moyenne de quatre mesures expérimentales. Les barres d'erreur sur les temps représentent l'erreur sur la moyenne des mesures. Les barres d'erreur sur $1/q_0^2$ sont liées à l'incertitude sur l'estimation de l'interfrange i . L'ajustement des points a été

réalisé par la loi $\tau_q = (Dq_0^2)^{-1} + \tau_0$ (éq 3.3.3 – 1). Les coefficients de diffusion et les temps τ_0 obtenus sont :
 (○) $D = (2.6 \pm 0.3) \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$, $\tau_0 = (90 \pm 13) \text{ s}$ (□) $D = (2.4 \pm 0.2) \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$, $\tau_0 = (95 \pm 12) \text{ s}$
 (△) $D = (3.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$, $\tau_0 = (10 \pm 2) \text{ s}$

3.3.4 Discussion

Dans ce paragraphe, un modèle est proposé à partir des résultats présentés dans ce chapitre ainsi que les données de la littérature sur le système (PLL – HA) qui sont résumés ci-dessous.

Le dépôt d'une couche de PLL^{FITC} sur un film (PLL – HA)_n conduit notamment au remplissage du film par des chaînes libres. Il est aussi connu que les chaînes libres peuvent s'échanger avec des chaînes plus fortement liées au film [Picart *et al.* 2002]. Des expériences de FRAP menées sur des films (PLL – HA)_n – PLL^{FITC} ont montré qu'il y avait deux fractions de PLL^{FITC} mobiles (une rapide et une lente) au sein du film en plus d'une fraction immobile. Ces résultats se retrouvent à la fois sur les fractions de populations et sur leurs coefficients de diffusion :

- Fraction rapide : 20%, $D \approx 1 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$
- Fraction lente : 40%, $D \approx 1 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$
- Fraction immobile : 40%

Le dépôt d'une couche d'acide hyaluronique sur ce type d'échantillon, menant donc à une construction $(PLL - HA)_n - PLL^{FITC} - HA$, fait disparaître la fraction mobile la plus rapide :

- Fraction mobile 70%, $D \approx 1.10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$
- Fraction immobile : 30%

Sachant que le dépôt d'acide hyaluronique vide le film des espèces libres de PLL en les complexant pour former la nouvelle couche à la surface du film, la fraction mobile la plus rapide pourrait correspondre aux chaînes de PLL^{FITC} libres dans le film. La fraction mobile lente pourrait donc être constituée des chaînes de PLL complexées par des chaînes de HA, mais ces complexes ne seraient pas fortement liés au film et pourraient donc diffuser dans le film.

Le dépôt de une à plusieurs couches de $(HA - PLL)_n$ sur le film $(PLL - HA)_{24} - PLL^{FITC}$ ne modifie pas la nature des fractions de PLL^{FITC} par rapport au film $(PLL - HA)_n - PLL^{FITC} - HA$: il n'y a qu'une seule fraction mobile, qui serait la fraction mobile lente dans le film $(PLL - HA)_{24} - PLL^{FITC}$. Toutefois, la fraction rapide correspondant à la population libre doit également exister car la couche terminale des films $(PLL - HA)_{24} - PLL^{FITC} - (HA - PLL)_n$ est constituée de PLL. Par contre, celle-ci est constituée de PLL non marquée et est probablement non détectable.

Les coefficients de diffusion des différentes fractions mobiles de PLL^{FITC} dans les films sont de 80 à 800 fois plus petits que celui des mêmes chaînes en solution. Ces fractions mobiles diffusent de manière brownienne comme en solution. De plus, des travaux réalisés au laboratoire ont montré que les films $(PLL - HA)$ possédaient des propriétés viscoélastiques proches de celles des hydrogels [Francius *et al.* 2006]. Compte tenu de l'ensemble de nos résultats et de ces informations, un modèle de l'architecture du film $(PLL - HA)$ peut être proposé (figure 3.3.4 – 1) :

- les chaînes d'acide hyaluronique sont enchevêtrées et constituent un réseau qui fait la structure du film.
- des chaînes de PLL^{FITC} sont complexées à ces chaînes et constituent ainsi la fraction immobile.
- la population de chaînes libres de PLL^{FITC} constitue la fraction mobile rapide.
- la fraction mobile la plus lente serait constituée de complexes de PLL^{FITC} et de HA qui diffuseraient plus lentement à travers les chaînes créant le réseau.

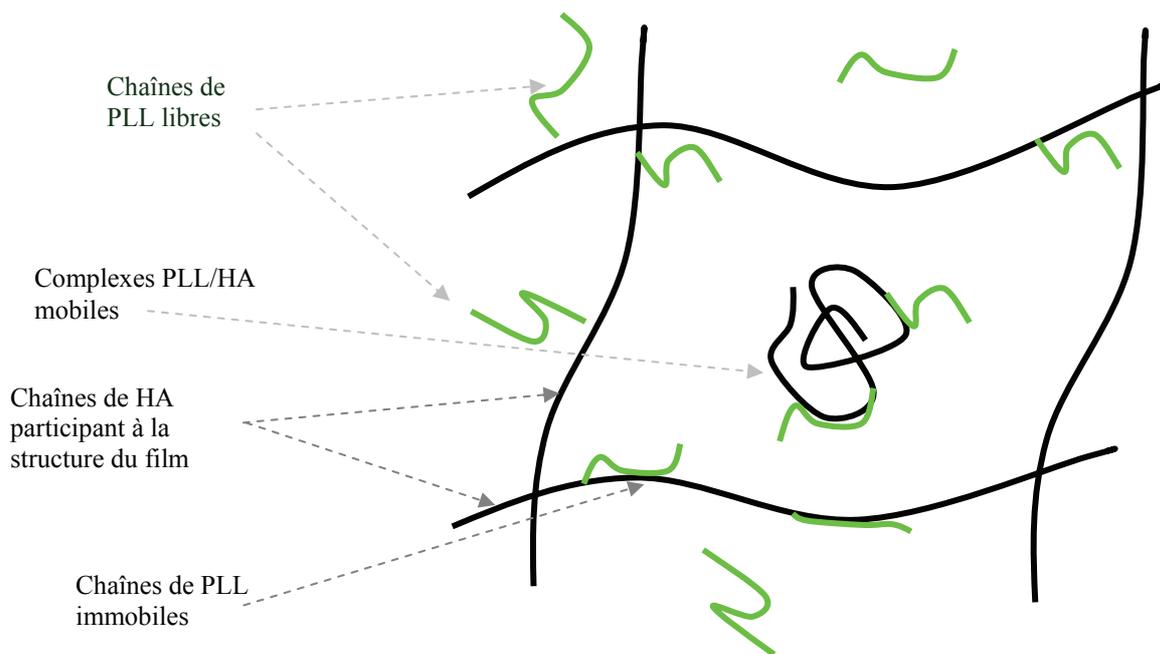


Figure 3.3.4 – 1 : Proposition d'architecture d'une multicouche (PLL – HA).

Les résultats expérimentaux qui ont amené à proposer ce modèle fournissent une preuve supplémentaire de l'existence de chaînes libres diffusant dans la multicouche. Le modèle proposé n'est pas incompatible avec le modèle de la transition exponentielle / linéaire. En effet, cette transition a notamment été expliquée par la capacité de l'acide hyaluronique, lorsqu'il est déposé, à former des complexes avec la poly(L-lysine) sur une épaisseur de $1 \mu\text{m}$ à partir de la surface du film. Une fois que le film dépasse cette épaisseur, la croissance devient linéaire. L'interaction en surface du film entre la poly(L-lysine) libre et l'acide hyaluronique produit la nouvelle couche, mais la fraction des chaînes de HA pénétrant dans le film et se complexant avec la PLL pourrait correspondre à la fraction mobile lente de nos expériences.

La construction d'un film contenant une couche de HA^{FITC} a été réalisée et des expériences de FRAP ont été menées afin de fournir une preuve expérimentale de la nature de la fraction mobile lente. Néanmoins, si la détermination du coefficient de diffusion de ce polyélectrolyte en solution a été possible, celui-ci s'est révélé très résistant au photoblanchiment une fois dans la multicouche, empêchant ainsi de valider l'hypothèse.

3.4 Conclusion du chapitre

Nous avons présenté dans ce chapitre différents types d'expériences concernant un film à croissance exponentielle, basé sur le couple poly(L-lysine) – acide hyaluronique.

Dans la première partie, l'étude de l'échange entre les chaînes de PLL^{FITC} déposées au sommet du film et les chaînes de PLL complexées constitutives du film a été réalisée en microscopie confocale. L'hypothèse a été faite que la PLL^{FITC} est représentative de la PLL, car le taux de marquage de chaque chaîne de PLL^{FITC} est faible. La cinétique d'adsorption de la PLL^{FITC} a initialement été analysée. Pour le dépôt d'une solution de 4 mg / mL, la cinétique se stabilise au bout de plus de 1000 secondes, démontrant alors que tous les phénomènes d'échange entre chaînes de PLL marquées et non marquées se sont réalisés. La concentration de PLL^{FITC} a ensuite été quantifiée :

- à 140 mg / mL dans une multicouche (PLL^{FITC} – HA)₃₀ – PLL^{FITC},
- à 50 mg / mL au maximum dans une multicouche (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC}.

Dans ce cas plusieurs concentrations et temps de dépôt de solutions de PLL^{FITC} ont été analysés.

Les chaînes de PLL^{FITC} déposées sur un film correspondent à environ 35% de la quantité totale des chaînes de PLL contenues dans le film. Les chaînes libres de PLL^{FITC} représenteraient 7% de la quantité de chaînes totales de PLL, marquées ou non. Moins de 28% de tous les types de chaînes de PLL contenues dans le film représenteraient l'échange de chaînes de PLL constitutives du film par des chaînes de PLL^{FITC}.

La méthode d'analyse de fluorescence par microscopie confocale ainsi que les résultats concernant l'estimation de la concentration de la PLL^{FITC} dans le film peuvent notamment être intéressants dans le cas de chaînes de PLL couplées à des biomolécules. Il serait ainsi possible de prédire la quantité de biomolécules présentes dans le film en maîtrisant le temps de dépôt et la concentration de la solution de PLL à déposer.

Dans la seconde partie, nous avons réalisé des expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment grâce à un dispositif à interférences pour étudier la diffusion de la PLL^{FITC} en solution et dans une multicouche composée de poly(L-lysine) et d'acide hyaluronique. La couche de PLL^{FITC} a été déposée à différentes étapes de la construction selon les échantillons. Lorsqu'elle a été déposée en surface, deux populations

mobiles en plus d'une population immobile ont été détectées. Ces populations mobiles, une rapide et une lente, diffusent de manière brownienne dans le film, mais avec des coefficients de diffusion respectivement 80 et 800 plus petits que celui de la PLL^{FITC} en solution.

La nature de ces populations a été en partie dévoilée par le dépôt d'acide hyaluronique sur la couche de PLL^{FITC} qui a fait disparaître la fraction mobile la plus rapide : celle-ci doit donc correspondre à la fraction de chaînes diffusant librement dans la multicouche. La fraction mobile la plus lente pourrait correspondre à des complexes de PLL^{FITC} – HA diffusant dans un réseau de type « gel » de chaînes de HA enchevêtrées. Des chaînes de PLL^{FITC} complexées à ces chaînes de HA constituent la fraction immobile. Aucune preuve expérimentale n'a cependant été obtenue pour valider l'hypothèse de la diffusion de complexes.

Ces expériences ont démontré pour la première fois la coexistence d'une fraction de chaînes de PLL libres à diffusion rapide et d'une fraction de chaînes de PLL à diffusion lente dans un film (PLL – HA)_n.

Des expériences de FRAP sur des films (PLL – HA) contenant des chaînes d'acide hyaluronique couplées à un fluorophore plus sensible au photoblanchiment une fois que celles-ci se trouvent dans le film sont envisagées pour confirmer nos hypothèses concernant la nature de la fraction mobile la plus lente des films (PLL – HA)_n – PLL^{FITC}, et de la fraction mobile des films (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} – (HA – PLL)_n.

L'origine des deux populations mobiles peut éventuellement provenir d'une densification du film augmentant en se rapprochant du substrat. Celles-ci pourraient être des chaînes libres de PLL^{FITC}, mais situées à une profondeur du film plus ou moins favorable à la diffusion. L'observation de la section en *z* de films (PLL – HA)_n - PLL^{FITC} très épais (une centaine de paires de couches) en microscopie confocale après le photoblanchiment d'un cylindre sur toute l'épaisseur pourrait permettre de visualiser le recouvrement de fluorescence en fonction de la profondeur et ainsi de confirmer cette hypothèse.

Bibliographie

- G. Decher. **1997**. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* 277:1232-1237.
- D. L. Elbert, C. B. Herbert, and J. A. Hubbell. **1999**. Thin polymer layers formed by polyelectrolyte multilayer techniques on biological surfaces. *Langmuir* 15:5355-5362.
- C. Esquenet. 2003. Thèse de Docotrat : Propriétés structurales et dynamiques des solutions de polyélectrolytes rigides et semirigides et de polysaccharides associatifs.
- G. Francius, J. Hemmerlé, J. Ohayon, P. Schaaf, J.-C. Voegel, C. Picart, and B. Senger. **2006**. Effect of crosslinking on the elasticity of polyelectrolyte multilayer films measured by colloidal probe AFM. *Microsc. Res. Tech.* 69:84-92.
- L. Hong, and S. Granick. **2005**. Charged polypeptide diffusion at a very high ionic strength. *J. Poly. Sci., Part B: Polym. Phys.* 43:3497-3502.
- D. Mertz, J. Hemmerlé, J. Mutterer, S. Ollivier, J.-C. Voegel, P. Schaaf, and P. Lavallo. **2007**. Mechanically responding nanovalves based on polyelectrolyte multilayers. *Nano Letters* 7:657-662.
- C. Picart, P. Lavallo, P. Hubert, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, and J.-C. Voegel. **2001**. Buildup mechanism for poly(L-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface. *Langmuir* 17:7414-7424.
- C. Picart, J. Mutterer, Y. Arntz, J.-C. Voegel, P. Schaaf, and B. Senger. **2005**. Application of fluorescence recovery after photobleaching to diffusion of a polyelectrolyte in a multilayer film. *Microsc. Res. Tech.* 66:43-57.
- C. Picart, J. Mutterer, L. Richert, Y. Luo, G. D. Prestwich, P. Schaaf, J.-C. Voegel, and P. Lavallo. **2002**. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:12531-12535.

C. Porcel, P. Lavalle, V. Ball, G. Decher, B. Senger, J.-C. Voegel, and P. Schaaf. **2006**. From exponential to linear growth in polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 22:4376-4383.

