

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

**Discipline : Chimie Physique
par Damien MERTZ**

***Films multicouches de polyélectrolytes répondant
aux stimuli mécaniques : applications à la libération
de molécules et à la biocatalyse contrôlées***

Soutenue publiquement le 04 juillet 2008

JURY

<i>Directeurs de Thèse</i>	M. Philippe LAVALLE Chargé de Recherches HDR, INSERM U 595, Strasbourg
	M. Jean-Claude VOEGEL Directeur de Recherches, INSERM U 595, Strasbourg
<i>Rapporteur Interne</i>	M. Mir Wais HOSSEINI Professeur, Université Louis Pasteur, Strasbourg
<i>Rapporteurs Externes</i>	Mme Rachel AUZELY-VELTY Professeur, Université Joseph Fourier, Grenoble
	M. Helmuth MÖHWALD Professeur, Institut Max Planck, Potsdam (Allemagne)
<i>Examineur</i>	M. Pierre SCHAAF Professeur, Université Louis Pasteur, Strasbourg

J'ai décidé d'être heureux parce que c'est bon pour la santé. (Voltaire)

*A ma femme Lina,
A notre « p'tit bout » qui va naître dans un mois,
A mes parents, à ma famille, à mes amis,*

Remerciements

Merci !

Je remercie énormément mon directeur de thèse, Philippe Laval, Chargé de Recherche à l'INSERM (U 595, Strasbourg), pour m'avoir encadré dans d'excellentes conditions tout au long de mon travail. Je le remercie pour la formation scientifique et technique qu'il m'a apportée, pour son soutien, sa disponibilité et ses qualités humaines. Je suis très heureux de l'avoir eu comme directeur de thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon co-directeur de thèse, Jean-Claude Voegel, Directeur de Recherche à l'INSERM (U 595, Strasbourg), pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je le remercie pour son soutien durant ces trois années, notamment cette dernière année qui a été très chargée pour moi et où il a été très présent.

Je tiens à remercier tout particulièrement Pierre Schaaf, Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, qui a participé activement à la réalisation de ce travail et qui a initié véritablement l'esprit de ce projet. Je le remercie pour toutes les discussions riches, animées et enthousiastes que nous avons eues. Je n'oublierai pas son enseignement de haute qualité.

Je suis très sensible à l'honneur que me font les membres du jury en acceptant de juger ce travail. Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Madame Rachel Auzély-Velty, Professeur à l'Université Joseph Fourier de Grenoble, Monsieur Helmuth Möhwald, Professeur à l'Institut Max Planck de Potsdam et Monsieur Mir Wais Hosseini, Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, d'avoir accepté d'intervenir en tant que rapporteurs de la thèse. J'adresse toute ma reconnaissance à Pierre Schaaf, qui s'est joint à ce jury en tant qu'examineur. Je leur adresse mes sincères remerciements.

Je tiens à remercier Joseph Hemmerlé pour avoir conçu le dispositif d'étirement mécanique. Je garde un très bon souvenir des expériences que nous avons faites ensemble à l'ICSI (Institut de Chimie des Surfaces et des Interfaces, CNRS, Mulhouse). Merci aussi à Christian Ringwald, Pierre Bindel et Karim Benmlih pour leur aide.

Je remercie beaucoup Fouzia Boulmedais pour sa grande disponibilité et son aide diverse, notamment pour le traitement des spectres IR ainsi que Jérôme Mutterer, pour ses précieux conseils en microscopie confocale, Sophie Ollivier pour son aide en microscopie à force atomique et Armelle Chassepot, pour la purification des macromolécules fluorescentes.

Je remercie amicalement Bernard Senger, pour son aide dans le traitement des données de QCM-D ainsi que Dominique Vautier et Vincent Ball, pour nos discussions toujours intéressantes.

J'en arrive à mes compagnons de bureau, je suis très heureux d'avoir passé du temps en leur compagnie ces dernières années, je leur adresse de grands remerciements pour avoir partagé avec moi de nombreux moments de travail, de détente, de galères parfois : Nadia Ladhari, Sabine Muller et Laurent Jourdainne. Merci pour toutes nos discussions scientifiques, informatiques, philosophiques, historiques, humoristiques, ça va me manquer tout ça !

Je remercie chaleureusement Hajare Mjahed, pour sa joie de vivre, sa gentillesse et pour nos discussions aussi intéressantes que ci-dessus. Un clin d'œil aussi à Sandra Werner, Leyla Kocgozlu, et Christine Affolter, merci pour votre bonne humeur, ce fut un plaisir de vous croiser au 7^{ème} étage. De même, aux nouveaux et anciens : Alae, Falk, Ludovic, Riadh, Andreas, Cédric, Matthias, Grégory (Gwadaman), Youri, Eric, Constant, Erell, Juan, Claudine, Florent...Merci à toute l'équipe pour l'ambiance au laboratoire ainsi que pour le bon temps passé en dehors du laboratoire.

Ces trois ans de thèse ont aussi été l'occasion pour moi d'enseigner à la Faculté de Chimie, en tant que moniteur CIES/ULP. Je remercie chaleureusement Mme Claire Loubat-Hugel, PRAG à la préparation à l'Agrégation de Chimie (ULP Strasbourg) qui a été ma tutrice pédagogique pour le CIES. Je la remercie pour sa gentillesse et pour nos discussions très intéressantes. Je remercie tous les enseignants chercheurs avec lesquels j'ai travaillé dans le cadre de TD ou TP, et particulièrement les techniciens des Prépas Agrégation de Sciences Physiques et CAPES de Physique Chimie qui m'ont préparé le matériel de TP de Chimie tous les mercredis matin.

La pratique sportive du Judo au SIUAPS (ULP, Strasbourg) a été pour moi un pilier d'équilibre important pour réaliser ce travail me permettant de recharger les batteries régulièrement. Je tiens à remercier Mr Dominique Jankowiak, professeur de STAPS qui fait un travail remarquable avec beaucoup d'humour et d'intelligence, en démontrant que le Judo est aussi un sport fabuleux pour l'esprit. Merci à Max Andriamanana, mon camarade *Uké/Tori* de « choc » pour avoir étudié avec moi tous ces mouvements. Un clin d'œil à Alex Dochter également pour les discussions, blagues et clés de bras échangées sur le tatami.

Enfin, je terminerai en remerciant mes proches : mes parents, ma famille, ma belle-famille, mes amis pour leur soutien et leur affection, et tout particulièrement ma femme Lina pour tout ce qu'elle m'a apporté depuis l'époque de la cité U (« Paul App' ») et pour tout ce qu'elle m'apporte au quotidien. C'est une nouvelle aventure maintenant qui nous attend avec le bébé...

Table des matières

Abbréviations et symboles	8
Introduction générale.....	11

1. Revue Bibliographique

1.1. Introduction aux films multicouches de polyelectrolytes	16
1.1.1 Principe de construction	16
1.1.2 Modes de croissance.....	18
1.1.3 Perspectives d'applications des multicouches de polyelectrolytes	23
1.2. Systèmes multicouches bioactifs	25
1.2.1 Biofonctionnalisation et bioactivité	25
1.2.2 Films à interaction ligand/récepteur	28
1.2.3 Films à multi-compartiments : stockage et libération de principes actifs	31
1.3. Films multicouches adaptatifs répondant à différents stimuli.....	34
1.3.1 Films répondant au pH	34
1.3.2 Films répondant à la température	36
1.3.3 Films répondant aux rayonnements UV, Visible, IR	38
1.4. Assemblages polymériques sous stimuli mécaniques.....	41
1.4.1 Propriétés mécaniques des films multicouches	41
1.4.2 Films polymériques répondant aux stimuli mécaniques	45

2. Matériels et Méthodes

2.1. Matériels, construction et étirement des échantillons.....	54
2.1.1 Solutions de polyelectrolytes, enzymes et molécules substrats	54
2.1.2 Construction des échantillons.....	59
2.1.3 Dispositif d'étirement.....	60
2.2. Méthodes de caractérisation et d'analyse	62
2.2.1 Microscopie confocale à balayage laser	62
2.2.2 Microscopie à force atomique	66
2.2.3 Microbalance à cristal de quartz.....	68

3. Films multicouches de polyelectrolytes répondant aux stimuli mécaniques

3.1. Résumé	76
3.2. Article 1	80
"Polyelectrolyte multilayers under mechanical stretch"	80
3.3. Article 2	90
"Mechanically responding nanovalves based on polyelectrolyte multilayers"	90
3.4. Résultats complémentaires	100

4. Multicouches enzymatiques à biocatalyse contrôlée

4.1. Systèmes enzymatiques réservoir/barrière à perméabilité contrôlée	105
4.1.1 Résumé	105
4.1.2 Projet Article 3 : "Tuneable permeability of enzymatic reservoir/barrier systems made of polyelectrolyte multilayers"	107
4.2. Application à la biocatalyse réversiblement modulée par étirement mécanique. 121	
4.2.1 Résumé	121
4.2.2 Projet Article 4 : "Cryptic site surfaces inspired by mechanotransduction proteins for biocatalysis modulation"	122
4.3. Résultats complémentaires	129
4.3.1 Détermination des conditions expérimentales optimales	129
4.3.2 Systèmes à réservoirs de molécules substrats pour la détection enzymatique	132