Chapitre 4 Films à barrière biodégradable

4.1 Contexte et stratégie	128
4.1.1 <i>Travaux antérieurs</i>	128
4.1.2 <i>Choix des systèmes d'intérêt</i>	131
4.2 Propriétés des films poly(L-lysine) – acide hyaluronique et poly(L-lysine) – poly(acide L-glutamique)	134
4.2.1 <i>Films basés sur le couple poly(L-lysine) – acide hyaluronique</i>	134
4.2.2 <i>Films basés sur le couple poly(L-lysine) – poly(acide L-glutamique)</i>	135
4.3 Croissance du film poly(L-lysine) – poly(acide L-glutamique) sur différents substrats	138
4.3.1 <i>Résultats expérimentaux</i>	138
4.3.2 <i>Interprétation des résultats</i>	140
4.4 Films multistrates	143
4.4.1 <i>Dépôt de la première couche de poly(acide L-glutamique) sur un film poly(L-lysine) – acide hyaluronique</i>	143
4.4.2 <i>Dépôt de n paires de couches poly(acide L-glutamique) – poly(L-lysine) sur un film poly(L-lysine) – acide hyaluronique</i>	144
4.4.3 <i>Étude complémentaire : échange poly(acide L-glutamique) / acide hyaluronique</i>	150
4.5 Film multistrates et protéine A	152
4.5.1 <i>Comportement de la protéine A dans les films à croissance exponentielle</i>	152
4.5.2 <i>Comportement de la protéine A dans les films multistrates</i>	154
4.6 Conclusion du chapitre	158
Bibliographie	159

4.1 Contexte et stratégie

4.1.1 Travaux antérieurs

Une des stratégies de l'Unité 595 de l'INSERM vise à développer des films bioactifs, notamment des films qui pourraient permettre la libération contrôlée dans le temps de principes actifs, tels que des facteurs de croissance dans le cadre de l'ingénierie tissulaire.

Un moyen de réaliser de tels systèmes est de construire un film constitué de différents types de films multicouches superposés. En alternant des architectures à croissance exponentielle, telles que les films à base de poly(L-lysine) et d'acide hyaluronique (PLL – HA), qui se comportent comme des réservoirs ou compartiments de chaînes libres [Picart *et al.* 2002], et des architectures à croissance linéaire, telles que les films à base de poly(allylamine) et poly(styrène sulfonate) (PAH – PSS), qui agissent comme des barrières prévenant la diffusion de chaînes libres [Boulmedais *et al.* 2003], on obtient un premier modèle de films compartimentés (figure 4.1.1 – 1).

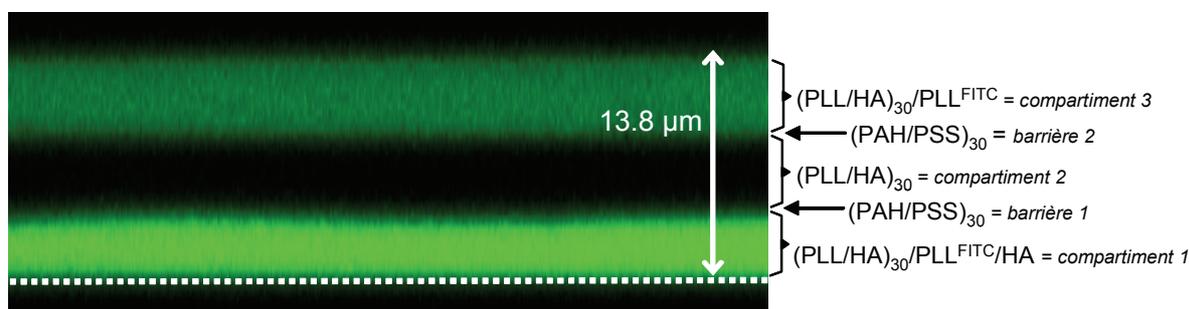


Figure 4.1.1 – 1 : Image de microscopie confocale de la section d'un film à multicouche constitué de trois films multicouches "réservoirs" superposés et séparés par des films multicouches "barrières": $(PLL - HA)_{30} - PLL^{FITC} - HA - (PAH - PSS)_{30} - (PLL - HA)_{30} - (PAH - PSS)_{30} - (PLL - HA)_{30} - PLL^{FITC}$. Les réservoirs inférieur et supérieur sont marqués avec la PLL^{FITC} alors que le réservoir intermédiaire est non marqué [Garza *et al.* 2004].

Les barrières sont constituées de polyélectrolytes synthétiques et se comportent comme des systèmes multicouches non dégradables par des cellules cultivées à la surface du film. En effet, les expériences menées au laboratoire ont clairement démontré que les monocytes (prélevés chez la souris au niveau de la moelle osseuse) mis en culture sur ces films multicouche ne sont pas capables de dégrader une multicouche constituée de polyélectrolytes synthétiques de type (PAH – PSS) [Garza *et al.* 2005]. Ces cellules ne

peuvent ainsi jamais accéder aux molécules bioactives éventuellement insérées dans le compartiment sous-jacent (figure 4.1.1 – 2). Récemment, les expériences réalisées avec des films (PLL – HA) ne comportant pas de barrière en surface ont démontré par contre qu'ils se dégradent sous l'action des monocytes. Les monocytes sont capables de cliver les liaisons amides des polyamino-acides (PLL) et les liaisons disaccharidiques de l'acide hyaluronique grâce à la production et l'action d'enzymes spécifiques (trypsine, hyaluronidase, ...). En ce qui concerne les polyélectrolytes de type PAH et PSS, il n'existe aucune enzyme spécifique produite par les cellules capable de les dégrader.

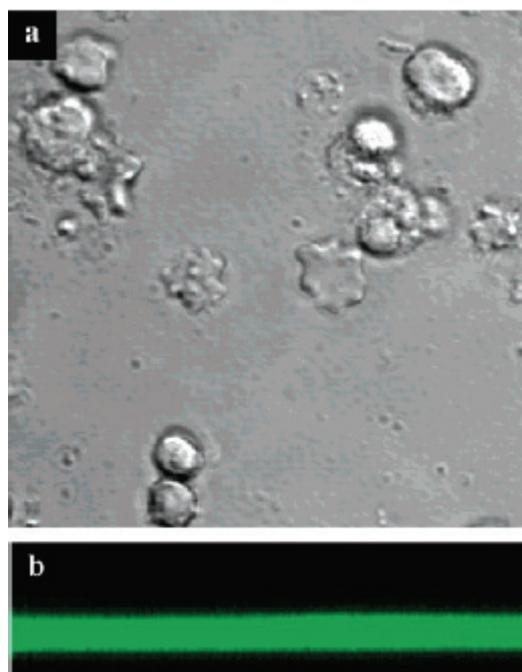


Figure 4.1.1 – 2 : Image de microscopie confocale de cellules de moelle osseuse 17h après leur dépôt sur un film (PLL – HA)₂₀ – PLL^{FITC} – (PAH – PSS)₂₀ – PLL. **(a)** image (48 × 48 μm²) du plan de surface (champ clair + canal de fluorescence vert) **(b)** image d'une section verticale du film (48 × 12.5 μm²) obtenue sur une zone couverte de cellules. Les cellules n'ont pas internalisé la PLL^{FITC}, prouvant que la barrière (PAH – PSS) n'est pas dégradée [Garza *et al.* 2005].

Finalement, la recherche de systèmes de barrières dégradables s'est tournée vers des systèmes différents des multicouches de polyélectrolytes. Afin de disposer de films comportant des barrières imperméables aux peptides et aux protéines mais néanmoins dégradables au moins par l'action des monocytes, une première stratégie a consisté à utiliser des polyesters aliphatiques. Ce sont des polymères synthétiques biocompatibles déjà bien connus [Lavik and Langer 2004, Lavik *et al.* 2005]. Le co-polyester dérivé des acides lactique et glycolique, noté PLGA, est un composé ayant obtenu toutes les autorisations de la FDA (Food and Drug Administration) pour les applications *in vivo* dans le domaine

biomédical. En effet, il est non immunogénique, non toxique et s'hydrolyse dans des conditions physiologiques. Les produits de dégradation sont tout d'abord l'acide lactique et l'acide glycolique qui sont métabolisés en phase ultime en CO_2 et H_2O . Dans le cadre d'une étude menée au laboratoire, ce copolymère a été déposé en tant que barrière sur les multicouches de (PLL – HA) qui jouent le rôle de réservoirs. Ainsi, en remplaçant les multicouches barrières (PAH – PSS) par une couche de PLGA dégradable (d'épaisseur contrôlée et variant de quelques centaines de nanomètres à plusieurs micromètres), la diffusion de protéines ou peptides d'un réservoir à l'autre peut être bloquée. Cependant ces molécules demeurent accessibles à un moment donné pour les systèmes cellulaires mis en culture sur le film (figure 4.1.1 – 3). Le dépôt de PLGA sur les films multicouches de polyélectrolytes a nécessité une mise au point spécifique d'un système de nébuliseur, plus complexe d'utilisation que le dépôt par trempage. Aussi, ce polymère est dissous dans un solvant, généralement le chloroforme qui peut, dans certaines conditions, altérer la multicouche (PLL – HA) sous-jacente et les facteurs biologiques qui y sont insérés. Ces contraintes de fabrication nous ont conduits à développer un système de barrières constitué de multicouches de polyélectrolytes, dégradables par les cellules.

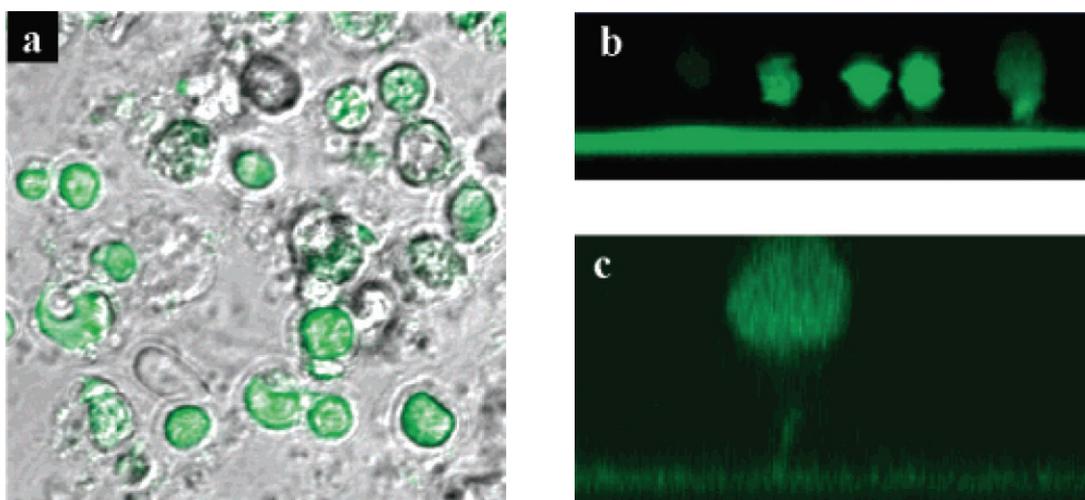


Figure 4.1.1 – 3 : Observation en microscopie confocale 17h après le contact de cellules de moelle osseuse sur le film $(\text{PLL} - \text{HA})_{20} - \text{PLL}^{\text{FITC}} - \text{PLGA} - \text{PLL}$. Le sigle PLGA correspond au co-polyester dérivé des acides lactique et glycolique (a) Image ($48 \times 48 \mu\text{m}^2$) obtenue en champ clair et dans le canal de fluorescence vert du plan de surface du film. (b) Image ($48 \times 16 \mu\text{m}^2$) d'une section en z du film (canal vert) contenant des cellules. (c) Image ($24.8 \times 13 \mu\text{m}^2$) d'une section en z du film (canal vert) au niveau d'une cellule de moelle osseuse et montrant la formation d'un pseudopode (prolongement cellulaire) à travers la couche de PLGA [Garza *et al.* 2005].

4.1.2 Choix des systèmes d'intérêt

Comme nous venons de le décrire, au début de ce travail les systèmes de multicouches barrières étaient constitués de polyélectrolytes non dégradables. Nous avons alors recherché un système se comportant comme une barrière biodégradable avec la facilité de mise en œuvre de la méthode couche par couche.

Plusieurs travaux récents menés au laboratoire suggéraient que les films basés sur le couple poly(L-lysine) et poly(acide L-glutamique) (notés (PLL – PGA)) étaient dégradables par tous les types cellulaires testés [Benkirane-Jessel *et al.* 2005, Chluba *et al.* 2001]. L'insertion de la protéine A dans un film (PLL – PGA) et la mesure de son activité biologique ont été récemment décrites [Jessel *et al.* 2003]. Cette protéine issue de la paroi de *Staphylococcus aureus* possède un large panel d'activités biologiques notamment des propriétés anti-tumorales [Kumar *et al.* 1992, Verma *et al.* 1999], antitoxiques [Subbulakshmi *et al.* 1998], antiparasites [Ghose *et al.* 1999], ou anticancéreuses [Ray *et al.* 1982]. La protéine A peut également stimuler les cellules monocytaires THP-1 et induire la production de cytokines pro-inflammatoires TNF- α (tumor necrosis factor alpha) et anti-inflammatoires IL-10 (interleukine 10). Il a été démontré que la protéine A adsorbée sur les films (PLL – PGA) restait localisée au niveau des couches où elle était déposée. Le film (PLL – PGA) ne permet pas la diffusion verticale de la protéine A dans toute la section du film. De plus, Jessel *et al.* ont démontré que la protéine A enfouie dans un film multicouche conserve son activité biologique : les monocytesensemencés sur les films (PLL – PGA) contenant la protéine A sont stimulés et produisent le TNF- α . Cette réaction se produit grâce à un mécanisme de dégradation du film (PLL – PGA) par ces cellules qui peuvent alors accéder à la protéine A initialement enfouie [Jessel *et al.* 2003].

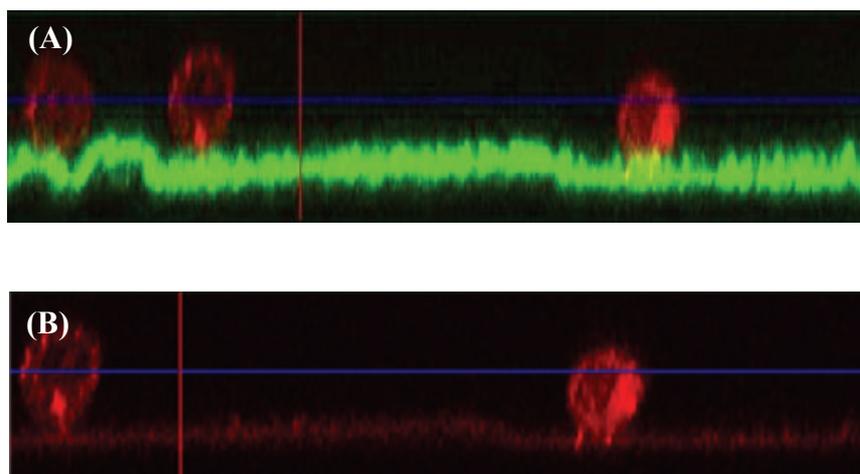


Figure 4.1.2 – 1 : Observation en microscopie confocale de la section en z ($146 \times 26 \mu\text{m}^2$) de deux zones d'un film PEI – PGA – PLL – PA^{TR} – (PGA – PLL)₁₉ – PGA – PLL^{FITC} sur lequel les monocytes THP-1 sont ensemencés (images de taille $146 \times 26 \mu\text{m}^2$). (A) Somme des émissions de fluorescence de la PLL^{FITC} et la PA^{TR}. (B) Image de l'émission de fluorescence de la PA^{TR} uniquement. Celles-ci ont dégradé le film localement et atteint la couche de PA^{TR} [Jessel *et al.* 2003]. Les sigles PEI et PA^{TR} correspondent respectivement aux abréviations poly(éthylène imine) et protéine A marquée au « Texas Red » (émission de fluorescence dans le rouge).