Conclusions et perspectives	137
--	------------

Annexes	141
----------------------	------------

Annexe 1 : Influence de l'étirement sur la mobilité des polyelectrolytes	142
--	-----

Annexe 2 : Libération d'albumine enfouie dans un film PLL/HA	145
--	-----

Annexe 3 : Insertion de phosphatase alcaline dans les films PDADMA/PSS	148
--	-----

Annexe 4 : Films multicouches à base de fibres de cellulose	153
---	-----

Références bibliographiques	157
--	------------

Liste des publications et communications (articles et conférences)	164
---	------------

Abbreviations et symboles

Polyélectrolytes

PLL : Poly(L-lysine)

HA : Acide hyaluronique

PSS : Poly(4-styrène sulfonate de sodium)

PAH : Chlorhydrate de poly(allylamine)

PDADMA : Chlorure de poly(diallyldiméthylammonium)

Polyélectrolytes fluorescents

PLL^{FITC} : Poly(L-lysine) greffée à l'isothiocyanate de fluorescéine

PLL^{Rho} : Poly(L-lysine) greffée à la rhodamine succinimidylester

PAH^{Rho} : Chlorhydrate de poly(allylamine) greffé à la rhodamine succinimidylester

PSS^{MRho} : Poly(4-styrène sulfonate de sodium) greffé à la methacryloxyéthyl-thiocarbamoyl rhodamine B

Enzymes et substrats enzymatiques

AP : Phosphatase alcaline

AP^{Rho} : Phosphatase alcaline greffée à la rhodamine succinimidylester

AP^{FITC} : Phosphatase alcaline greffée à l'isothiocyanate de fluorescéine

FDP : Fluorescéine di-phosphate

FMP : Fluorescéine mono-phosphate

PNP : para-nitrophénylphosphate

PN : para-nitrophénol

Réactifs et solvants utilisés

SDS : Sodium dodecyl sulfate

HCl : Acide chlorhydrique

Tris : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

DMSO : Dimethylsulfoxyde

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

Rho : Rhodamine succinimidylester

Appareils et techniques utilisés

QCM-D : Microbalance à cristal de quartz avec dissipation

CLSM : Microscopie confocale à balayage laser

AFM : Microscopie à force atomique

Introduction Générale

Les revêtements de surface basés sur l'assemblage de molécules en plusieurs couches ou multicouches sont étudiés depuis les années 1930. Ces films sont notamment destinés au recouvrement des 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 assemblages multicouches stables et résistants.

Depuis les années 1990, une technique basée sur l'adsorption alternée de polyanions et de polycations sur des surfaces solides a permis d'obtenir des films stables appelés *multicouches de polyélectrolytes* pouvant atteindre des épaisseurs de plusieurs micromètres. Le dépôt couche par couche des polyélectrolytes est un procédé très simple à mettre en œuvre et s'applique sur tout type de substrat de diverses formes. Depuis une dizaine d'années, ces assemblages supramoléculaires suscitent une attention considérable due à leur large potentiel d'applications notamment en tant que revêtements d'implants, traitements de surface anti-reflets pour l'optique, systèmes de séparation de molécules et de nanofiltration, ou encore membranes à haute résistance mécanique.

La fonctionnalisation des surfaces a toujours été d'une importance primordiale dans de nombreux processus industriels et en particulier dans l'émergence des Nanotechnologies. Alors qu'une première génération de traitement de surface concerne des fonctionnalisations stables ou inertes, une nouvelle génération de revêtements actifs émerge aujourd'hui pour donner des *surfaces adaptatives*. Ces surfaces, généralement obtenues par greffage de polymères sur des substrats solides, ont pour but de répondre, réversiblement si possible, à l'application de stimuli externes. La plupart des surfaces adaptatives déjà développées répondent aux variations de pH, de température ou encore à des champs électriques. La technologie multicouche suit une évolution similaire : une nouvelle génération de multicouches de polyélectrolytes répondant à différents stimuli externes est en plein développement actuellement. Ces films sont conçus soit dans le but de développer des matériaux fonctionnels ayant des propriétés physico-chimiques modulables (densité de charges, propriétés viscoélastiques, propriétés optiques), soit dans le but de délivrer des composés actifs consécutivement à une variation de pH, de température ou encore de lumière. Une autre classe de surfaces adaptatives concerne des films « bio-intéreactifs » à interaction

ligand/récepteur faisant intervenir des processus de reconnaissance moléculaire. Ainsi, les films peuvent être rendus immuno-sensibles dans le cas de reconnaissance antigène/anticorps ou encore catalytiques dans le cas d'interaction enzyme/substrat.

Le sujet de ma thèse s'inscrit dans ce domaine des surfaces adaptatives et mon travail a consisté à étudier la réponse de films multicouches de polyélectrolytes sous l'action de stimuli mécaniques. L'objectif général a été de développer des assemblages multicouches fonctionnels à réponse biologique ou chimique, en vue d'applications pour la libération de molécules et la biocatalyse mécaniquement contrôlées. A notre connaissance, seulement très peu de films adaptatifs répondant à un stimulus mécanique ont été rapportés jusqu'à présent, en dépit du fait que ces stimuli présentent un grand intérêt en termes d'applications.

Le **chapitre 1** est consacré à l'état des travaux et des connaissances sur les surfaces adaptatives et bioactives à base de films multicouches de polyélectrolytes. Nous décrivons le développement de films multicouches bioactifs, susceptibles d'interagir avec un milieu biologique (cellules, protéines) ainsi que des études concernant des films multicouches répondant à différents stimuli tels que le pH, la température ou le rayonnement. Nous terminons cette revue bibliographique en soulignant l'émergence depuis peu, de films polymériques répondant aux stimuli mécaniques.

Le **chapitre 2** présente une description détaillée des produits utilisés, de la méthode d'élaboration des assemblages multicouches déposés sur des feuilles élastomères en silicone ainsi que du dispositif d'étirement des échantillons. Nous décrivons également les techniques de caractérisation utilisées (microscopie confocale, microscopie à force atomique, microbalance à cristal de quartz) pour analyser nos échantillons.

Le **chapitre 3** correspond au premier chapitre des résultats expérimentaux. Dans ce chapitre, nous nous intéressons à la réponse des films multicouches de polyélectrolytes soumis à des stimuli mécaniques. Tout d'abord, nous présentons le comportement fondamental de différentes multicouches de polyélectrolytes sous étirement mécanique. Nous montrons que les comportements viscoélastiques sont très différents d'un film à l'autre. Puis ces multicouches de natures différentes sont combinées entre elles pour former des assemblages à multi-compartiments constitués de strates jouant le rôle de réservoirs de chaînes de polyélectrolytes et d'autres jouant le rôle de barrières vis-à-vis de la mobilité de ces chaînes. Nous étudions alors l'ouverture de plusieurs barrières de nature chimique différentes, induite par l'étirement mécanique. Alors que certaines barrières d'épaisseur

nanométriques se fissurent irréversiblement tel un matériau vitreux sous l'action de la contrainte mécanique, d'autres barrières s'ouvrent et se ferment réversiblement en formant des nanopores sur toute la surface agissant ainsi comme des nano-valves à commande mécanique.

Le **chapitre 4** correspond au second chapitre des résultats expérimentaux. Dans ce chapitre, nous étudions la construction de systèmes enzymatiques réservoir/barrière à base de multicouches de polyélectrolytes et d'une enzyme, la phosphatase alcaline. Ces réservoirs sont recouverts d'une strate barrière permettant d'enfouir l'enzyme et de masquer sa réactivité. Nous montrons que l'application d'un étirement mécanique sur ces systèmes, en présence du substrat en solution, permet de déclencher la réaction enzymatique. Selon les conditions de construction, cette réaction se produit soit à l'intérieur du réservoir par ouverture de la barrière, soit à l'interface réservoir/barrière.

Les propriétés biocatalytiques des barrières à *réaction interfaciale* sont alors étudiées en détail sous contrainte mécanique. Nous montrons qu'il est possible de contrôler de façon réversible, l'activité catalytique de ces multicouches enzymatiques avec des forces mécaniques. En effet, à partir d'un certain taux critique d'étirement, l'activité enzymatique de tels systèmes augmente progressivement avec l'étirement appliqué. De plus, au retour à l'état non-étiré, le système présente à nouveau une activité enzymatique quasi-nulle qui ré-augmente ensuite, bien que plus faiblement, lorsqu'un nouvel étirement mécanique est appliqué. Nous envisageons d'interpréter la modulation de la biocatalyse, à travers l'hypothèse d'un mécanisme de type « sites cryptiques » consistant à l'exposition des sites enzymatiques sous l'effet d'une force mécanique et à leur ré-enfouissement lors du retour à l'état non étiré.

En fin de manuscrit, des **annexes** présentent quatre travaux succincts menés en parallèle avec le sujet de thèse. Ces études s'intéressent notamment à l'influence de l'étirement mécanique sur la mobilité des chaînes de polyélectrolytes dans un film multicouche (**annexe 1**), à l'insertion de protéines (albumine, phosphatase alcaline) dans différents films multicouches (**annexes 2 et 3**) et à la construction de membranes à base de polyélectrolytes et de fibres de cellulose (**annexe 4**).

CHAPITRE 1 : Revue Bibliographique

1.1 Introduction aux films multicouches de polyélectrolytes

1.1.1 Principe de construction

1.1.2 Modes de croissance

1.1.3 Perspectives d'applications des multicouches de polyélectrolytes

1.2 Systèmes multicouches bioactifs

1.2.1 Biofonctionnalisation et bioactivité

1.2.2 Films à interaction ligand/récepteur

1.2.3 Films multi-compartiments : stockage et libération de principes actifs

1.3 Films multicouches adaptatifs répondant à différents stimuli

1.3.1 Films répondant au pH

1.3.2 Films répondant à la température

1.3.3 Films répondant aux rayonnements UV, Visible, IR

1.4 Assemblages polymériques sous stimuli mécaniques

1.4.1 Propriétés mécaniques des films multicouches

1.4.2 Films polymériques répondant aux stimuli mécaniques

1.1 Introduction aux films multicouches de polyélectrolytes

1.1.1 Principe de construction

Historique

Principe du dépôt couche par couche

Différentes méthodes de dépôt

Nature du substrat

1.1.2 Modes de croissance

Croissance linéaire

Croissance exponentielle

Paramètres influençant le mode de croissance

1.1.3 Perspectives d'applications des multicouches de polyélectrolytes

1.1.1 Principe de Construction

Historique

La préparation de multicouches constituées de particules colloïdales anioniques et cationiques interagissant via des forces électrostatiques avait déjà été soulignée il y a quelques dizaines d'années (Iler 1966). Cette idée est tombée dans l'oubli, sans doute à cause du manque de techniques expérimentales nécessaires pour caractériser ces assemblages. Par ailleurs, il était admis que le dépôt de substances de charges opposées s'arrêtait dès que les charges des espèces cationiques avaient exactement compensé celles des espèces anioniques. Ce n'est qu'au début des années 1990 que les travaux de G. Decher ont véritablement mis en valeur la méthode d'assemblage couche par couche, appliquée en particulier à des polymères chargés, ou polyélectrolytes. (Decher et al. 1992; Decher 1997)

Principe du dépôt couche par couche

La méthode de dépôt couche par couche (LbL de l'anglais « Layer by Layer ») est basée essentiellement sur les interactions électrostatiques entre des espèces anioniques et cationiques qui sont adsorbées alternativement sur un support. Son principe est décrit schématiquement dans la **Figure 1.1**. Un substrat chargé, par exemple, initialement positivement est mis au contact d'une solution de polyanions pendant un temps donné

(typiquement 10 min). Les polyanions s'adsorbent sur la surface et les molécules non adsorbées sont éliminées par simple rinçage. Après rinçage, la surface est chargée négativement en raison d'une surcompensation de charges négatives (Caruso et al. 1998; Ladam et al. 2000). Par conséquent, lorsque le substrat est mis au contact d'une solution de polycations, ceux-ci peuvent également interagir électrostatiquement et s'adsorber sur la surface. Cette adsorption est suivie d'une étape de rinçage à l'issue de laquelle la surface est chargée positivement en raison d'une surcompensation de charges positives. La surcompensation de charge après chaque dépôt a été mise en évidence par des mesures du potentiel zêta (Hoogeveen et al. 1996; Caruso et al. 1998; Ladam et al. 2000) et constitue la force motrice de la construction des films multicouches.

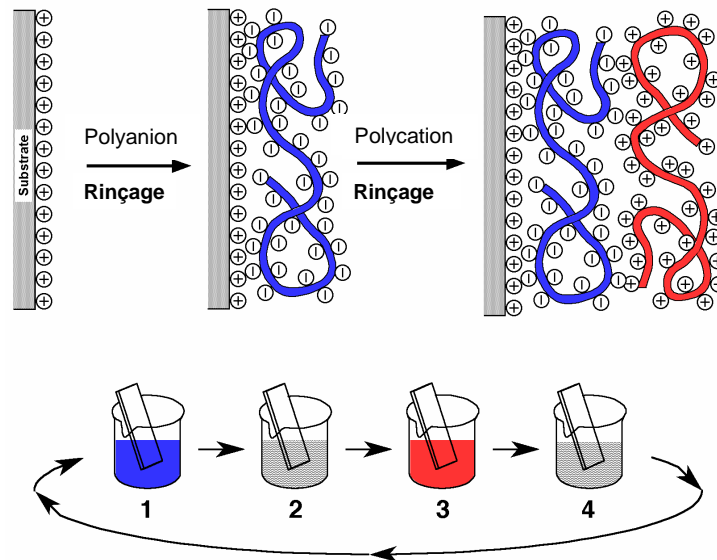


Figure 1.1. Principe de construction des multicouches de polyelectrolytes. Dans le cas illustré ici, le substrat est chargé positivement en surface. Le premier dépôt consiste à plonger le substrat dans une solution de polyanions (représentés en bleu) puis un second dépôt à le plonger dans une solution de polycations (représentés en rouge) (Decher 1997).

Différentes méthodes de dépôt

Deux méthodes de dépôt permettent facilement de varier de nombreux paramètres de construction tels que le nombre de couches dans l'assemblage, la force ionique, ou encore le pH des solutions. La méthode classique de dépôt est celle du procédé d'immersion en solution, ou « dip-coating », qui consiste à tremper le substrat alternativement dans les solutions de polycations et de polyanions. Les temps de dépôts généralement employés sont de l'ordre de 10 minutes. Une autre technique de dépôt a été étudiée en vue de former les films plus rapidement. Il s'agit d'un procédé utilisant un nébuliseur et qui consiste à pulvériser les solutions de polycations et de polyanions alternativement et la solution de rinçage entre

chaque couche. Des films poly(diallyldiméthylammonium)/poly(styrène sulfonate) (PDADMA/PSS) en présence de solutions NaCl 1M ont été ainsi construits (Schlenoff et al. 2000). Ces auteurs ont comparé ces films à ceux réalisés par immersion et ont montré que les spectres infrarouges ainsi que la perméabilité aux ions étaient identiques. Ainsi, l'avantage de cette méthode par rapport à la précédente est que le temps de dépôt des solutions peut être réduit pour aboutir aux mêmes résultats.

Nature du substrat

Les supports les plus souvent utilisés sont des surfaces planes ou des particules sphériques colloïdales, de nature minérale, métallique ou organique (**Tableau 1.1**). Des surfaces élastomères telles que le silicone ou poly(diméthylsiloxane) (PDMS) permettent également le dépôt de films multicouches. Comme pour de nombreux substrats organiques non chargés en surface, des interactions de type Van der Waals assurent vraisemblablement l'adsorption de la première couche de polyélectrolytes sur ce support.

Nature chimique	Surfaces planes	Particules sphériques
Minérale	Lame de verre (Decher 1997) Quartz (Lvov et al. 1997)	Carbonate de calcium (Sukhorukov et al. 2004)
Métallique	Titane fritté (Vautier et al. 2003) Silicium (Dubas and Schlenoff 2001)	Nanobilles d'or (Schneider and Decher 2004)
Organique	Polyéthylène (Green and Sadrameli 2004)	Microsphères de polyester (Muller et al. 2003)

Tableau 1.1. Nature des substrats utilisés pour construire des films multicouches de polyélectrolytes.

1.1.2 Modes de croissance

Depuis une dizaine d'années, des travaux ont montré qu'il existait deux modes de croissance très différents : la croissance dite linéaire et la croissance dite exponentielle. On entend par croissance la variation de l'épaisseur du film formé en fonction du nombre de couches déposées (**Figure 1.2**).