Dans le cadre de l'étude de films réservoirs / barrières, le film (PLL – PGA) semblait donc être un système de choix en tant que barrière, ayant à la fois des propriétés de barrière vis-à-vis de certaines biomolécules et des propriétés de biodégradabilité. Il fallait donc dorénavant associer à ces multicouches (PLL – PGA) un système multicouche agissant en tant que réservoir de protéines A. Notre choix s'est spontanément porté sur les films (PLL – HA) connus pour être des réservoirs de chaînes de PLL libres. Nous avons donc cherché à développer un film multicouche associant ces deux systèmes constitués d'une strate (PLL – HA) agissant en tant que réservoir, sur laquelle est construite une strate (PLL – PGA) agissant en tant que barrière.

Dans la première partie de ce chapitre, nous rappelons les caractéristiques de ces deux films à croissance exponentielle quant à la diffusion latérale et la diffusion dans la section du film des chaînes de polyélectrolytes. Dans la seconde partie du chapitre, nous présentons les expériences réalisées par microbalance à cristal de quartz concernant la croissance d'un film (PLL – PGA) sur un substrat où un film (PLL – HA) est déjà déposé. Des expériences réalisées en microscopie confocale sont présentées dans une troisième partie. Elles ont permis de comprendre l'influence du dépôt des toutes premières couches de (PLL – PGA) sur les

propriétés du film (PLL – HA) sous-jacent et notamment de caractériser les modifications de la mobilité latérale et de la capacité de diffusion des chaînes de poly(L-lysine). Nous avons également étudié, toujours en microscopie confocale, la structure du film (PLL – HA) lors du dépôt en surface d'un nombre plus important de paires de couches (PLL – PGA). Une fois la caractérisation de ces films effectuée, ils ont été fonctionnalisés par insertion de la protéine A. Nous avons ainsi testé les propriétés des films multistrates composés d'un réservoir de protéine A et d'une barrière dégradable.

4.2 Propriétés des films poly(L-lysine) – acide hyaluronique et poly(L-lysine) – poly(acide L-glutamique)

Nous rappelons dans ce paragraphe les études déjà réalisées à propos des phénomènes de diffusion latérale et verticale des chaînes de polyélectrolytes constituant les films multicouches poly(L-lysine) – acide hyaluronique (PLL – HA) d'une part, et poly(L-lysine) – poly(acide L-glutamique) (PLL – PGA), d'autre part.

Lors de cette étude nous avons effectué des expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP, cf. § 2.3) pour suivre la mobilité de la poly(L-lysine) dans les couches de (PLL – HA) au cours de la construction des couches (PLL – PGA) au dessus du film. Nous présentons tout d'abord les résultats des expériences de FRAP concernant la diffusion des chaînes de poly(L-lysine) au sein de films (PLL – HA) et (PLL – PGA) construits sur des substrats indépendants. Ces expériences nous ont servi de témoins pour la suite de l'étude.

4.2.1 Films basés sur le couple poly(L-lysine) – acide hyaluronique

Le mécanisme de croissance du système poly(L-lysine) – acide hyaluronique (PLL – HA) a déjà été étudié de manière approfondie au laboratoire [Picart *et al.* 2001, Porcel *et al.* 2006, Porcel *et al.* 2007]. Il a été démontré que ce système possédait une croissance exponentielle grâce à la capacité des chaînes de PLL à diffuser à l'intérieur du film à chaque dépôt de celle-ci et à l'extérieur lors du dépôt de HA, tandis que le HA semblait immobilisé à sa position de dépôt [Picart *et al.* 2002]. La mobilité latérale de la PLL a été mise en évidence au cours de plusieurs travaux [Picart *et al.* 2005, Richert *et al.* 2004a]. Le système (PLL – HA) se comporte finalement comme un réservoir de chaînes libres de PLL.

Nous avons réalisé une expérience de FRAP sur un film composé de 30 paires de couches de PLL et HA. La dernière couche est constituée de chaînes de PLL^{FITC} (poly(L-lysine) marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine). Chaque couche de PLL a la capacité de diffuser dans toute la section du film ce qui se traduit dans le cas du film (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} par un marquage en vert de toute la section du film [Picart *et al.* 2002]. Nous avons observé un net recouvrement de fluorescence 10 minutes après le blanchiment (figure 4.2.1 -

1). Ce résultat va nous servir de base de comparaison pour la diffusion latérale de la PLL^{FITC} lors des différents dépôts de PLL et PGA sur le film (PLL – HA).

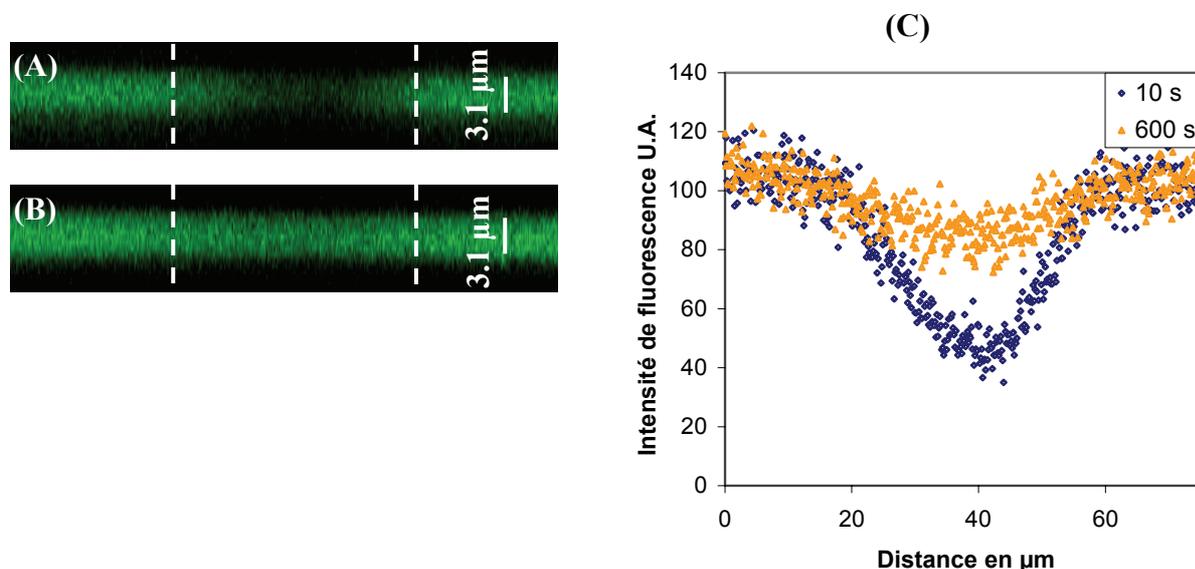


Figure 4.2.1 – 1 : Observation en microscopie confocale de la section en z d'un film (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} 10s (A) et 600s (B) après le photoblanchiment de la PLL^{FITC}. La zone de photoblanchiment est délimitée par les pointillés blancs sur les deux images. (C) Profils d'intensité de fluorescence de la PLL^{FITC} correspondants suivant l'axe z.

4.2.2 Films basés sur le couple poly(L-lysine) – poly(acide L-glutamique)

Les films basés sur le couple de polyélectrolytes (PLL – PGA) ont déjà fait l'objet de plusieurs études ayant permis leur caractérisation [Lavalle *et al.* 2002]. Lavalle *et al.* ont ainsi démontré plusieurs points :

- ce système est un exemple de film à croissance exponentielle où les deux polyélectrolytes sont capables de diffuser vers l'intérieur et vers l'extérieur du film. La capacité de ces deux polyélectrolytes à diffuser dans toute l'épaisseur du film a été observée en microscopie confocale [Lavalle *et al.* 2004b] (figure 4.2.2 – 1) ;
- le PGA marqué avec l'Alexa Red (PGA^{AR}) n'est pas mobile latéralement à l'échelle de temps de l'expérience : aucun recouvrement de fluorescence n'a été observé sur 28 minutes après le photoblanchiment d'une zone rectangulaire de l'échantillon;

- les chaînes de PGA^{AR} liées au film s'échangent significativement en 10 minutes avec les chaînes de PGA^{AR} d'une solution à 5 mg / mL mis en contact de ce film.

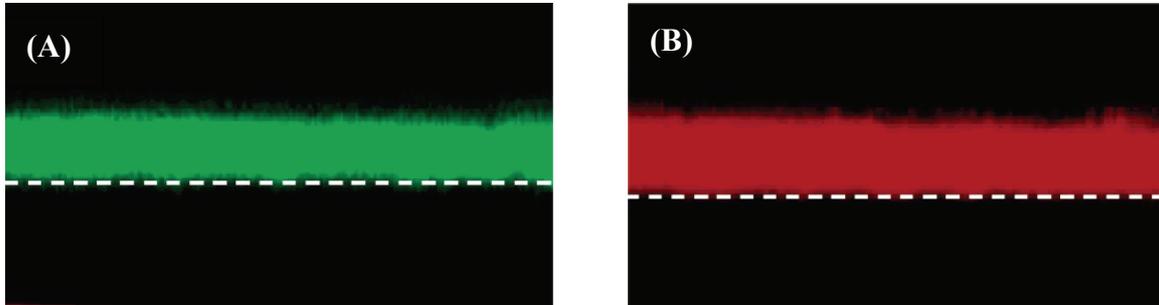


Figure 4.2.2 – 1 : Observation en microscopie confocale de la section en z d'un film **(A)** PEI – (PGA – PLL)₂₀ – PGA – PLL^{FITC} et d'un film **(B)** PEI – (PGA – PLL)₂₀ – PGA^{AR} (Images de taille $74 \times 32 \mu\text{m}^2$). PGA^{AR} correspond aux chaînes de poly(acide L-glutamique) marquées avec l'Alexa Red (émission dans le rouge) [Lavalle *et al.* 2004b].

Dans le cadre de notre étude, nous avons mesuré le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment de la PLL^{FITC} pour un film (PLL – PGA)_n – PLL^{FITC} ($n = 5, 20$). Dans les cas où $n = 5$ (figure 4.2.2 – 2) et $n = 20$, aucun recouvrement de fluorescence n'a été détecté à l'échelle de temps de l'expérience (30 minutes). Cela atteste que la PLL^{FITC} n'est pas mobile latéralement dans un film (PLL – PGA). Il est donc probable que lorsque les chaînes de PLL^{FITC} pénètrent au sein du film (PLL – PGA)_n, elles s'échangent avec des chaînes de PLL non marquées et ainsi se lient au film, expliquant l'immobilité révélée par FRAP.

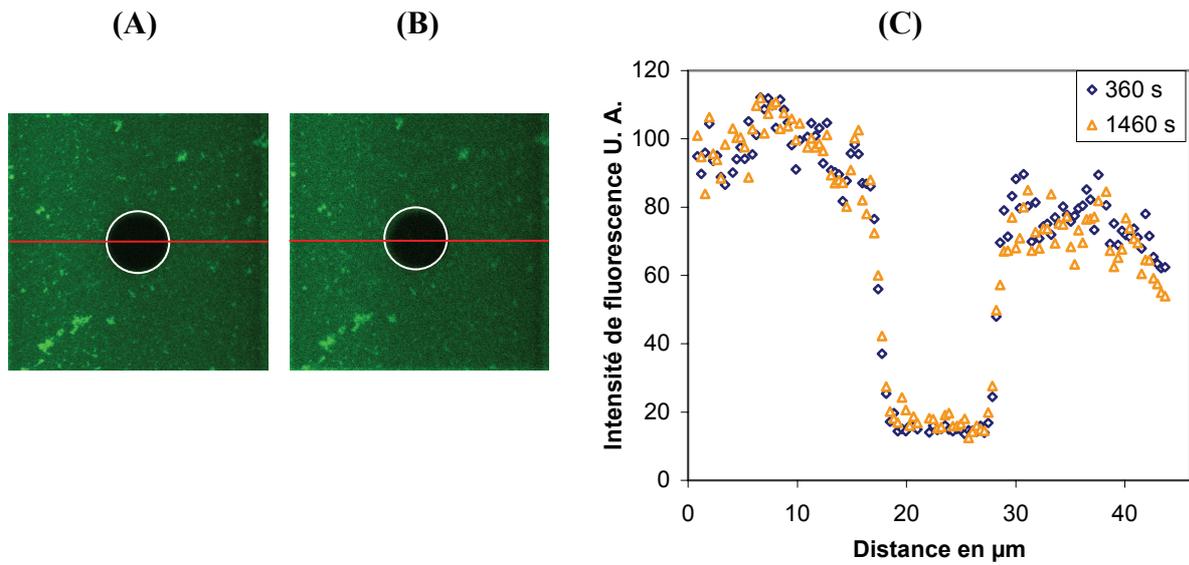


Figure 4.2.2 – 2 : Observation en microscopie confocale (x, y) d'un film $(PLL - PGA)_5 - PLL^{FITC}$. Image ($46 \times 46 \mu\text{m}^2$) de l'échantillon 360 s (A) et 1460 s (B) après le photoblanchiment de la PLL^{FITC} sur toute l'épaisseur de l'échantillon. La zone de photoblanchiment est délimitée par le cercle blanc. (C) Profils d'intensité de fluorescence correspondants à la PLL^{FITC} tracé le long d'une droite suivant le trait rouge représenté en (A).

4.3 Croissance du film poly(L-lysine) – poly(acide L-glutamique) sur différents substrats

Nous avons étudié dans un premier temps à l'aide de la technique de microbalance à cristal de quartz (QCM) la croissance d'un film composé de poly(L-lysine) et de poly(acide L-glutamique) directement sur le cristal puis sur un film précurseur de (PLL – HA) construit sur le cristal. La microscopie confocale ne permet pas de suivre quantitativement l'augmentation de l'épaisseur du film à chaque dépôt en raison de sa résolution (environ 500 nm selon l'axe z), c'est pourquoi la technique QCM a été privilégiée. La QCM (cf. § 2.4) mesure la diminution des différentes fréquences de résonance (fréquence fondamentale (5 MHz) et les harmoniques d'ordre 3, 5 et 7 (15, 25, 35 MHz)) d'un cristal de quartz lors du dépôt des polyélectrolytes et donc lors de l'augmentation de la masse adsorbée sur le cristal. Il n'est généralement plus possible de suivre la diminution de fréquence des harmoniques d'ordres 5 et 7 au-delà de la douzième paire de couches déposée sur un film (PLL – HA). Cela peut être expliqué par le fait que la profondeur de pénétration de l'onde acoustique engendrée par l'oscillation du cristal est plus faible pour les harmoniques les plus grandes. A la onzième paire de couche déposée, cette profondeur de pénétration pour les harmoniques d'ordres 5 et 7 devient plus petite que l'épaisseur totale du film construit. Cela n'est pas le cas pour la fréquence fondamentale et l'harmonique d'ordre 3. Nous avons suivi la construction du film (PLL – HA)_m – (PLL – PGA)_n en QCM, mais compte tenu des limites présentées ci-dessus, *m* et *n* ont été réduits à 6.

4.3.1 Résultats expérimentaux

La figure 4.3.1 – 1 présente l'évolution de l'opposé de la variation de la fréquence divisée par l'ordre de l'harmonique ($\nu = 3$) (fréquence normalisée) en fonction de la couche de polyélectrolyte déposée. Les symboles (Δ) et (O) correspondent à deux expériences indépendantes de dépôt de (PLL – PGA)₆ sur un cristal de quartz couvert d'un film de SiO₂. Les symboles (\square) et (∇) correspondent à deux expériences indépendantes de la construction d'une strate (PGA – PLL)₆ sur un film précurseur (PLL – HA)₆ – PLL.