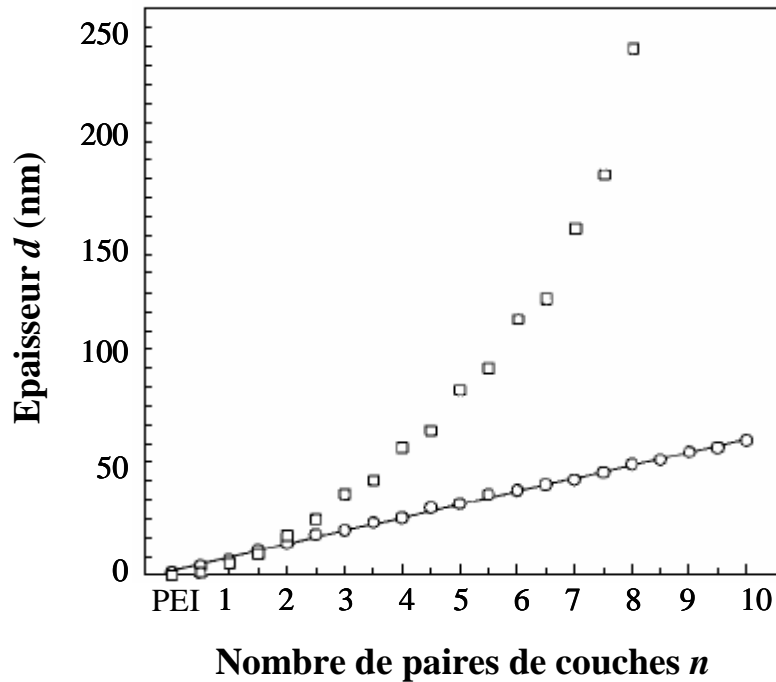


Figure 1.2. Evolution de l'épaisseur d d'un film (□) PEI/(PGA/PLL) $_n$ et d'un film (○) PEI/(PSS/PAH) $_n$ en fonction du nombre de paires de couches n déposées suivie par spectroscopie optique par guide d'onde (Lavalle et al. 2002). Le sigle PEI correspond à poly(éthylène imine), PGA à poly(acide L-glutamique), PLL à poly(L-lysine), PSS à poly(styrène sulfonate) et PAH à poly(allylamine).

Croissance linéaire

Ce type de films est caractérisé par une épaisseur qui augmente proportionnellement avec le nombre de couches déposées. Le système poly(allylamine)/poly(styrène sulfonate) (PAH/PSS) est l'exemple le plus largement étudié. Des analyses par réflectométrie des rayons X et réflectivité des neutrons, réalisées sur des films construits avec des polyélectrolytes deutérés, ont mis en évidence l'existence d'une structure relativement stratifiée (Decher 1997; Lösche 1997). En effet, les résultats ont montré que dans les films PAH/PSS, les couches de polyélectrolytes ne pénètrent que les couches adjacentes constituant ainsi une structure pseudo-stratifiée avec un désordre local baptisé « *fuzzy layers* » par Decher (Decher 1997). D'autres couples de polyélectrolytes se caractérisent par une croissance linéaire comme les films poly(allylamine)/poly(acide acrylique) (PAH/PAA) (Shiratori and Rubner 2000) ou encore poly(diallyldiméthylammonium)/poly(styrène sulfonate) (PDADMA/PSS) (Dubas and Schlenoff 1999).

Croissance exponentielle

Bien que l'épaisseur d'un grand nombre de films multicouches croît selon le mode linéaire, il existe des films dont la croissance est exponentielle avec le nombre de couches

déposées. Certains travaux expliquent ce phénomène par une augmentation de la rugosité de la surface au fur et à mesure de l'élaboration des films (Ruths et al. 2000). En effet, une augmentation de la rugosité accroît l'aire de la surface d'adsorption et donc la quantité de matériel qui peut s'y adsorber. D'autres études portant sur les systèmes (poly(L-lysine)/poly(acide-L-glutamique)) (PLL/PGA) et (poly(L-lysine)/acide hyaluronique) (PLL/HA) ont décrit également une croissance exponentielle de ces films multicouches (Picart et al. 2001; Lavalle et al. 2002; Picart et al. 2002). L'épaisseur de ces films peut atteindre un à plusieurs micromètres après le dépôt d'une vingtaine de paires de couches. De telles épaisseurs permettent d'utiliser la technique de microscopie confocale à balayage laser pour visualiser la section verticale des films après insertion d'un polyélectrolyte fluorescent lors de l'élaboration du film. Ainsi, la croissance exponentielle a pu être expliquée par un phénomène de diffusion d'au moins un des polyélectrolytes au sein de toute la section du film. Le mécanisme de construction associé à la diffusion est schématisé sur la **Figure 1.3** dans le cas du système PLL/HA et est décrit dans le paragraphe qui suit.

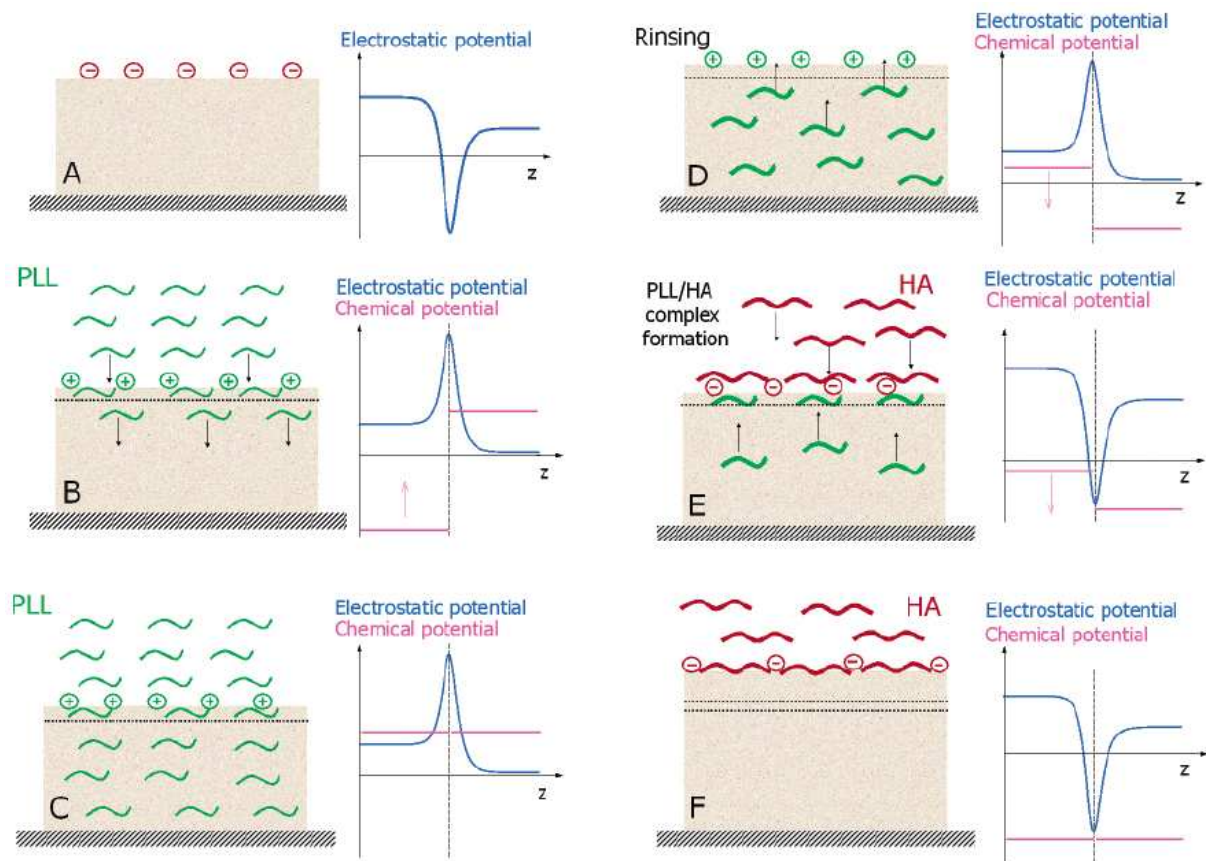


Figure 1.3. Mécanisme de construction d'un film multicouche à base de poly(L-lysine) (PLL) et d'acide hyaluronique (HA) qui suit un régime de croissance exponentielle. (Lavalle et al. 2004)

Le film multicouche PLL/HA, terminé par une couche de polyanions HA (A), est mis au contact de la solution de polycations PLL (B). Ces derniers vont à la fois se complexer avec l'excès de charges négatives en surface, conduisant à la formation d'une nouvelle couche chargée positivement, mais aussi diffuser à l'intérieur du film en formant un réservoir de polycations *libres* (C). Lors de la phase de rinçage, la solution de polycations est remplacée par le milieu tampon pur et seule une partie des polycations libres du film diffuse hors de la multicouche (D). La capacité du film à stocker une partie des chaînes de PLL s'explique par l'excès de charges positives à la surface du film, qui crée une barrière de potentiel électrostatique empêchant la diffusion hors du film de la totalité des polycations. Lorsque le film est ensuite mis au contact de la solution de polyanions, ceux-ci se complexent avec l'excès de charges positives en surface et changent ainsi le signe de la barrière de potentiel qui devient négatif (E). Les polycations libres confinés préalablement dans le film diffusent alors vers l'extérieur sous l'effet de cette force motrice pour former de nouvelles couches. Au cours de ce seul dépôt, le processus se répète jusqu'à épuisement du réservoir de polycations (F). La masse des couches formées est proportionnelle à la quantité de polycations libres restant dans le film après la phase de rinçage. En première approximation, cette quantité est proportionnelle à l'épaisseur du film, ce qui conduit à une croissance de type *exponentiel*.

Paramètres influençant le mode de croissance

Des paramètres expérimentaux comme la force ionique ou la température ont un effet très important sur le mode de croissance des films multicouches de polyélectrolytes. Les films poly(diallyldiméthylammonium)/poly(styrène sulfonate) (PDADMA/PSS) illustrent particulièrement bien ces influences.

Certains auteurs ont ainsi observé par microscopie à force atomique une différence significative de morphologie, d'épaisseur, et de rugosité pour des films PDADMA/PSS lorsque le taux de sel est augmenté. La croissance de tels films passe notamment d'une croissance linéaire, à une croissance qualifiée de *super linéaire* jusqu'à atteindre une croissance réellement exponentielle sous l'augmentation de la force ionique (McAloney et al. 2001) (**Figure 1.4**).

Récemment, l'influence du changement de la température sur la construction de films PDADMA/PSS a été étudiée par microbalance à cristal de quartz (QCM). (Salomäki et al. 2005). A 45 °C ce film présente une croissance exponentielle avec le nombre de couches déposées mais lorsque la température est descendue à 25 °C, le régime devient linéaire. Si la température repasse à 45 °C, on retrouve un régime exponentiel (**Figure 1.5**).

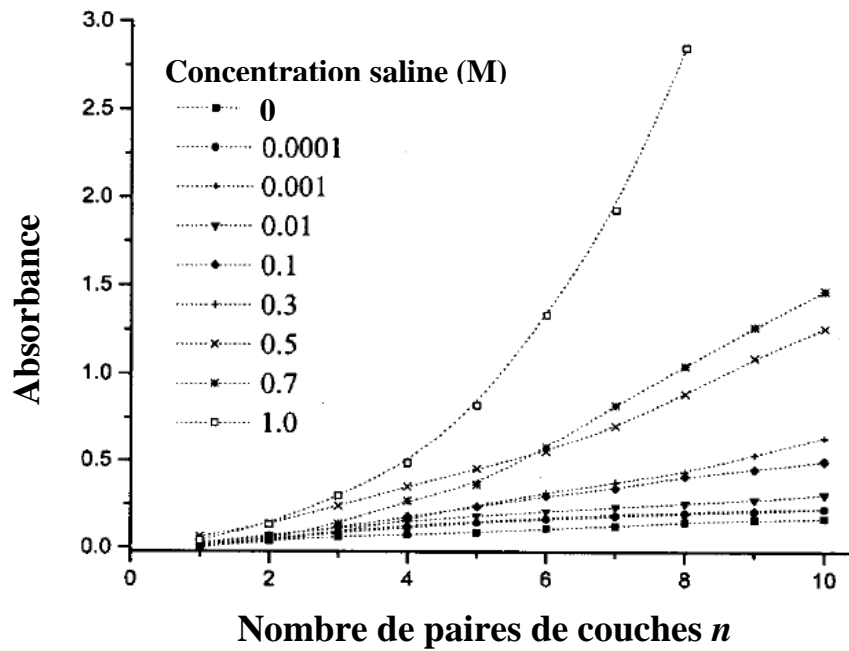


Figure 1.4. Evolutions de l'absorbance à $\lambda = 217$ nm (maximum d'absorption de PSS) par spectrophotométrie UV/visible lors de la construction d'un film (PDADAMA/PSS) $_n$ pour différentes concentrations molaires en NaCl (McAloney et al. 2001).

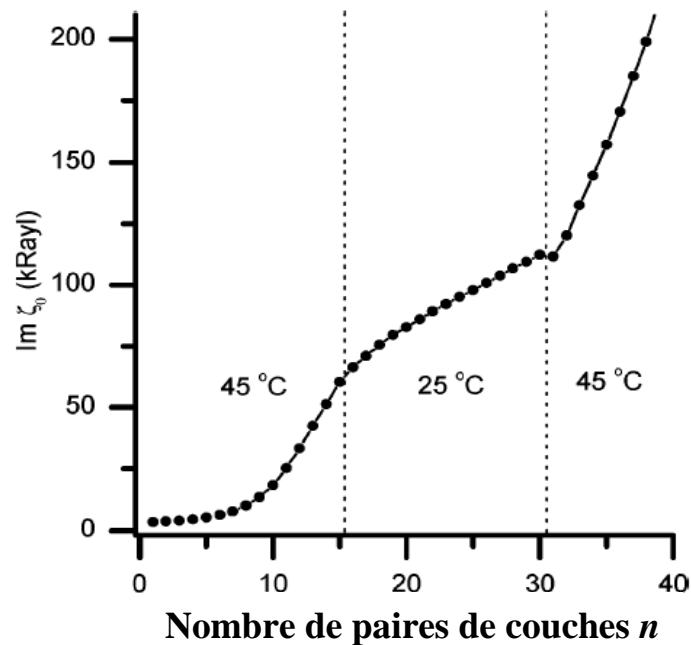


Figure 1.5. Evolution de la croissance d'un film (PDADMA/PSS) $_n$ suivie par microbalance à cristal de quartz en fonction de la température des solutions de polyélectrolytes. Le graphique représente l'évolution de la partie imaginaire de l'onde acoustique, représentative de l'incrément de masse de polyélectrolytes après le dépôt de chaque nouvelle paire de couche n (Salomäki et al. 2005).

1.1.3 Perspectives d'applications des multicouches de polyélectrolytes

Un des avantages des multicouches de polyélectrolytes est la manière dont on peut modifier leurs propriétés en ajustant certains paramètres comme la nature des polyélectrolytes, la force ionique, le pH ou encore la température. Les propriétés modulables sont entre autres, l'épaisseur, la rugosité, la perméabilité, les propriétés mécaniques ou encore la charge de surface. La réponse de tels assemblages à des stimuli extérieurs dans le but d'obtenir des surfaces actives sera notamment discutée par la suite. La facilité de construction et la simplicité de mise en oeuvre des films multicouches de polyélectrolytes a généré une évolution rapide des connaissances dans ce domaine ainsi que le développement d'une grande diversité de systèmes fonctionnels. Ces assemblages supramoléculaires permettent aujourd'hui d'envisager de nombreuses applications potentielles balayant un champ technologique très large allant des matériaux électroniques aux nanobiotechnologies.

Des exemples d'applications sont :

- *Le traitement anti-reflets* de verres optiques par des films PAH/PAA pour limiter les phénomènes de réflexion lumineuse sur les lunettes, les écrans d'ordinateurs ou encore pour augmenter le rendement des cellules photovoltaïques (Hiller et al. 2002);
- *De nouvelles diodes organiques électroluminescentes (OLED)* à base de films poly(*p*-phénylènevinylène/poly(acide méthacrylique) (PPV/PMA) avec des propriétés électro-optiques (caractéristiques courant-tension et luminescence-tension) modulées par la position d'une couche de montmorillonite dans l'édifice (Eckle and Decher 2001);
- *De nouveaux matériaux composites à haute résistance mécanique*, constituées de films PDADMA/montmorillonite où des briques d'argile (montmorillonite) de taille nanométriques ("nanobriques") sont reliées entre elles par des chaînes de PDADMA jouant le rôle de ciment entre les plaquettes minérales (Tang et al. 2003);
- *Des procédés de séparation et de nanofiltration* avec le développement de nouvelles membranes sélectives aux ions à base de films multicouches de polyélectrolytes (Kotov et al. 1998; Liu and Bruening 2004; Miller and Bruening 2004);
- *Des films minces alimentaires protecteurs* déposés au fond des bacs à légumes pour piéger les traces d'éthylène gazeux qui se libèrent des fruits et légumes en voie de décomposition. Ces films ont déjà été commercialisés au Japon sous le nom "Yasa Sheets" (http://www.phschool.com/science/science_news/articles/layered_approach.html).

Les films multicouches présentent également de nombreuses applications potentielles dans le domaine des biomatériaux. En effet, le dépôt de tels revêtements à base de polyélectrolytes biocompatibles sur la surface d'un implant peut conduire à une meilleure intégration dans les tissus environnants. La stratégie actuelle s'oriente de plus en plus vers la conception de revêtements bioactifs c'est à dire avec une activité biologique en surface. Il est possible de conférer une telle propriété en fonctionnalisant l'architecture multicouche par insertion de facteurs biologiques présentant des propriétés spécifiques et/ou thérapeutiques.

1.2 Systèmes multicouches bioactifs

1.2.1 Biofonctionnalisation et bioactivité

Insertion de molécules biologiques par simple dépôt

Insertion de molécules biologiques par greffage covalent

1.2.2 Films à interaction ligand/récepteur

Films immuno-sensibles

Films à interaction cellule/protéine

Surfaces biocatalytiques

1.2.3 Films multi-compartiments : stockage et libération de principes actifs

Réservoirs et Barrières

Dégradation de barrière et libération contrôlée en milieu physiologique

1.2.1 Bio-fonctionnalisation et bioactivité

Les films multicouches peuvent être fonctionnalisés soit par simple insertion de molécules biologiques (telles que des protéines, de l'ADN, des agents thérapeutiques) à un certain niveau de la construction, soit par greffage covalent du facteur biologique sur une chaîne de polyélectrolyte (**Figure 1.6**).