Les points expérimentaux sont ajustés par une loi de type :

$$\frac{-\Delta f}{\nu} = a + b \cdot e^{ck} \quad (4.3.1 - 1)$$

où :

- k correspond au nombre de couches déposées (n étant le nombre de paires de couches, $k = 2n$)
- Δf représente la variation de la fréquence de résonance
- ν est l'ordre de l'harmonique
- a, b, c sont des paramètres d'ajustement dont la signification physique est expliquée au paragraphe 4.2.2.

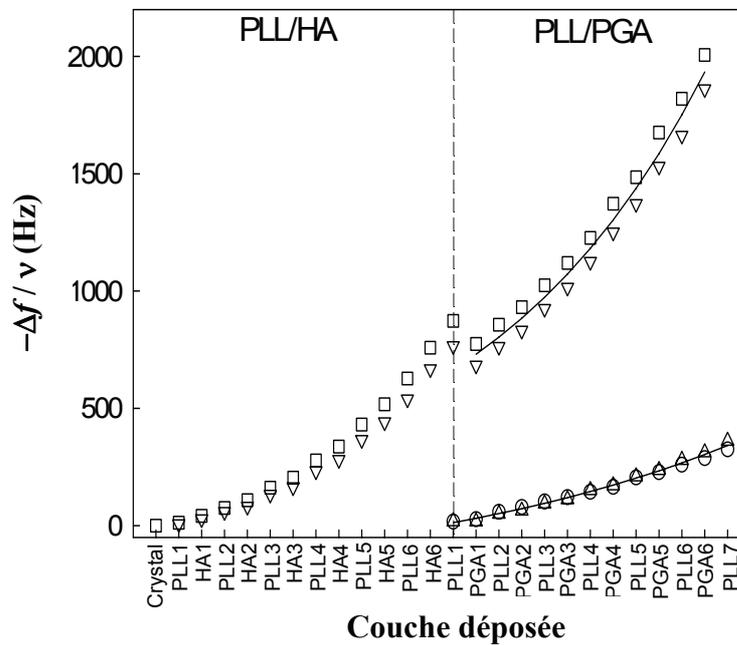


Figure 4.3.1 - 1 : Construction du film $(PLL - HA)_6 - (PLL - PGA)_6$ suivie par QCM. Représentation de l'opposé de la variation de la fréquence normalisée pour l'harmonique d'ordre 3 en fonction de la couche de polyélectrolyte déposée.

Les résultats de l'ajustement de cette loi à la croissance des films $(PLL - PGA)_6$ sur le cristal nu ou sur un film précurseur donnent les valeurs de b et c suivantes :

Substrat	b (Hz)	c
$(PLL - HA)_6 - PLL$	612	0.102
Cristal nu (SiO_2)	187.4	0.063

Il y a trois remarques à formuler à propos de la croissance de $(PLL - PGA)$ sur une surface de SiO_2 ou sur un film $(PLL - HA)$:

- on observe une diminution de la chute de fréquence de résonance au premier dépôt de PGA sur le film (PLL – HA)₆ – PLL;
- la croissance du film (PLL – PGA) est exponentielle, que ce soit pour une construction sur le cristal ou sur le film (PLL – HA)₆;
- cette croissance est plus importante lorsque le film (PLL – HA) est utilisé comme substrat de départ.

4.3.2 Interprétation des résultats

La chute de $-\frac{\Delta f}{\nu}$ lors du dépôt de la première couche de PGA peut être attribuée à une perte d'une fraction de l'eau contenue initialement dans le film. Cette perte d'eau s'accompagnerait d'une diminution de l'épaisseur du film. Celle-ci a été calculée à partir de la mesure des variations de l'opposé de la fréquence normalisée (pour la fréquence fondamentale et les trois harmoniques) et des facteurs de dissipation (cf. § 2.4) en prenant pour hypothèse que la densité du film est de 1 g/cm³. Cette évaluation conduit à des épaisseurs de 305 nm et 163 nm avant et après le dépôt de PGA, respectivement. Cette forte diminution d'épaisseur suggère que les chaînes de PGA pénètrent dans le film précurseur (PLL – HA) et qu'elles interagissent avec les chaînes de PLL libres. L'effet de ce premier dépôt de PGA sur la diffusion latérale de la PLL^{FITC} dans le film (PLL – HA)₃₀ par microscopie confocale sera présenté dans le paragraphe 4.4.1. afin de mettre en évidence l'interaction entre chaînes de PGA et de PLL.

Dans l'expression de la loi d'ajustement utilisée, le paramètre b est représentatif de la mesure de la croissance du film (PLL – PGA) pour les toutes premières couches, alors que le paramètre c est représentatif de la croissance des couches suivantes dans le régime exponentiel. Ces deux paramètres sont plus élevés dans le cas de la construction du film (PLL – PGA) sur le film (PLL – HA) que dans le cas de la construction sur le cristal de quartz nu. La valeur plus importante de b est probablement due à la capacité des chaînes de PLL à diffuser dans le film précurseur PLL – HA lors des dépôts des premières couches PLL – PGA, constituant ainsi un réservoir de chaînes libres. Ces chaînes libres peuvent participer à la construction du film (PGA – PLL) en diffusant vers l'extérieur du film PLL – HA lorsque la solution de PGA est injectée. En ce qui concerne les valeurs du paramètre c , le film précurseur (PLL – HA) modifie la croissance du film (PLL – PGA) qui devient plus forte. Ce

changement de croissance peut correspondre à une structure différente du film (PLL – PGA) ce qui peut modifier son comportement de barrière vis-à-vis de la protéine A. Cela sera étudié et présenté au paragraphe 4.5.

La croissance d'un film (PLL – PGA), qui est exponentiel, sur un film (PLL – HA), qui est également exponentiel, diffère de la croissance d'un film (PLL – HA) sur un film (PAH – PSS) qui, lui, est linéaire. Cet exemple a fait l'objet d'un précédent travail et concernait le film basé sur les polyélectrolytes poly(allylamine) (PAH) et poly(styrène sulfonate) (PSS) et déposé sur un film (PLL – HA) (cf. figure 4.3.2 – 1). Dans ce cas, la croissance du film (PLL – HA) est identique sur le film (PAH – PSS) et sur le cristal de quartz nu [Garza *et al.* 2004]. Ceci traduit probablement qu'aucun échange de chaînes de polyélectrolytes entre les différentes strates ne s'effectue.

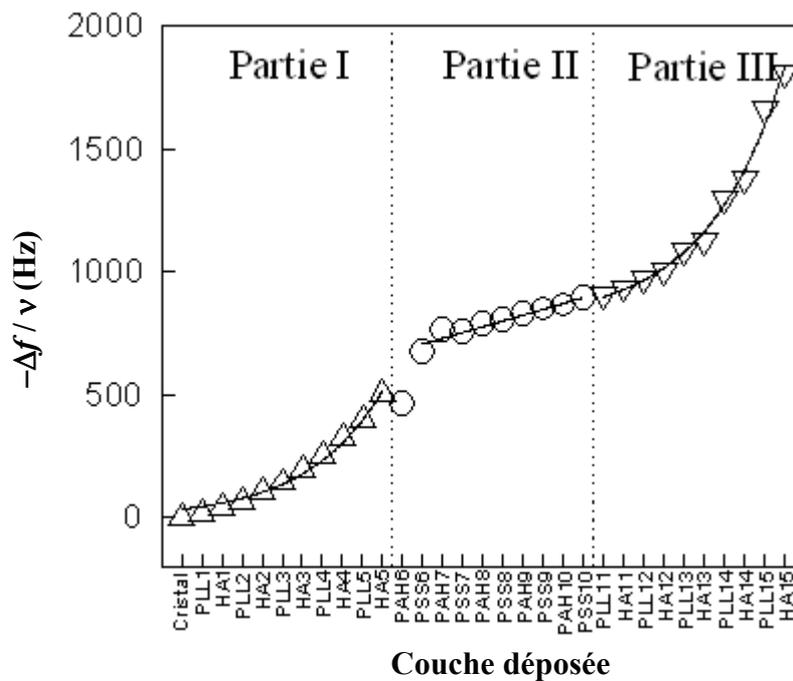


Figure 4.3.2 – 1 : Construction du film (PLL – HA)₅ – (PAH – PSS)₅ – (PLL – HA)₅ suivie par QCM. L'ajustement des points expérimentaux des parties I et III par l'équation 2.2.1 – 1 donne des valeurs de c égales à 0.27 et 0.26 respectivement. Les modes de croissance des deux films (PLL – HA)₅ sont donc identiques sur le cristal de quartz ou sur le film à croissance linéaire (PAH/PSS) [Garza *et al.* 2004].

Dans le paragraphe 4.4, nous allons étudier la croissance d'une strate (PLL – PGA) sur une strate (PLL – HA) en microscopie confocale pour déterminer la capacité des chaînes de PLL à diffuser latéralement dans chacune de ces strates. Une grande attention a aussi été portée à la diffusion des chaînes de PGA lors de leur premier dépôt sur film (PLL – HA) sous-

jaient ainsi qu'à la diffusion des chaînes de PLL dans les différentes strates à plusieurs stades de la croissance du film (PLL – PGA).

4.4 Films multistrates

4.4.1 Dépôt de la première couche de poly(acide L-glutamique) sur un film poly(L-lysine) – acide hyaluronique

Les résultats expérimentaux décrits au paragraphe 4.3 et concernant le premier dépôt de PGA sur le film $(PLL - HA)_6 - PLL$ suggèrent que les chaînes de PGA se complexent aux chaînes de PLL libres contenues dans le film.

Pour mettre en évidence la formation de ces complexes, une expérience en deux étapes a été réalisée :

- le contrôle par microscopie confocale de la capacité des chaînes de PGA^{AR} à diffuser dans toute l'épaisseur du film $(PLL - HA)_{30} - PLL^{FITC}$ (figure 4.4.1 – 1).
- une expérience de FRAP sur le film $(PLL - HA)_{30} - PLL^{FITC} - PGA$ afin d'évaluer la mobilité latérale des chaînes de PLL^{FITC} après le dépôt de PGA.

La figure 4.4.1 – 1 correspond à l'image acquise en microscopie confocale de la section d'un film $(PLL - HA)_{30} - PLL^{FITC} - PGA^{AR}$. Le dépôt de PLL^{FITC} au-dessus du film $(PLL - HA)_{30}$ permet un marquage de celui-ci sur toute son épaisseur. Les émissions de fluorescence de la PLL^{FITC} et du PGA^{AR} sont colocalisées sur l'entière épaisseur du film. Cela confirme que le PGA^{AR} a effectivement diffusé dans toute l'épaisseur du film.

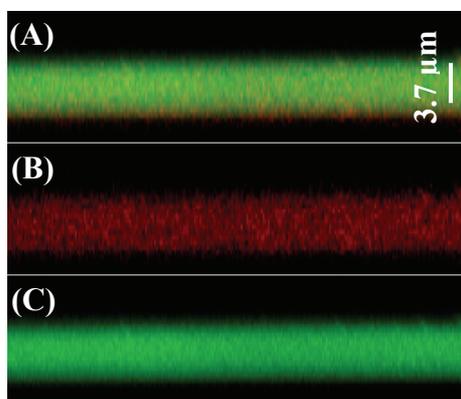


Figure 4.4.1 – 1 : Observation en microscopie confocale de la section en z d'un film $(PLL - HA)_{30} - PLL^{FITC} - PGA^{AR}$. (A) Somme de la fluorescence des images (B) et (C). (B) Canal rouge : fluorescence émise par le PGA^{AR} . (C) Canal vert : fluorescence émise par la PLL^{FITC} .

L'expérience de FRAP réalisée pour estimer la mobilité de la PLL^{FITC} au sein du film (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} – PGA^{AR} est résumée figure 4.4.1 – 2. Il est très intéressant de remarquer qu'aucun recouvrement de fluorescence n'est clairement détectable sur une période de mesure de 10 minutes, alors qu'une expérience similaire réalisée sur un film (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} démontrait un recouvrement important (figure 4.2.1 – 1). Le dépôt d'une couche de PGA semble donc fortement immobiliser les chaînes de PLL^{FITC} libres présentes dans le film (PLL – HA).

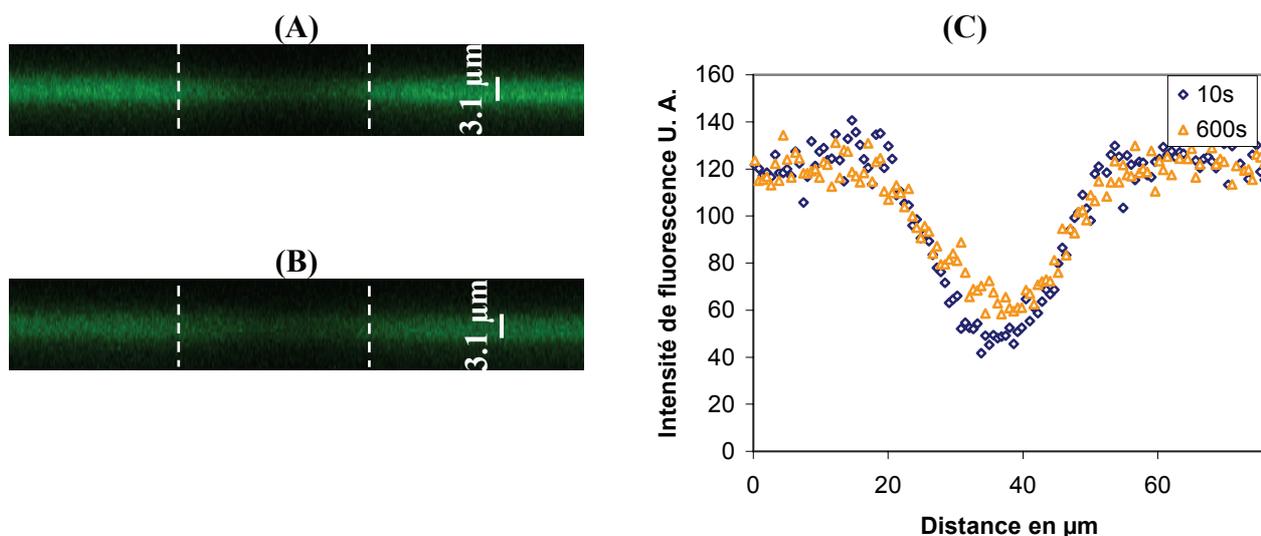


Figure 4.4.1 – 2 : Observation en microscopie confocale de la section en z d'un film (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} – PGA. Images du film (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} – PGA (A) 10s et (B) 600s après le photoblanchiment. La zone de photoblanchiment est délimitée par les pointillés blancs. (C) Profils d'intensité de fluorescence de la PLL^{FITC} correspondants suivant l'axe z .

Les résultats de ces expériences (diffusion des chaînes de PGA^{AR} dans le film, immobilité des chaînes de PLL^{FITC} après dépôt de PGA) indiquent qu'il est probable que les chaînes de PLL^{FITC} soient complexées par les chaînes de PGA.

4.4.2 Dépôt de n paires de couches poly(acide L-glutamique) – poly(L-lysine) sur un film poly(L-lysine) – acide hyaluronique

Dans ce paragraphe, nous présentons les résultats obtenus en microscopie confocale à propos de strates (PGA – PLL) _{n} déposées sur une strate (PLL – HA)₃₀ – PLL*, pour différentes valeurs de n ($n = 1, 2, 4$ et 10). PLL* correspond selon les expériences à différents

marquages de la PLL, c'est-à-dire PLL^{FITC} ou PLL^{Rho}. De même, la dernière couche de PLL de la strate (PGA – PLL)_n est soit marquée à la rhodamine, soit marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine.