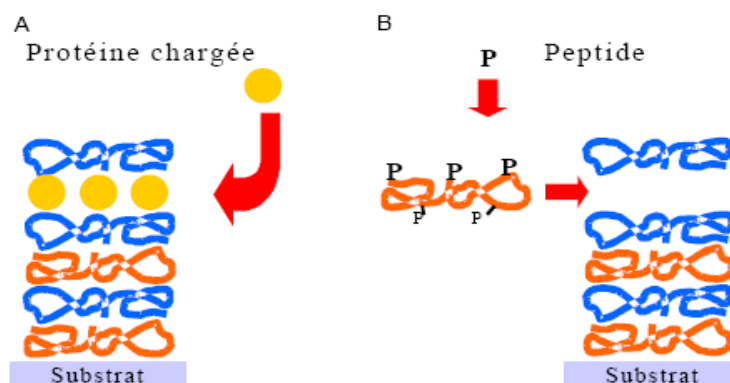


Figure 1.6. Schémas illustrant la fonctionnalisation de films multicouches de polyélectrolytes (A) soit par intégration directe dans le film de macromolécules biologiques (protéines) au cours de la séquence de dépôt (Lvov et al., 1996), (B) soit par enfouissement d'un principe actif greffé sur une chaîne de polyélectrolyte (Chluba et al. 2001)

Insertion de molécules biologiques par simple dépôt

Les interactions intermoléculaires favorables entre certaines protéines et les polyélectrolytes permettent l'insertion des protéines au sein des films multicouches durant leur élaboration. Ces interactions, très variées, résultent de forces de Van der Waals, de liaisons hydrogènes, de forces électrostatiques ou d'effets hydrophobes. Afin que les protéines restent actives, il est important d'éviter leur dénaturation dans le film. Leurs propriétés biologiques spécifiques sont reliées à la structure et à l'organisation des séquences de polypeptides dans l'espace et leur dénaturation résulte souvent de modifications de la structure secondaire et/ou tertiaire. Des analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ont montré la conservation de la structure secondaire de protéines (telles que le fibrinogène, l'albumine ou le lysozyme) insérées dans les architectures de polyélectrolytes (Schwinté et al. 2001). Par ailleurs, il a été montré que des enzymes, comme la glucose oxydase ou encore la glucoamylase insérées dans les films, conservent toute leur activité enzymatique (Onda et al. 1996).

Outre les protéines, d'autres bio-macromolécules comme l'ADN, peuvent être incorporées dans les films. En effet, l'ADN chargé négativement peut se substituer à un polyanion, qui en association avec de la PLL, conduit à un film multicouche PLL/ADN (Sukhorukov et al. 1996). Une telle surface permet une transfection directe de cellulesensemencées sur le film (Shi et al. 2002).

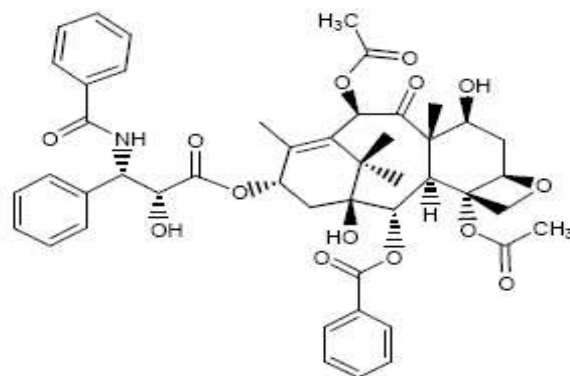


Figure 1.7. Structure moléculaire du paclitaxel ou Taxol.

Il est également possible d'insérer librement des molécules thérapeutiques dans les films multicouches de polyélectrolytes. En effet, des films PLL/HA ont trouvé une application spécifique comme réservoir de molécules anticancéreuses (Vodouhé et al. 2006). Le paclitaxel (ou Taxol) (**Figure 1.7**) est une molécule utilisée en chimiothérapie pour son

activité anti-proliférative dans le traitement du cancer du sein et des ovaires. Dans ce travail, les auteurs ont montré que la dose de Taxol insérée dans le film est complètement modulable et que l'activité de la molécule reste stable après son insertion. La viabilité de cellules cancéreuses ensemencées en surface peut alors être réduite de 80 % indiquant l'efficacité de tels films à visée thérapeutique.

Insertion de molécules biologiques par greffage covalent

Une autre voie de bio-fonctionnalisation consiste à inclure dans l'architecture multicouches, un polyélectrolyte modifié par couplage covalent avec une molécule d'intérêt biologique, par exemple un peptide. L' α -MSH (α -melanocyte stimulating hormone) est une hormone peptidique anti-inflammatoire qui a été incorporée avec succès dans des films multicouches PLL/PGA. L'hormone est couplée de façon covalente à la poly(L-lysine) par conjugaison à travers la formation d'un pont di-sulfure et conserve une activité similaire à celle de l'hormone libre. Tout d'abord, la PLL est couplée à l'aide d'un bras espaceur (**Figure 1.8**) comportant une fonction di-sulfure : le 3-(2-pyridyldithio) propionate de succinimidyle (SPDP, Sigma). Ensuite, l' α -MSH est ajoutée et les fonctions thiols de ce peptide réagissent par une réaction d'oxydoréduction en coupant le pont di-sulfure des bras espaceurs greffés sur la PLL et en formant un nouveau pont di-sulfure avec l'hormone peptidique.

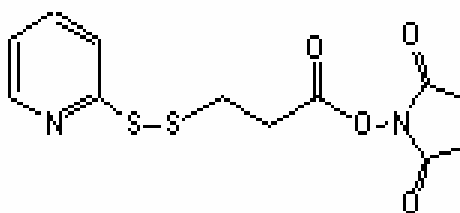


Figure 1.8. Structure moléculaire du 3-(2-pyridyldithio) propionate de succinimidyle (SPDP) utilisé comme bras espaceur reliant la PLL et l' α -MSH. Le groupement succinimidyle ester électrophile permet le greffage de la PLL par attaque des fonctions amines nucléophiles. Le pont di-sulfure est réduit par les groupes thiols de l' α -MSH pour former un nouveau pont di-sulfure entre l'hormone et le bras espaceur.

Les premiers travaux dans ce domaine ont permis d'évaluer la réponse de mélanocytes (cellules de mélanomes) mis au contact de films PLL/PGA comportant plusieurs couches de PLL couplées à l'hormone peptidique (PLL- α -MSH) (Chluba et al. 2001). Les auteurs ont montré qu'il était possible de moduler l'activité cellulaire induite par le peptide (production de mélanine) sur des échelles de temps courts, en jouant sur la profondeur d'enfouissement du peptide dans le film.

1.2.2 Films à interaction ligand/récepteur

Cette partie vise à décrire plusieurs exemples de films susceptibles d'établir une reconnaissance moléculaire. Les films multicouches de polyélectrolytes peuvent être fonctionnalisés par des ligands protéiques comme des anticorps, des protéines de signalisation ou encore par des enzymes pour envisager une bio-interaction de type ligand/récepteur avec respectivement des antigènes, des cellules ou encore des substrats enzymatiques.

Films immuno-sensibles

L'interaction anticorps-antigène est particulièrement concernée lors du développement des dispositifs de biodétection (biosensors). Ainsi, des anti-immunoglobulines (anti-IgG) ont été immobilisées au sein de multicouches composées de (PAH/PSS) pour former des films (PAH/PSS)/(anti-IgG/PSS) (Caruso et al. 1997). Les auteurs ont montré que l'activité immunologique des anti-IgG était maintenue après leur insertion à l'intérieur de tels assemblages. La reconnaissance moléculaire spécifique de ces films immunosensibles par des immunoglobulines IgG a été étudiée par microbalance à cristal de quartz et les résultats ont montré que la sensibilité de tels films augmentait de façon proportionnelle avec le nombre de couches d'anti-IgG déposées.

L'approche immunologique est également envisagée dans les thérapies concernant la lutte contre le cancer, en utilisant des anticorps qui se fixent de façon spécifique sur des marqueurs cellulaires associées aux tumeurs. Ainsi, des micro-capsules creuses composées de (PAH/PSS), ont été fonctionnalisées en surface avec des anticorps HuA33-Ab se liant spécifiquement sur les glycoprotéines transmembranaires HuA33-Antigen, récepteurs de cellules cancéreuses colorectales. Ces microcapsules présentent une grande efficacité et une très haute sélectivité dans le ciblage des cellules cancéreuses (Cortez et al. 2006).