- **(PGA – PLL)₁**

Le film (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} – PGA – PLL^{Rho} a été construit afin de contrôler la capacité des chaînes de PLL^{Rho} à diffuser au sein du film (PLL – HA) malgré la couche de PGA. L'image de microscopie confocale (figure 4.4.2 – 1) nous indique que la PLL^{Rho} déposée sur PGA s'accumule de manière importante au sommet du film et semble avoir de la difficulté à diffuser dans toute l'épaisseur du film. Cette accumulation de PLL^{Rho} en surface peut être due à la formation préalable de complexes PLL^{FITC} – PGA limitant ensuite la diffusion dans toute l'épaisseur du film de nouvelles chaînes de PLL. Ces complexes PLL – PGA en surface joueraient ainsi un rôle partiel de barrière vis-à-vis des chaînes de PLL déposées par la suite.

La faible accumulation de PLL^{FITC} en surface pourrait être due à une interaction des chaînes de PLL plus favorable avec les chaînes PGA qu'avec celles de HA. Les expériences de FRAP sur (PLL – PGA)_n qui démontrent que les chaînes de PLL^{FITC} sont immobiles vont dans le sens d'une forte affinité de la PLL pour PGA.

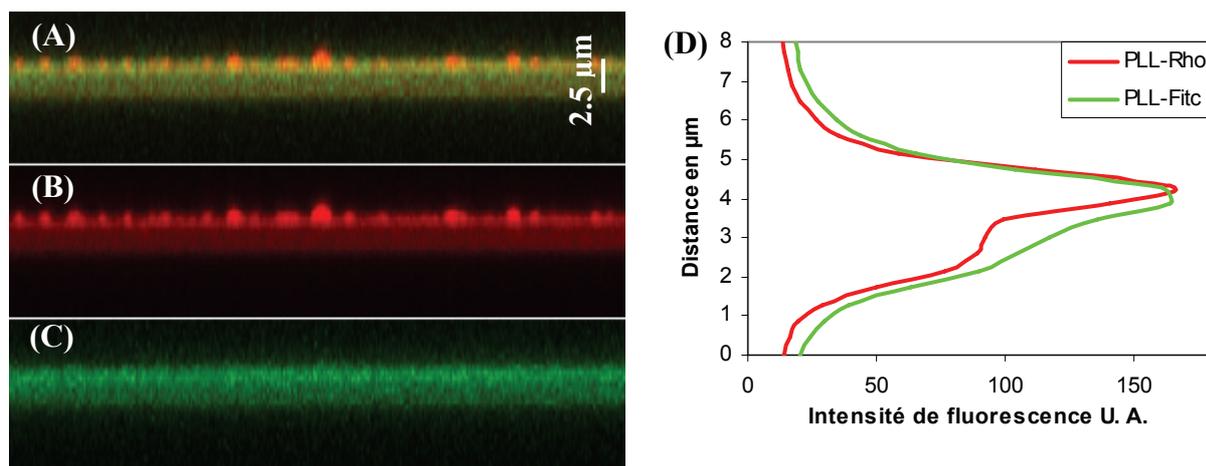


Figure 4.4.2 – 1 : Observation en microscopie confocale de la section en z d'un film du film (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} – PGA – PLL^{Rho}. (A) Somme de la fluorescence des images (B) et (C). (B) Canal rouge : fluorescence émise par la PLL^{Rho}. (C) Canal vert : fluorescence émise par la PLL^{FITC} (D) Profil d'intensité de fluorescence de la PLL^{Rho} et la PLL^{FITC} suivant l'axe z.

- (PGA – PLL)₂

L'observation de la construction (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} – PGA – PLL – PGA – PLL^{Rho}, met une nouvelle fois en évidence un front de fluorescence en surface dû à l'accumulation de PLL^{Rho} (figures 4.4.2 – 2). Ce résultat confirme celui obtenu préalablement pour un dépôt de (PGA – PLL)₁.

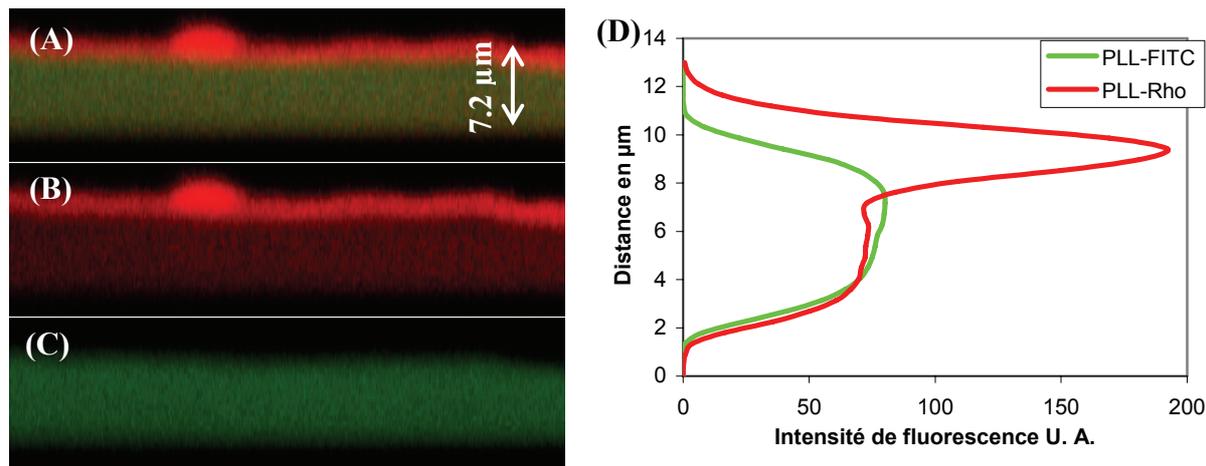


Figure 4.4.2 – 2 : Observation en microscopie confocale de la section en z d'un film du film (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} – PGA – PLL – PGA – PLL^{Rho}. (A) Somme de la fluorescence des images (B) et (C). (B) Canal rouge : fluorescence émise par la PLL^{Rho}. (C) Canal vert : fluorescence émise par la PLL^{FITC} (D) Profil d'intensité de fluorescence de la PLL^{Rho} et la PLL^{FITC} suivant l'axe z.

Les profils de fluorescence de la PLL^{Rho} déposée en dernière couche dans le cas de (PGA – PLL) et (PGA – PLL)₂, indiquent que le film n'est probablement plus homogène suivant l'axe z. Une quantité importante de PLL^{Rho} s'adsorbe en surface. Il est intéressant de remarquer que dans le cas du dépôt (PGA – PLL)₂, la zone d'accumulation de PLL^{Rho} ne contient pas de PLL^{FITC}. L'intensité de fluorescence émise par la PLL^{FITC} est très faible pour la position en z où l'intensité de fluorescence émise par la PLL^{Rho} est maximale.

Un unique dépôt de PGA d'une part bloque la mobilité latérale des chaînes de PLL contenues dans le film (PLL – HA) (figure 4.4.1 – 2) et, d'autre part, implique un effet partiel de barrière vis-à-vis de la pénétration de chaînes de PLL (figure 4.4.2 – 1&2).

Notre but était de créer un système où le film (PLL – HA) constituerait un réservoir de chaînes de PLL et où le film (PLL – PGA) en surface confinerait les chaînes de PLL dans le film réservoir d'une part et agirait comme barrière vis-à-vis de la diffusion de nouvelles chaînes de PLL lors d'un dépôt ultérieur. Ainsi, le système (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} – PGA –

PLL – PGA – PLL^{Rho} ne remplit pas encore totalement les conditions d'un système réservoir + barrière. Néanmoins, les résultats obtenus nous ont incités à poursuivre la construction du film (PGA – PLL)_n avec *n* égal à 4 et 10 paires de couches afin de contrôler si l'effet de barrière devient totalement efficace. Ces résultats sont présentés dans le paragraphe suivant.

- **(PGA – PLL)_{n = 4 et 10}**

Le dépôt de deux paires de couches de (PGA – PLL) n'est pas suffisant pour créer un effet barrière. Dans ce paragraphe, nous présentons les résultats obtenus sur des structures (PLL – HA)₃₀ – PLL^{Rho} – (PGA – PLL)_n – PGA – PLL^{FITC} où le nombre *n* de paires de couches (PGA – PLL) est plus important (*n* = 4 et 10).

La partie **(I)** de la figure 4.4.2 – 3 représente un film (PLL – HA) – PLL^{Rho} – PGA – PLL^{FITC}. Il s'agit d'une construction identique à celle présentée sur la figure 4.4.2 – 1, cependant les positions des deux polyélectrolytes fluorescents sont inversées. Les parties **(II)** et **(III)** décrivent les images de microscopie confocale et les profils de fluorescence pour *n* = 4 et *n* = 10 paires de couches de (PGA – PLL). Pour ces deux architectures, on distingue clairement que les chaînes de PLL^{FITC} diffusent uniquement dans la partie supérieure du film, et ne semblent donc pas diffuser à l'intérieur du film (PLL – HA)₃₀. En effet, la superposition des profils de fluorescence vert et rouge est nettement moins importante pour *n* = 4 (partie **(II)**) que pour *n* = 0 (partie **(I)**), et elle est encore plus faible pour *n* = 10 (partie **(III)**). Cela indique que les chaînes de PLL^{FITC} pénètrent peu (*n* = 4) ou pas du tout (*n* = 10) dans le film précurseur (PLL – HA).

Le recouvrement résiduel que l'on peut encore apercevoir est probablement lié à l'appareillage (résolution, bruit de fond, reconstruction de l'image, ...). Pour *n* = 10, nous pouvons raisonnablement considérer que les chaînes de PLL^{Rho} et la PLL^{FITC} sont situées respectivement dans la partie constituée de (PLL – HA) et de (PLL – PGA), les maxima des deux profils de fluorescence étant séparés d'une distance d'environ 2 μm.

Le système (PLL – HA)_m – (PLL – PGA)_n dans ces conditions constitue un système de deux réservoirs distincts pour les chaînes de PLL. En effet, le film (PLL – PGA) constitue une barrière vis-à-vis de la diffusion des chaînes de PLL dans le film (PLL – HA). Il est cependant particulièrement intéressant de remarquer que le film (PLL – PGA) peut jouer le rôle d'un réservoir de chaînes de PLL. Il serait possible d'élaborer un film multicouche constitué d'un type de biomolécules contenu dans la strate (PLL – HA), et d'un autre type contenu dans la

strate (PLL – PGA). Une des stratégies pouvant permettre une telle structuration consisterait à coupler les biomolécules à la poly(L-lysine) [Chluba *et al.* 2001].

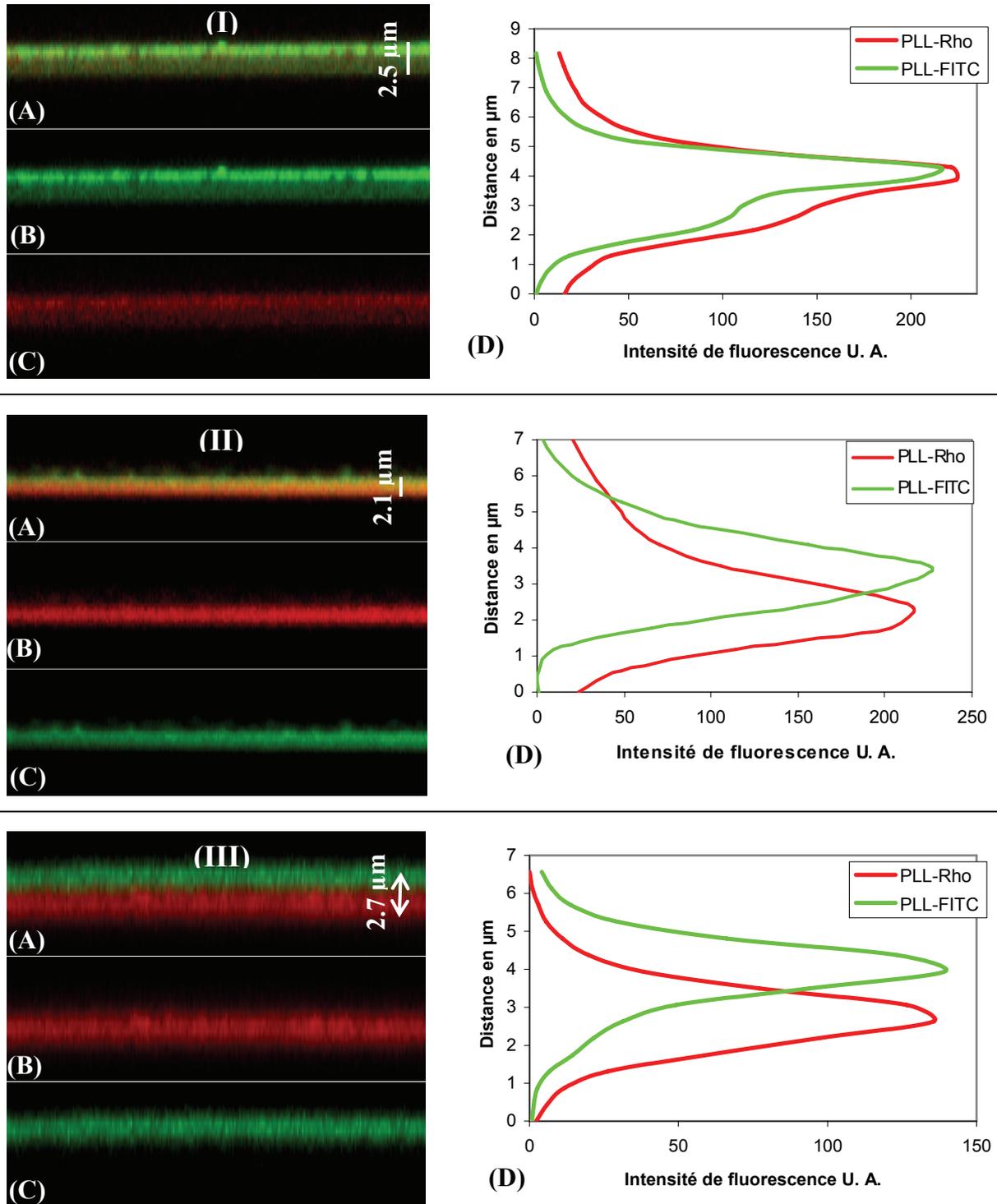


Figure 4.4.2 – 3 : Observation en microscopie confocale de sections en z de films $(PLL - HA)_{30} - PLL^{Rho} - (PGA - PLL)_n - PGA - PLL^{FITC}$ pour (I) $n = 0$, (II) $n = 4$, (III) $n = 10$. (A) Somme de la fluorescence des images (B) et (C). (B) Canal rouge : fluorescence émise par la PLL^{Rho} . (C) Canal vert : fluorescence émise par la PLL^{FITC} . (D) Profils de fluorescence de la PLL^{FITC} et PLL^{Rho} correspondants suivant l'axe z.

- **Mobilité de la poly(L-lysine) dans les films multistrates contenant une strate (PGA – PLL)₁₀.**

Des expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment ont été réalisées sur le film (PLL – HA)₃₀ – PLL^{Rho} – (PGA – PLL)₁₀ – PGA – PLL^{FITC} (figure 4.4.2 – 4 (A)). Les chaînes de PLL^{FITC}, marquant la strate (PGA – PLL), et les chaînes de PLL^{Rho}, marquant la strate (PLL – HA), ont été photoblanchies et le film a été imagé 10 et 1580 secondes après ce photoblanchiment (figure 4.4.2 – 4 (B) et (C)). La comparaison des profils de fluorescence des PLL^{FITC} et PLL^{Rho} obtenus 10 et 1580 secondes après le photoblanchiment indique que la poly(L-lysine) est immobile quelle que soit la strate observée (figure 4.4.2 – 4 (D) et (E)). De plus, une expérience de FRAP réalisée sur la PLL^{FITC} marquant la strate (PLL – HA) d'un film (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} – (PGA – PLL)₁₀ – PGA – PLL^{Rho} n'a montré aucun recouvrement de fluorescence entre deux images obtenues 10 et 1800 secondes après le photoblanchiment. Cette expérience confirme que la perte de mobilité de la PLL est probablement une propriété intrinsèque des chaînes au sein du film et est indépendante du type de marqueur utilisé.

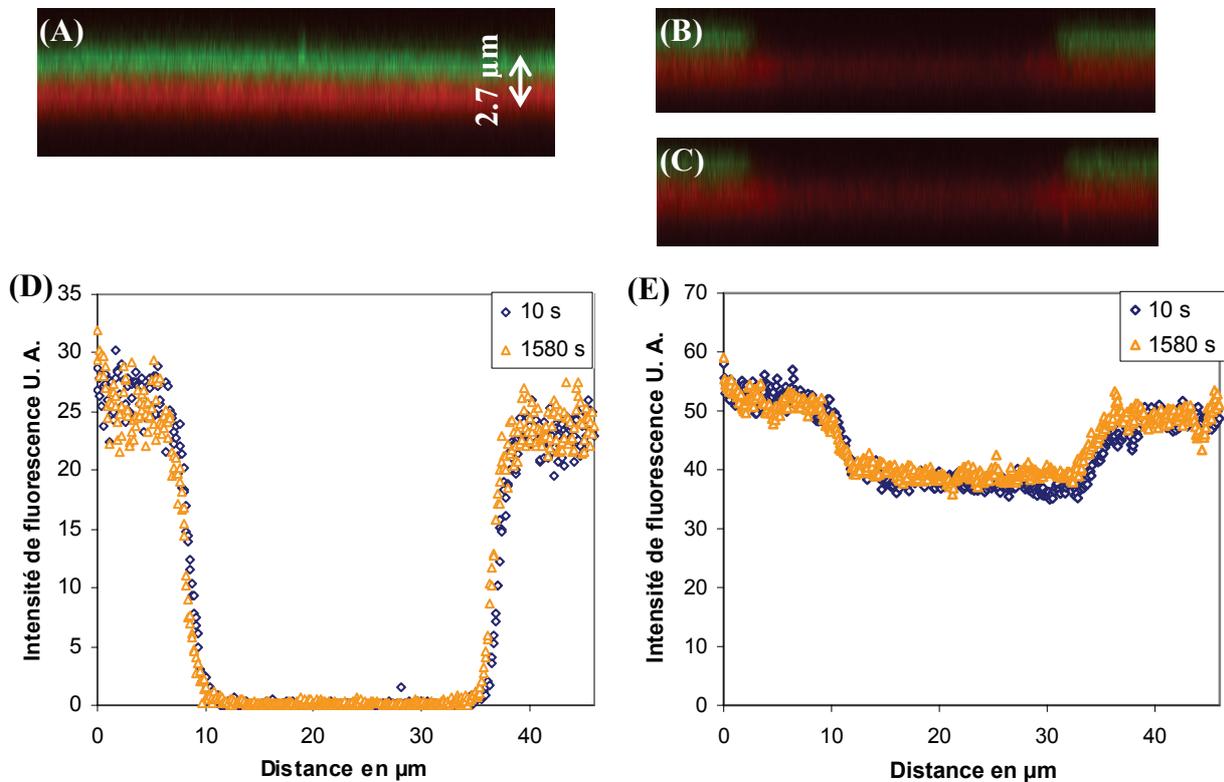


Figure 4.4.2 – 4 : Image de microscopie confocale du film (A) (PLL – HA)₃₀ – PLL^{Rho} – (PGA – PLL)₁₀ – PGA – PLL^{FITC}. Image de la section du film 10 s (B) et 1580 s (C) après photoblanchiment. Profils de fluorescence pour ces deux temps de la PLL^{FITC} (D) et de la PLL^{Rho} (E) suivant l'axe z.

Par la suite, il nous a semblé intéressant de vérifier s'il existait des phénomènes d'échange entre les chaînes de PGA de la solution et les chaînes de HA du film (PLL – HA).

4.4.3 Étude complémentaire : échange poly(acide L-glutamique) / acide hyaluronique

Dans cette section, nous nous intéressons au dépôt de PGA sur un film (PLL – HA) se terminant par HA, afin de démontrer la présence éventuelle de phénomènes d'échange du HA par le PGA.

Les intensités de fluorescence du PGA^{AR} à la fin de son dépôt (10 minutes) sur un film (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} – HA et après l'étape de rinçage (10 minutes dans une solution de NaCl à 0.15 M et à pH = 6.0) sont comparées afin de contrôler si les chaînes de PGA se maintenaient ou non dans le film (figure 4.4.3 – 1). Cela doit permettre de juger la présence d'un éventuel phénomène d'échange entre les chaînes de HA fixées dans le film et les chaînes de PGA issues de la solution injectée.

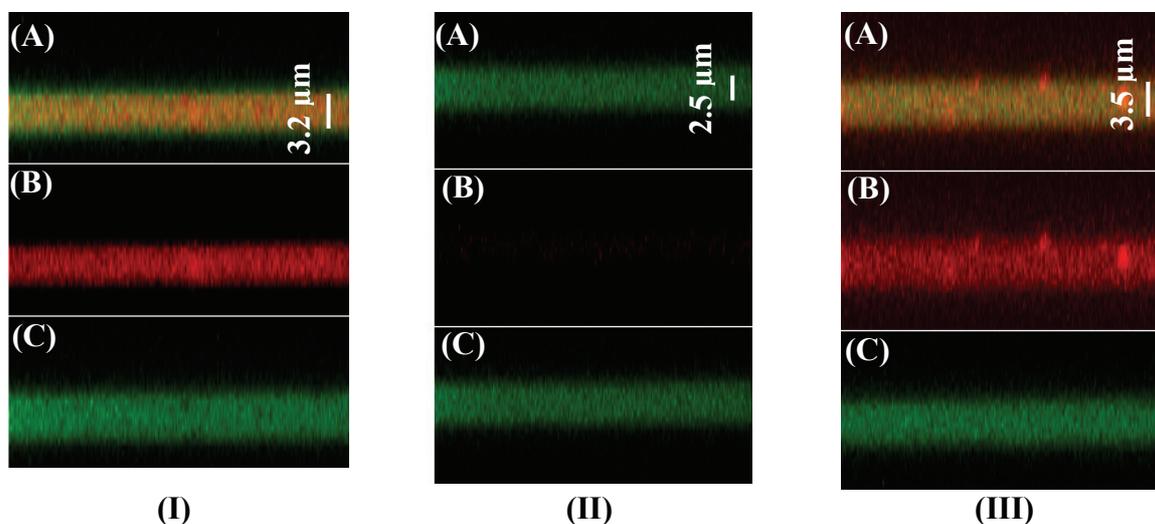


Figure 4.4.3 – 1 : Observation en microscopie confocale de sections en z du film (PLL – HA)₁₉ – (PLL^{FITC} – HA) – (PLL – HA)₁₀ – PGA^{AR}. (I) Section du film à la fin du temps de dépôt du PGA^{AR}, juste avant l'étape de rinçage; (II) Section du film à la fin des 10 minutes de rinçage. La sensibilité de détection est la même pour les images de la série (I) et (II). (III) La sensibilité de détection du microscope confocal est augmentée par rapport à l'image (II). Images (A) : Somme de la fluorescence des images (B) et (C). Images (B) : Canal rouge : fluorescence émise par la PGA^{AR}. Images (C) : Canal vert : fluorescence émise par la PLL^{FITC}.

En conservant les mêmes réglages des paramètres d'acquisition de l'image au microscope confocal pour les images (I) et (II) de la figure 4.4.3 – 1, nous remarquons que le

niveau de fluorescence du PGA^{AR} a fortement diminué après le rinçage. Cela prouve que la majeure partie des chaînes de PGA^{AR} ne s'est pas fixée dans le film. Néanmoins, en augmentant la sensibilité de détection (figure 4.4.3 – 1 (III)), on observe encore de la fluorescence due à la présence de PGA^{AR} dans le film. Il est difficile de comparer les différents niveaux d'intensité de fluorescence entre eux, mais la quantité résiduelle de PGA^{AR} dans le film est très faible par rapport à celle présente juste avant le rinçage (quelques pourcents au maximum). Le processus d'échange entre les chaînes de PGA^{AR} et des chaînes de HA semble donc très limité.

Les macromolécules que nous désirons insérer dans les films peuvent être par exemple des biomolécules couplées à la poly(L-lysine) mais également des protéines, peptides, ou médicaments [Vodouhê *et al.* 2006] sous une forme non couplée. L'objectif final de cette étude est de créer un système contenant une barrière dégradable par des cellules cultivées en surface, pour permettre une interaction contrôlée dans le temps entre ces cellules et les biomolécules contenues dans les différentes strates. Dans le paragraphe suivant, le système réservoir + barrière décrit précédemment va être appliqué au cas de la protéine A.

4.5 Film multistrates et protéine A

4.5.1 Comportement de la protéine A dans les films à croissance exponentielle

- **Film (PLL – PGA) et protéine A**

Jessel *et al.* ont démontré le rôle de barrière d'un film (PLL – PGA) vis-à-vis de la protéine A. Ils ont observé en microscopie confocale un film composé d'une vingtaine de paires de couches de PLL – PGA au sein duquel la protéine A a été insérée. La protéine A utilisée est marquée par un fluorophore, le « Texas Red », (noté TR, soit pour la protéine marquée : PA^{TR}). Ce fluorophore possède quasiment les mêmes caractéristiques de fluorescence que l'« Alexa Red » en termes de longueur d'onde d'absorption et d'émission (592 et 613 nm respectivement, ce qui correspond à une émission dans le rouge). La construction réalisée correspondait au film PEI – PGA – PLL – PA^{TR} – (PGA – PLL)₁₉ – PGA – PLL^{FITC}. La PEI (poly(éthylène imine)) est la première couche déposée sur le substrat de verre et est utilisée en tant que couche "précurseur". Le dernier dépôt réalisé est une couche de PLL^{FITC} qui diffuse dans toute l'épaisseur du film et le marque en vert sur toute sa section (figure 4.5.1 – 1) comme décrit précédemment dans la partie 4.2.2. La protéine A marquée au « Texas Red » reste confinée au niveau de sa position de dépôt, malgré la construction de 20 paires de couches de (PGA – PLL) au-dessus. Ce résultat suggère que le film PGA – PLL joue probablement le rôle d'une barrière vis-à-vis de la protéine A.

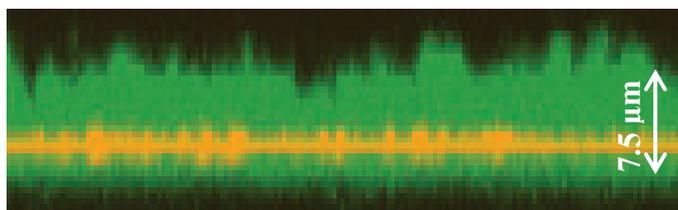


Figure 4.5.1 – 1 : Observation en microscopie confocale de la section en z d'un film PEI – PGA – PLL – PA^{TR} – (PGA – PLL)₁₉ – PGA – PLL^{FITC} [Jessel *et al.* 2003]. La bande de fluorescence orange correspond à la position de la protéine A et la fluorescence verte correspond à la position de la PLL^{FITC}.

- **Film (PLL – HA) et protéine A**

A notre connaissance, aucune étude n'avait été réalisée sur la fonctionnalisation d'un film composé de poly(L-lysine) et d'acide hyaluronique par la protéine A. Nous avons donc dans un premier temps testé le dépôt de la protéine A marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (PA^{FITC}) sur un film $(PLL - HA)_{30} - PLL$. Comme nous l'indique la figure 4.5.1 – 2, la protéine A diffuse dans toute l'épaisseur du film, ce dernier se comportant ainsi comme un réservoir. Lorsque la solution de la protéine A déposée est concentrée (1 mg / mL), on observe la présence d'agrégats en surface du film (Figure 4.5.1 – 2 (A)). Il s'agit probablement de complexes $PA^{FITC} - PLL$. Cependant pour une concentration de la solution de la protéine A plus faible (0.1 mg / mL), ce phénomène n'est pas observé (figure 4.5.1 – 2 (B)).

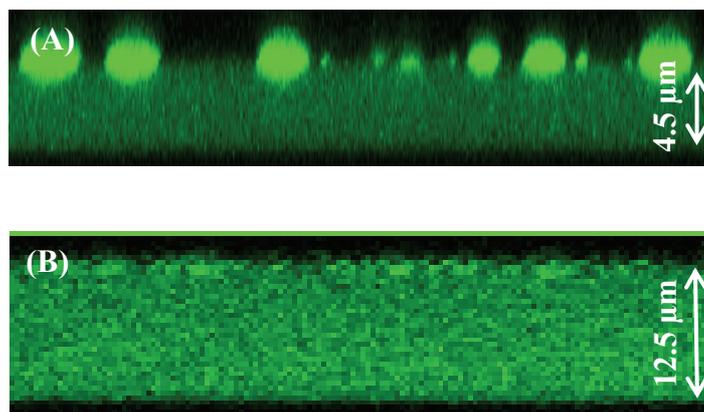


Figure 4.5.1 – 2 : Observation en microscopie confocale de la section en z d'un film $(PLL - HA)_{30} - PLL - PA^{FITC}$. La solution de PA^{FITC} déposée est à une concentration de 1 mg / ml (A) ou de 0.1 mg / mL (B).

Le comportement de la protéine A insérée dans les films à croissance exponentielle $(PLL - HA)$ et $(PLL - PGA)$ nous permet de disposer d'un système réservoir et d'un système barrière respectivement. L'insertion de la protéine A dans un film multistratifié basé sur les deux structures $(PLL - HA)$ et $(PLL - PGA)$ (cf. §4.4) paraît donc très prometteuse dans l'optique de confiner dans un film la protéine A à différents niveaux. Nous en discutons dans le paragraphe suivant.

4.5.2 Comportement de la protéine A dans les films multistrates

Dans ce paragraphe, nous résumons les résultats obtenus sur l'application des films multistrates en tant que réservoirs de biomolécules telles que la protéine A. Dans un premier temps, un film réservoir / barrière a été réalisé afin de vérifier que le film (PLL – PGA) se comportait également comme une barrière vis-à-vis de la protéine A. Nous avons ensuite construit un film réservoir / barrière / réservoir. Ceci a permis de tester la possibilité de confiner deux dépôts de protéine A dans deux réservoirs différents.

- **Système réservoir / barrière**

Le film (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} – (PGA – PLL)₁₀ a été construit. Nous avons démontré auparavant que pour ce type d'architecture, la PLL^{FITC} restait confinée dans la strate (PLL – HA)₃₀ (figure 4.4.2 – 3). Un dépôt de protéine A marquée au « Texas Red » sur ce film devrait par contre donner lieu à une adsorption localisée en surface si la propriété de barrière de (PLL – PGA)₁₀ vis-à-vis de la protéine A se confirmait pour cette construction.