Films à interaction cellule/protéine

L'étude de l'interaction cellule/protéine est essentielle pour le développement de matériaux bioactifs destinés à être mis au contact du milieu vivant. Il a été montré que des cellules de types monocytes peuvent communiquer avec une protéine de signalisation, la protéine A, enfouie au sein de films multicouches (Jessel et al. 2003). La protéine A a été insérée dans des films multicouches PLL/PGA puis des monocytes ont étéensemencés à la surface de l'architecture. L'interaction cellule/protéine A et la réponse cellulaire correspondante ont été mises en évidence en suivant la production d'une cytokine pro-inflammatoire, le TNF- α (tumor necrosis factor) sécrété par la cellule. Les auteurs de ce

travail ont également visualisé cette interaction par microscopie confocale à balayage laser. Pour cela, le film constitué de vingt paires de couches (PLL/PGA) est marqué en vert fluorescent suite à l'insertion de chaînes de PLL^{FITC} qui diffusent dans tout le film et est fonctionnalisé avec la protéine A marquée en rouge (protéine A-Texas Red, PA^{TR}) (**Figure 1.9**).

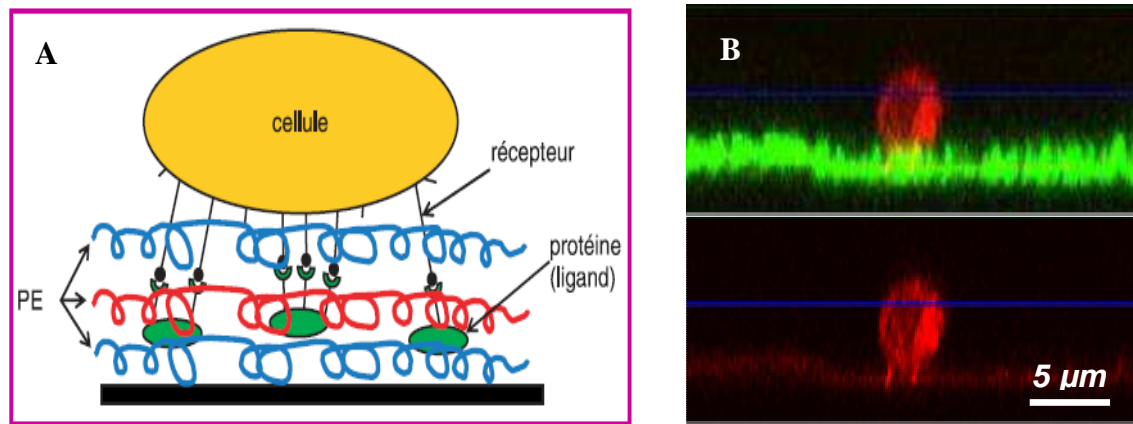


Figure 1.9. (A) Schéma de l'interaction cellule/protéine enfouie à l'intérieur d'un film multicouche. (B) Images en microscopie confocale de monocytes mis au contact d'un film PEI/(PLL/PGA)/PA^{TR}/(PGA/PLL)₁₈/(PGA/PLL^{FITC}) pendant 120 min. Image du haut : observation de la section du film avec les canaux vert et rouge. La bande verte correspond au film multicouches. Image du bas : observation de la section du film avec le canal rouge seulement.

La protéine A est localisée au niveau de sa couche de dépôt initial et les cellules initialement non fluorescentes présentent un marquage fluorescent rouge après 2 h d'ensemencement, indiquant l'interaction et l'internalisation avec la protéine A. Des dégradations locales du film apparaissent également, probablement suite à l'action d'enzymes spécifiques sécrétées par les cellules susceptibles de "couper" les liaisons peptidiques des chaînes de poly(L-lysine) ou bien de poly(acide-L-glutamique).

Surfaces biocatalytiques

L'activité spécifique des enzymes vis à vis de leur substrat constitue un axe de recherche attractif pour développer des biodétecteurs de molécules, des multi réacteurs à cascade de réactions, des nano-colloïdes biocatalytiques, ou encore des membranes auto-supportées à activité enzymatique.

Ainsi, des biodétecteurs spécifiques de molécules d'hydrogène, de fructose et de méthanol ont été conçus à partir de films contenant des couches de peroxydase, de fructose déshydrogénase et d'alcool oxydase (Narvaez et al. 2000). De plus, l'incorporation de plusieurs enzymes dans les multicouches permet de construire de véritables réacteurs

enzymatiques à cascades réactionnelles. En effet, des couches moléculaires de glucoamylase (GA) et de glucose oxydase (GOD) ont été déposées à des niveaux différents dans des films PEI/PSS pour constituer des multicouches [(PEI/PSS)₄/(PEI/GOD)₂/(PEI/PSS)₁₀/(PEI/GA)₂/PEI] construites sur une membrane d'ultrafiltration (Onda et al. 1996) (**Figure 1.10**). Par contact du film avec une solution aqueuse d'amidon, la GA placée en haut de l'assemblage décompose l'amidon en glucose qui diffuse vers le bas du film et la GOD convertit cette molécule en gluconolactone et en peroxyde d'hydrogène. Ces deux molécules sont alors récupérées par ultrafiltration.

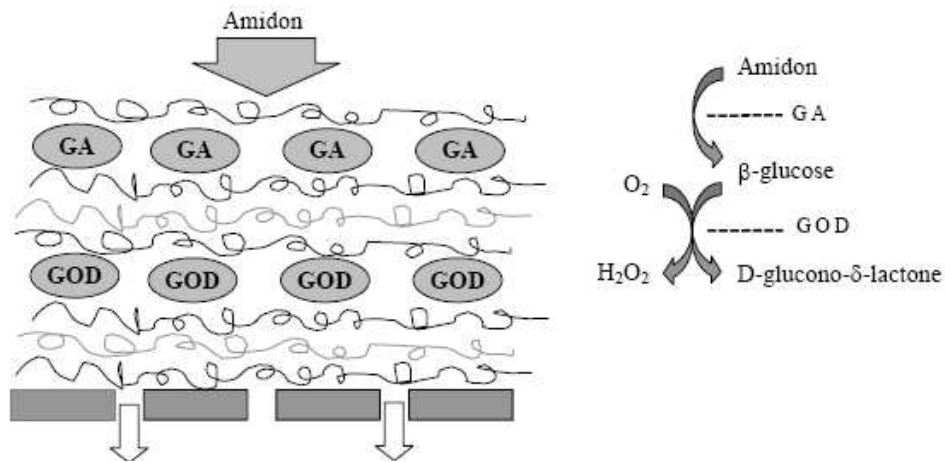


Figure 1.10. Processus enzymatique séquentiel dans un film multicouche à base de glucose oxydase (GOD) et de glucoamylase (GA) (Onda et al. 1996).

De nombreux travaux s'intéressent au développement de particules colloïdales présentant une activité enzymatique. Par exemple, des bio-colloïdes résultant de l'assemblage de multicouches PDADMA/PSS et d'uréase déposées sur des sphères de latex de 500 nm de diamètre ont été préparés en tant que nanoréacteurs colloïdaux pour catalyser l'hydrolyse de l'urée en dioxyde de carbone et en hydroxyde d'ammonium (Lvov and Caruso 2001). Ces auteurs ont montré que l'activité catalytique de ces bio-colloïdes était proportionnelle au nombre de couches d'uréase intégrées dans l'architecture.

Des surfaces planes peuvent aussi être envisagées comme surfaces biocatalytiques. Ainsi, des membranes à base de films PLL/HA fonctionnalisées avec de la phosphatase alcaline ont pu être détachées de leur substrat pour obtenir des membranes enzymatiques autosupportées (Lavalle et al. 2005). Dans ce travail, il est à noter que la réticulation chimique entre les polyélectrolytes a permis d'améliorer la cohésion de la membrane permettant ainsi son détachement du support.

1.2.3 Films multi-compartiments : stockage et libération de principes actifs

Réservoirs et Barrières

Certaines couches à base de polyélectrolytes, de particules minérales ou de polymères organiques ont la propriété de se comporter comme une barrière vis-à-vis de la diffusion d'ions ou de molécules dans un film multicouches. Un exemple de barrière a été présenté par Glinel *et coll.* Des particules de cire déposées à 25°C sur un film (PAH/PSS)₉/PAH forment ensuite à 60°C une couche hydrophobe empêchant totalement la diffusion de molécules d'eau à l'intérieur du film (**Figure 1.11**). Ce type de système est intéressant pour limiter l'entrée d'eau, d'ions ou de médicaments hydrophiles.

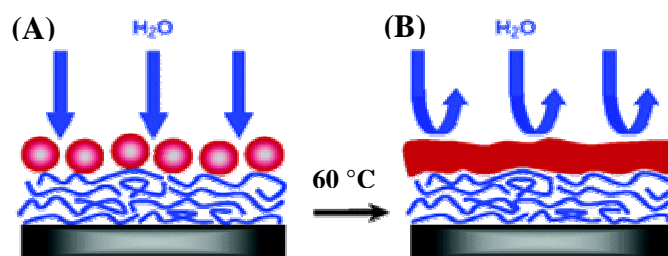


Figure 1.11. (A) Représentation schématique d'un film (PAH/PSS)₉/PAH sur lequel des particules de cire représentées en rouge ont été déposées à 25°C. (B) Après passage à 60°C les particules forment une couche imperméable aux molécules d'eau (Glinel et al. 2004)

L'insertion au cours de la construction, d'une ou de plusieurs couches barrières permet d'élaborer des systèmes stratifiés constitués de compartiments où chaque compartiment peut contenir une molécule de nature différente. Tout au long de ce manuscrit, les termes "réservoir" ou "compartiment" auront la même signification et seront utilisés en tant que synonymes.