La figure 4.5.2 – 1 représente une section du film (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} – (PGA – PLL)₁₀ – PA^{TR} visualisée en microscopie confocale. Nous remarquons tout d'abord que la protéine marquée en rouge ne semble pas diffuser jusqu'à la strate (PLL – HA)₃₀ marquée en vert. La protéine A est clairement confinée à la surface du film, même si des infiltrations de celle-ci sont présentes dans la strate (PLL – PGA)₁₀. Il est donc très intéressant de noter que la partie (PLL – PGA)₁₀ n'est pas totalement marquée en rouge, confirmant ainsi la propriété de barrière de ce système vis-à-vis de la protéine A. Les infiltrations de la protéine peuvent être dues à la présence d'irrégularités et d'imperfections à la surface du film.

Le tracé des profils de fluorescence renforce l'observation de l'image de microscopie confocale sur le confinement de la protéine A à la surface du film : les maxima des deux distributions de fluorescence sont séparés d'une distance d'environ 4 µm, tandis que l'épaisseur du film est approximativement de 5 µm.

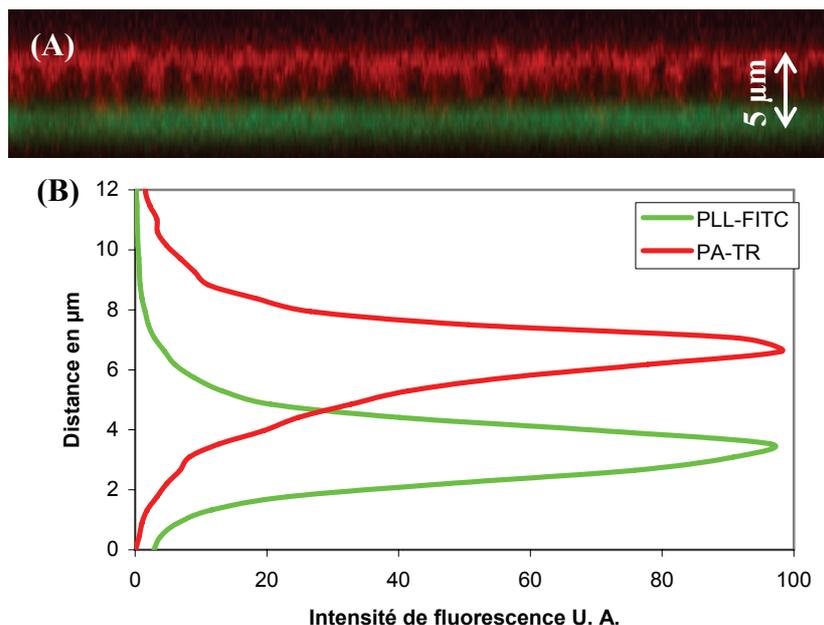


Figure 4.5.2 – 1 : (A) Observation en microscopie confocale de la section en z d'un film $(\text{PLL} - \text{HA})_{30} - \text{PLL}^{\text{FITC}} - (\text{PGA} - \text{PLL})_{10} - \text{PA}^{\text{TR}}$. La bande de fluorescence rouge correspond à la position de la protéine A et la fluorescence verte correspond à la position de la PLL^{FITC} . (B) Profils de fluorescence de la PLL^{FITC} et de la PLL^{Rho} correspondants suivant l'axe z .

- **Système réservoir / barrière / réservoir**

La propriété de barrière du film $(\text{PLL} - \text{PGA})$ construit sur un film $(\text{PLL} - \text{HA})$ ayant été vérifiée, nous avons ajouté sur cet ensemble un réservoir supplémentaire : l'architecture est alors constituée de l'ensemble réservoir / barrière / réservoir. Nous avons déposé sur chaque réservoir la protéine A marquée soit à l'isothiocyanate de fluorescéine, soit au « Texas Red » au cours de la construction. Le film est finalement représenté par la séquence suivante : $(\text{PLL} - \text{HA})_{30} - \text{PLL} - \text{PA}^{\text{FITC}} - \text{PLL} - \text{HA} - (\text{PLL} - \text{PGA})_{10} - (\text{PLL} - \text{HA})_{10} - \text{PLL} - \text{PA}^{\text{TR}}$.

La figure 4.5.2 – 2 représente l'image de microscopie confocale correspondant à la section d'une telle construction. La protéine A marquée en rouge reste confinée dans le réservoir $(\text{PLL} - \text{HA})_{10}$, et une bande noire sans fluorescence la sépare du réservoir $(\text{PLL} - \text{HA})_{30}$ contenant la protéine A marquée en vert. La bande non fluorescente correspond probablement à la strate $(\text{PLL} - \text{PGA})_{10}$.

La fluorescence verte de la protéine A est principalement présente dans la strate $(\text{PLL} - \text{HA})_{30}$, mais elle est cependant faiblement détectable dans le réservoir supérieur qui contient la protéine A marquée en rouge. Cette présence dans la partie supérieure du film peut être due au fait que la protéine a été déposée en dernière couche du film $(\text{PLL} - \text{HA})_{30}$. Ainsi, au début

de la construction (PLL – PGA)₁₀, une proportion de la protéine a pu être mélangée à la nouvelle strate sur la partie supérieure du film lors de la diffusion du PGA dans la partie (PLL – HA)₃₀. Le phénomène de barrière étant présent dès le dépôt de la première paire de couches (PLL – PGA), la fraction de protéine chassée dans la strate supérieure du film n'a pas pu pénétrer à nouveau dans le film (PLL – HA)₃₀. Un enfouissement plus profond de la PA^{FITC} au sein du film (PLL – HA) ou une barrière (PLL – PGA) constituée d'un plus grand nombre de couches pourrait limiter ce phénomène.

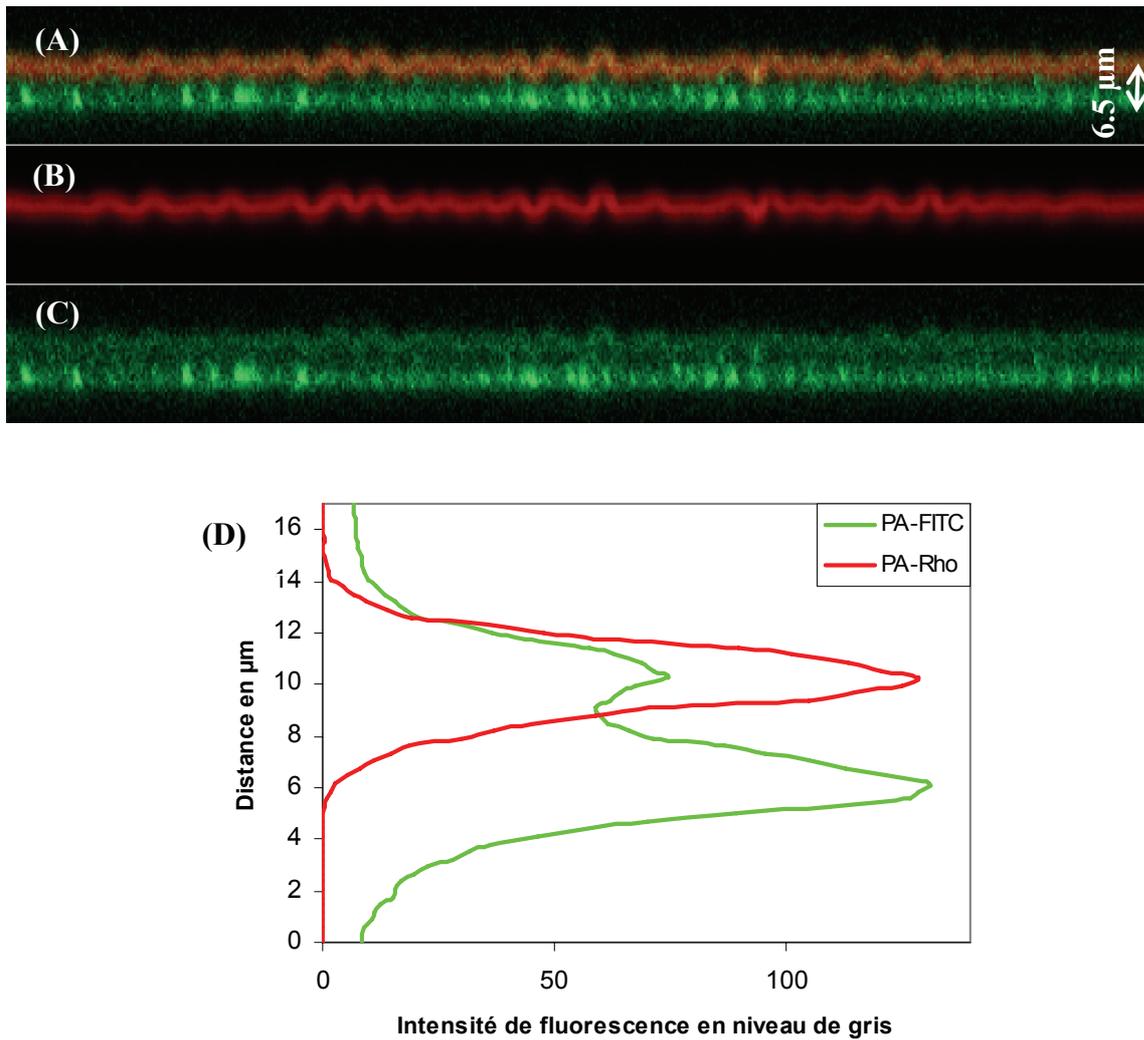


Figure 4.5.2 – 2 : Observation en microscopie confocale de la section en z d'un film (PLL – HA)₃₀ – PLL – PA^{FITC} – PLL – HA – (PLL – PGA)₁₀ – (PLL – HA)₁₀ – PLL – PA^{TR}. (A) Somme de la fluorescence des images (B) et (C). (B) Canal rouge : fluorescence émise par la PA^{TR}. (C) Canal vert : fluorescence émise par la PA^{FITC}. (D) Profils de fluorescence de la PA^{FITC} et PA^{TR} correspondants suivant l'axe z .

Ces résultats sont particulièrement intéressants pour la conception de recouvrements bioactifs sur les surfaces de biomatériaux. La présence de biomolécules placées à différentes profondeurs dans un film multistraté peut permettre par exemple de moduler la réponse cellulaire dans le temps. Des cellules cultivées en surface seront en contact successivement avec les différents réservoirs et donc avec les différentes biomolécules contenues à l'intérieur. L'intervalle de temps entre deux contacts peut être régulé par le nombre de couches constituant la barrière (PLL – PGA) que les cellules devront dégrader.

4.6 Conclusion du chapitre

Les résultats décrits dans ce chapitre concernent l'élaboration de films multicouches constitués par l'association de strates de compositions différentes [Jourdainne *et al.* 2007]. Chacune de ces strates correspond à un film multicouche basé soit sur le couple (PLL – HA) soit sur le couple (PLL – PGA). Construits individuellement sur un substrat, ces films présentent une croissance exponentielle de leur épaisseur.

Il a été montré que la croissance d'un film (PLL – PGA) sur un film (PLL – HA) restait exponentielle et qu'elle était même plus importante que dans le cas d'une construction sur le substrat nu.

Le premier dépôt de PGA sur le film (PLL – HA) modifie considérablement la structure de ce dernier : à la perte d'eau et la perte d'épaisseur s'ajoute une complexation des chaînes libres de PLL par les chaînes de PGA, bloquant alors toute diffusion latérale des chaînes de PLL. Ce dépôt de PGA réduit aussi considérablement la diffusion de nouvelles chaînes de PLL au sein du film.

L'augmentation du nombre de paires de couches de (PLL – PGA) déposées amplifie ce phénomène : dans le cas d'un film $(PLL - HA)_{30} - PLL^{FITC} - (PGA - PLL)_{10} - PGA - PLL^{Rho}$, les chaînes de PLL^{FITC} restent confinées dans la strate (PLL – HA) tandis que celles de PLL^{Rho} restent confinées dans la strate (PLL – PGA).

La conception d'un film multistraté $(PLL - HA)_m - (PLL - PGA)_n - (PLL - HA)_k$ dans lequel la protéine A est insérée est particulièrement prometteuse. En effet, dans chaque strate (PLL – HA) la protéine A marquée par un fluorophore différent a été insérée. L'observation en microscopie confocale a montré que chaque type de protéine A marquée reste stocké dans son film (PLL – HA), tandis qu'une bande noire apparaît entre les deux zones fluorescentes, correspondant à la strate (PLL – PGA). Celle-ci se comporte ainsi comme une barrière à la diffusion de la protéine A au sein de toute l'épaisseur du film.

Ce résultat est très encourageant car un système incluant une barrière biodégradable est désormais disponible. Il peut permettre le recouvrement d'une surface par un film bioactif contenant plusieurs facteurs biologiques. Il semble dorénavant possible d'induire une cascade de réponses cellulaires spécifiques contrôlées dans le temps grâce à l'accès successif des cellules aux biomolécules contenues dans les différents réservoirs.

Bibliographie

- N. Benkirane-Jessel, P. Lavalley, E. Hubsch, V. Holl, B. Senger, Y. Haikel, J.-C. Voegel, J. Ogier, and P. Schaaf. **2005**. Short-time timing of the biological activity of functionalized polyelectrolyte multilayers. *Adv. Funct. Mater.* 15:648-654.
- F. Boulmedais, M. Bozonnet, P. Schwinté, J.-C. Voegel, and P. Schaaf. **2003**. Multilayered polypeptide films: secondary structures and effect of various stresses. *Langmuir* 19:9873-9882.
- J. Chluba, J.-C. Voegel, G. Decher, P. Erbacher, P. Schaaf, and J. Ogier. **2001**. Peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity. *Biomacromolecules* 2:800-805.
- J. M. Garza, N. Jessel, G. Ladam, V. Dupray, S. Muller, J.-F. Stoltz, P. Schaaf, J.-C. Voegel, and P. Lavalley. **2005**. Polyelectrolyte multilayers and degradable polymer layers as multicompartment films. *Langmuir* 21:12372-12377.
- J. M. Garza, P. Schaaf, S. Muller, V. Ball, J.-F. Stoltz, J.-C. Voegel, and P. Lavalley. **2004**. Multicompartment films made of alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth. *Langmuir* 20:7298-7302.
- A. C. Ghose, A. Mookerjee, K. Sengupta, A. K. Ghosh, S. Dasgupta, and P. K. Ray. **1999**. Therapeutic and prophylactic uses of protein A in the control of *Leishmania donovani* infection in experimental animals. *Immunol. Lett.* 65:175-181.
- N. Jessel, F. Atalar, P. Lavalley, J. Mutterer, G. Decher, P. Schaaf, J.-C. Voegel, and J. Ogier. **2003**. Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins. *Adv. Mater.* 15:692-695.
- L. Jourdainne, Y. Arntz, B. Senger, C. Debry, J.-C. Voegel, P. Schaaf, and P. Lavalley. **2007**. Multiple strata of exponentially growing polyelectrolyte multilayer films. *Macromolecules* 40:316-321.

- S. Kumar, Y. Shukla, A. K. Prasad, A. S. Verma, P. D. Dwivedi, N. K. Mehrotra, and P. K. Ray. **1992**. Protection against 7,12-dimethylbenzanthracene-induced tumour initiation by protein A in mouse skin. *Cancer Lett.* 61:105-110.
- P. Lavalle, C. Gergely, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, J.-C. Voegel, and C. Picart. **2002**. Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: An in situ atomic force microscopy study. *Macromolecules* 35:4458-4465.
- P. Lavalle, V. Vivet, N. Jessel, G. Decher, J.-C. Voegel, P. J. Mesini, and P. Schaaf. **2004**. Direct evidence for vertical diffusion and exchange processes of polyanions and polycations in polyelectrolyte multilayer films. *Macromolecules* 37:1159-1162.
- E. Lavik, and R. Langer. **2004**. Tissue engineering: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:1-8.
- E. B. Lavik, H. Klassen, K. Warfvinge, R. Langer, and M. J. Young. **2005**. Fabrication of degradable polymer scaffolds to direct the integration and differentiation of retinal progenitors. *Biomaterials* 26:3187-3196.
- C. Picart, P. Lavalle, P. Hubert, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, and J.-C. Voegel. **2001**. Buildup mechanism for poly(L-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface. *Langmuir* 17:7414-7424.
- C. Picart, J. Mutterer, Y. Arntz, J.-C. Voegel, P. Schaaf, and B. Senger. **2005**. Application of fluorescence recovery after photobleaching to diffusion of a polyelectrolyte in a multilayer film. *Microsc. Res. Tech.* 66:43-57.
- C. Picart, J. Mutterer, L. Richert, Y. Luo, G. D. Prestwich, P. Schaaf, J.-C. Voegel, and P. Lavalle. **2002**. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:12531-12535.
- C. Porcel, P. Lavalle, V. Ball, G. Decher, B. Senger, J.-C. Voegel, and P. Schaaf. **2006**. From exponential to linear growth in polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 22:4376-4383.

- C. Porcel, P. Lavalle, G. Decher, B. Senger, J.-C. Voegel, and P. Schaaf. **2007**. Influence of the polyelectrolyte molecular weight on exponentially growing multilayer films in the linear regime. *Langmuir* 23:1898-1904.
- P. K. Ray, S. Raychaudhuri, and P. Allen. **1982**. Mechanism of regression of mammary adenocarcinomas in rats following plasma adsorption over protein A-containing *Staphylococcus aureus*. *Cancer Res.* 42:4970-4974.
- L. Richert, F. Boulmedais, P. Lavalle, J. Mutterer, E. Ferreux, G. Decher, P. Schaaf, J.-C. Voegel, and C. Picart. **2004**. Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking. *Biomacromolecules* 5:284-294.
- V. Subbulakshmi, A. K. Ghosh, T. Das, and P. K. Ray. **1998**. Mechanism of protein A-induced amelioration of toxicity of anti-AIDS drug, zidovudine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250:15-21.
- A. S. Verma, P. D. Dwivedi, A. Mishra, and P. K. Ray. **1999**. Ehrlich's ascites fluid adsorbed over protein A containing *Staphylococcus aureus* Cowan I produces inhibition of tumor growth. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 21:89-108.
- C. Vodouhê, E. Le Guen, J. M. Garza, G. Francius, C. Dejugnat, J. Ogier, P. Schaaf, J.-C. Voegel, and P. Lavalle. **2006**. Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* 27:4149-4156.

Chapitre 5 Caractérisation par microscopie à force atomique de fibres de collagène de types I / II sur chondrocytes intacts

5.1 Résumé

L'ingénierie tissulaire des chondrocytes reste un challenge considérable dans le domaine de la réparation de cartilage. Le laboratoire est fortement impliqué dans l'élaboration de matrices synthétiques ou naturelles permettant le maintien du phénotype des chondrocytes (substrat bi ou tridimensionnel)

Le phénotype « chondrocyte » repose principalement sur l'expression de protéoglycanes spécifiques du cartilage et sur la synthèse de collagène de type II. Après de successifs passages en conditions de cultures bidimensionnelles, les chondrocytes se différencient en cellules présentant un phénotype fibroblastique, matérialisé par une synthèse prédominante de collagène de type I.

En vue d'une caractérisation topographique de nos matrices et de l'observation du comportement des chondrocytes à l'interface (production de matrice extracellulaire native), l'AFM se révèle être une méthode d'investigation de choix. Les fibres de collagène se visualisent aisément par AFM. Néanmoins les types I et II possèdent la même morphologie et ne peuvent donc pas être identifiés par cette méthode. Nous avons développé une méthode originale d'immunogold par AFM permettant une distinction biochimique entre ces deux types.

Nos résultats montrent qu'au cours d'une adhésion précoce les chondrocytes conservent leur phénotype cartilage.

Cette technique peut également s'appliquer à l'étude, *in situ*, des macromolécules de la matrice extracellulaire, des protéines membranaires ou des récepteurs moléculaires et ainsi procurer des données complémentaires sur la migration, la croissance et la différenciation des cellules.

Immunogold detection of types I and II chondrocyte collagen fibrils: An in situ atomic force microscopic investigation

Youri Arntz, Laurent Jourdainne, Géraldine Greiner-Wacker, Simon Rinckenbach, Joëlle Ogier, Jean-Claude Voegel, Philippe Laval, Dominique Vautier

Microscopy research and technique, 2006, Vol. 69, Pages 283-290

Pages 164-171 :

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/112579742/PDFSTART>

Digital Object Identifier (DOI) : 10.1002/jemt.20313

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Conclusion générale

Dans ce manuscrit, nous avons présenté différents travaux concernant les films multicouches appliqués aux biomatériaux. Les films que nous avons étudiés présentent des applications potentielles notamment dans le recouvrement de surface, en vue de moduler les interactions entre ces dernières et les tissus présents autour de l'implant. Les interactions peuvent être par exemple contrôlées en fonctionnalisant les films multicouches par insertion de biomolécules comme des protéines, des peptides ou des médicaments, et en contrôlant leur libération par la dégradation de la multicouche.

Nos travaux ont traité de la caractérisation physico-chimique des multicouches ainsi que de la conception de films totalement dégradables par les cellules constitués de multicouches réservoirs indépendantes et faciles à fonctionnaliser. Nous avons aussi discuté d'une technique novatrice de caractérisation biochimique de la matrice extracellulaire synthétisée par différents types cellulaires.

Les premières expériences traitaient de la mobilité d'un polyelectrolyte dans une multicouche à croissance exponentielle, construite à base de poly(L-lysine) et d'acide hyaluronique (PLL – HA). La macromolécule d'intérêt était la poly(L-lysine) marquée par un fluorophore, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

La première partie de ce travail a porté sur la diffusion de la PLL marquée (PLL^{FITC}) sur toute l'épaisseur du film (PLL – HA) et l'échange avec les chaînes de PLL constitutives du film. L'analyse des cinétiques d'adsorption à différentes concentrations de la solution de PLL^{FITC} a permis de déterminer le temps nécessaire pour atteindre la saturation du film en PLL^{FITC} , et de connaître le temps au bout duquel les chaînes de PLL constitutives du film n'étaient plus remplacées. La comparaison des intensités de fluorescence d'un film $(PLL^{FITC} - HA)_{30}$ et d'un film $(PLL - HA)_{30} - PLL^{FITC}$ a permis d'estimer la proportion de chaînes de PLL^{FITC} apportées par le dépôt par rapport à la quantité totale de PLL (marquée ou non marquée) contenue dans le film, ainsi que la proportion des chaînes de PLL remplacées par les chaînes de PLL^{FITC} . La fluorescence de ces échantillons a été convertie en concentration de PLL^{FITC} en réalisant des gammes étalon. Il est dorénavant possible en connaissant le temps de dépôt de celle-ci d'estimer sa concentration dans le film. Cette

méthode offre des possibilités de contrôle de la quantité de biomolécules insérées dans un film, ces biomolécules pouvant être couplées à la PLL.

La seconde partie de ce travail a concerné la diffusion latérale de la PLL^{FITC} dans les multicouches. Elle a été étudiée pour différentes constructions d'un film (PLL – HA) :

- (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC}
- (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} – HA
- (PLL – HA)₂₄ – PLL^{FITC} – (HA – PLL)_{n = 1, 6 ou 24}

La détermination des coefficients de diffusion des molécules constituant les populations mobiles de PLL^{FITC} a été réalisée grâce à un dispositif à interférences permettant des expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) des espèces fluorescentes.

Les résultats indiquent qu'il existe d'importantes variations des fractions de molécules mobiles entre une architecture à couche fluorescente déposée en surface ou déposée au cours de la construction du film. Dans le cas de la couche fluorescente en surface, pour la première fois deux fractions mobiles ont été détectées (une lente et une plus rapide). La fraction mobile la plus rapide disparaît dès qu'une couche supplémentaire d'acide hyaluronique est déposée, et seule la fraction mobile la plus lente reste présente. Dans tous les cas, on note l'existence d'une fraction de molécules immobiles.

Ces résultats suggèrent que les films multicouches (PLL – HA) ont probablement une structure analogue à celle d'un gel. Des chaînes d'acide hyaluronique sont enchevêtrées et forment un réseau sur lequel les chaînes de PLL^{FITC} se fixent, formant la fraction immobile. A travers ce réseau, la diffusion de chaînes de PLL^{FITC} est possible, soit sous forme libre, correspondant à la fraction mobile la plus rapide, soit sous forme complexée avec des chaînes de HA. Cette forme correspondrait à la fraction mobile la plus lente, mais aucune preuve expérimentale directe n'a pu être obtenue. Des expériences de FRAP pour déterminer le coefficient de diffusion de chaînes d'acide hyaluronique marquées contenues dans un film (PLL – HA) sont envisagées pour valider l'hypothèse sur la nature de la fraction mobile lente.

Ces résultats peuvent aussi être interprétés par une densification du film plus importante pour les couches les plus profondes. Celui-ci contiendrait des espèces libres dont la diffusion serait plus ou moins gênée par la densité locale du film, expliquant ainsi l'existence des différentes fractions. Des observations en microscopie confocale de la section en *z* de films très épais (> 20 μm) permettant de suivre la diffusion de la PLL^{FITC} pourraient permettre de développer cette idée.

Dans le chapitre suivant, le développement de films multicouches entièrement dégradables contenant deux types de strates, l'une se comportant comme un réservoir à biomolécules, l'autre se comportant comme une barrière prévenant la diffusion de celles-ci a été réalisé. Des films contenant des barrières avaient déjà été conçus au laboratoire, mais soit les barrières s'étaient révélées non dégradables par différents types cellulaires testés, soit elles étaient dégradables mais étaient obtenues par une méthode différente du dépôt couche par couche et avec une mise en œuvre plus difficile.

Nos films sont les premiers à contenir une barrière à la fois construite par le dépôt couche par couche et dégradable par des cellules. Ils ont été élaborés à partir de la croissance de plusieurs paires de couches de poly(L-lysine) et de poly(acide L-glutamique) (PGA) sur un film poly(L-lysine) – acide hyaluronique. Le premier dépôt de PGA agit fortement sur la structure du film (PLL – HA) sous-jacent : celui-ci diminue d'épaisseur et la diffusion latérale de la PLL est bloquée. On note aussi que la diffusion sur toute l'épaisseur est réduite jusqu'à être complètement inhibée à partir du dépôt d'une dizaine de paires de couches (PLL – PGA). La construction d'un film (PLL – HA)₃₀ – PLL^{FITC} – (PGA – PLL)₁₀ – PLL^{Rho} (PLL^{Rho}, PLL marquée à la rhodamine) a en effet révélé que la PLL^{FITC} restait confinée dans la strate (PLL – HA) et la PLL^{Rho} confinée dans la strate (PLL – PGA). Il est remarquable aussi que la croissance du film (PLL – PGA) sur le film (PLL – HA) reste exponentielle et devient même plus rapide que sur un substrat nu.

La fonctionnalisation d'un film comprenant un ou plusieurs réservoirs avec la protéine A a été réalisée. L'observation en microscopie confocale d'un film (PLL – HA)_m – (PLL – PGA)_n – (PLL – HA)_k, où dans chaque réservoir (PLL – HA) la protéine A greffée à un fluorophore différent a été insérée, a révélé que chaque type de protéine A restait confiné dans le réservoir (PLL – HA) d'origine grâce au rôle de barrière de la strate (PLL – PGA).

Ce résultat est très encourageant car il devient possible d'envisager l'insertion de biomolécules différentes dans chaque réservoir. Cela permettrait d'induire une série de réponses cellulaires spécifiques et contrôlées dans le temps, grâce à la dégradation successive des différentes barrières (PLL – PGA) par les cellules et l'internalisation en cascade des molécules actives contenue dans les réservoirs.

La dernière partie de ce manuscrit a été consacrée à la caractérisation de chondrocytes, cellules essentielles à la régénération du cartilage. La caractérisation a été réalisée par immunomarquage de la matrice extracellulaire avec des nanoparticules d'or, et observation par microscopie à force atomique. Cette technique peu invasive permet l'observation à

l'échelle macromoléculaire de la matrice extracellulaire et ne nécessite pas de préparation supplémentaire des échantillons. Les films multicouches forment des substrats pour la culture de cellules, et peuvent par exemple permettre l'amélioration de la régénération des tissus, en favorisant l'adhésion cellulaire et la synthèse par les cellules de fibres de collagène. Il semble donc important d'être en mesure de caractériser la réponse cellulaire suivant le type de film utilisé pour la culture.

La méthode a été initialement testée et validée sur des types cellulaires connus (fibroblastes et chondrosarcomes) cultivés sur des lamelles de verre. Elle a rendu possible la discrimination biochimique entre le type I et le type II du collagène à l'interface cellule / matrice extracellulaire à l'échelle macromoléculaire. Cela nous a permis ensuite d'une part de caractériser le type de fibres natives de collagène synthétisées par les chondrocytes, et d'autre part de vérifier que ces cellules conservaient leur phénotype cartilage (synthèse de collagène de type II) au cours d'une adhésion précoce sur le substrat.

Cette technique peut aussi s'appliquer à l'étude *in situ* de macromolécules de la matrice extracellulaire, de protéines membranaires ou de récepteurs moléculaires et ainsi fournir des données complémentaires sur la migration, la croissance et la différenciation des cellules. Elle ouvre aussi la voie à la caractérisation de la matrice extracellulaire synthétisée par les cellules cultivées sur différentes multicouches.

Nous avons abordé deux aspects des films multicouches constitués de polyélectrolytes naturels ou synthétisés à partir d'acides aminés en vue d'applications biomédicales :

- L'épaisseur de ces films croît exponentiellement en fonction du nombre de couches déposées, ce qui peut s'expliquer par la diffusion sur toute l'épaisseur du film d'au moins l'un des polyélectrolytes participant à la construction. L'objectif de ce premier travail a donc été d'étudier la diffusion des polyélectrolytes dans une multicouche pendant et après la construction afin de mieux comprendre les mécanismes de ce type de croissance..
- Nous avons développé des films multicouches contenant deux types de strates, l'une se comportant comme un réservoir à biomolécules, l'autre se comportant comme une barrière prévenant la diffusion de celles-ci. Pour la première fois ces deux strates sont à la fois dégradables par des cellules et réalisées par la méthode de dépôt couche par couche.

We have treated two aspects about multilayer films designed with natural polyelectrolytes or polyelectrolytes synthesized from amino-acids and aimed at biomedical applications:

- The thickness of this kind of multilayers increases exponentially with the number of polyelectrolyte deposition steps. Such a growth process is attributed to the diffusion, in and out of the whole film, of at least one of the polyelectrolytes constituting the film. The aim of this work was to study the polyelectrolyte diffusion in a multilayer during and after its construction to better understand this kind of growth mechanism.
- We have developed multilayers constituted of two different strata, one acts as biomolecules compartment and the other acts as a barrier preventing the diffusion of biomolecules. For the first time, these two strata are both degradable by cells and realized by layer-by-layer deposition process.