Récemment, au Laboratoire de Biomatériaux de l'UMR-S 595 INSERM, des systèmes à multi-compartiments basés sur des multicouches de polyélectrolytes ont été construits par l'alternance de films à croissance exponentielle PLL/HA avec des films à croissance linéaire PSS/PAH (Garza et al. 2004). Les films linéaires tels que PSS/PAH sont fins (épaisseur de l'ordre d'une dizaine de nanomètres après le dépôt de 10 paires de couches), rigides, avec une structure assez stratifiée et une faible mobilité des chaînes de polyélectrolytes. Les films exponentiels comme PLL/HA sont plutôt épais, de texture similaire à celle d'un gel et une partie des polyélectrolytes qui le constitue sont fortement mobiles. Les auteurs de ce travail ont montré qu'un film PSS/PAH intercalé entre deux compartiments PLL/HA se comportait

comme une véritable barrière en empêchant la diffusion des chaînes de polyélectrolytes d'un compartiment à l'autre (**Figure 1.12**).

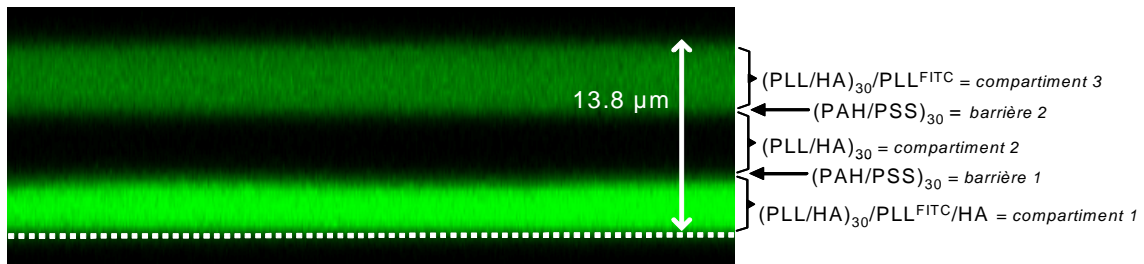


Figure 1.12. Observation en microscopie confocale de la section en z d'un film $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}^{\text{FITC}}/\text{HA}/(\text{PAH}/\text{PSS})_{30}/(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/(\text{PAH}/\text{PSS})_{30}/(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}^{\text{FITC}}$ (3 compartiments séparés par 2 barrières). La PLL^{FITC} correspond à de la PLL couplée de façon covalente avec un marqueur vert fluorescent : la fluorescéine isothiocyanate (FITC). La ligne en pointillés blancs correspond à la position de la lamelle de verre.

Ces multi-compartiments permettent d'envisager le développement de films composés de plusieurs réservoirs stockant des principes actifs ou des macromolécules biologiques. Ces systèmes polymériques sont d'autant plus intéressants s'ils permettent une libération des principes actifs mais ceci requiert l'ouverture ou la dégradation de la barrière de façon contrôlée.

Dégradation de barrières et libération contrôlée en milieu physiologique

Pour des applications biomédicales, la dégradation de la barrière suite à l'incubation de cellules sur ces films est envisageable. Cependant, il a été montré que les barrières constituées de couches à base de (PAH/PSS) n'étaient pas dégradables par des cellules de moelle osseuse, en particulier par les monocytes malgré leur grande capacité de phagocytose (Garza et al. 2005). Un autre système a été alors proposé où une couche de polymère biocompatible et hydrolysable utilisée comme barrière, le co-polyester d'acide lactique et glycolique (poly(lactic-co-glycolic) acid, PLGA) a été déposé entre deux réservoirs PLL/HA (Garza et al. 2005). Le dépôt sur les multicouches de ce polymère solubilisé dans le chloroforme se fait soit par la méthode dite de "solvent casting" soit par nébulisation. L'ensemble du film se comporte comme un système réservoirs/barrière empêchant la diffusion de molécules libres comme la PLL d'un réservoir à l'autre (**Figure 1.13**). Les auteurs ont mis en évidence que des cellules de moelle osseuse dégradent la barrière de PLGA en quelques jours et peuvent ainsi avoir accès aux molécules contenues dans le réservoir sous-jacent, dans ce cas des molécules de poly(L-lysine) marquées par la fluorescéine isothiocyanate (FITC), un fluorophore émettant dans le vert.

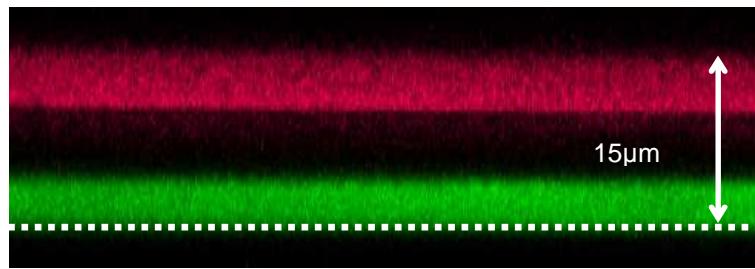


Figure 1.13. Observation en microscopie confocale de la section en z d'un film $(PLL/HA)_{30}/PLL^{FITC}/PLGA/(PLL/HA)_{30}/PLL^{Rho}$ (2 compartiments séparés par 1 barrière de PLGA). La PLL^{Rho} correspond à de la PLL couplée de façon covalente avec un marqueur rouge fluorescent : la rhodamine (Rho). La ligne en pointillés blancs correspond à la position de la lamelle de verre.

Une solution permettant la libération contrôlée de molécules bioactives en milieu physiologique repose sur la construction de films multicouches hydrolysables. Des assemblages de ce type ont été réalisés à partir d'un polycation de type poly(β -amino ester) dégradé par hydrolyse des fonctions ester et d'un polyanion non dégradé. Ce polyanion peut être lui même le facteur biologique ou bien il peut correspondre à un polyélectrolyte portant la molécule active. Des travaux ont montré que de tels assemblages présentent une érosion graduelle sous conditions physiologiques ce qui permet par la suite la libération séquentielle de polyanions fonctionnels tels que l'ADN ou l'héparine (**Figure 1.14**) (Vazquez et al. 2002; Wood et al. 2006).

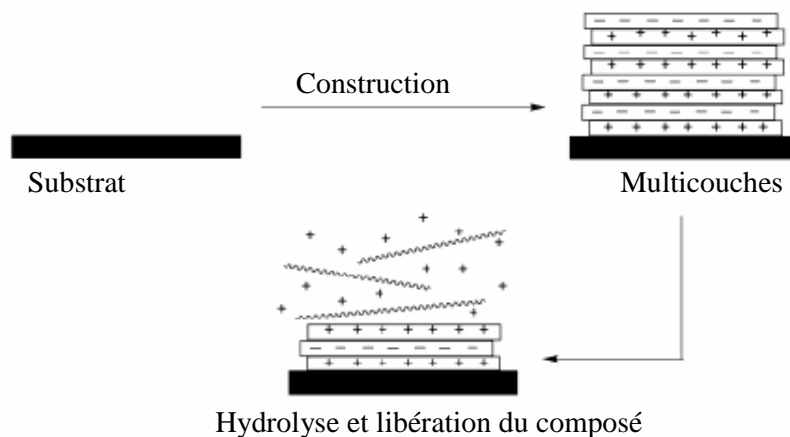


Figure 1.14. Schéma de la construction d'un film dégradé par hydrolyse. Le film est composé d'un polycation dégradé, un poly(β -amino ester) et d'un polyanion biologique (tel que l'ADN ou l'héparine) non dégradé dans le milieu utilisé, qui intervient pour maintenir l'intégrité du film et également en tant que composé actif destiné à être libéré (Vazquez et al. 2002; Wood et al. 2006).

1.3 Films multicouches adaptatifs répondant à différents stimuli

1.3.1 Films répondant au pH

Dissolution de films

Perméabilité contrôlée par micro/nanoporosité

Membranes à sélectivité ionique bi-polaire

1.3.2 Films répondant à la température

Par transition vitreuse

Utilisation de copolymères à blocs hydrophiles-hydrophobes

1.3.3 Films répondant aux rayonnements UV, Visible, IR

Modulation de la perméabilité par une réaction photochimique

Libération d'un principe actif par effet plasmon de surface

Dans cette partie, nous nous intéressons à décrire des études concernant les films multicouches répondant à différents stimuli. Ces réponses induites sont caractérisées par des changements de propriétés physico-chimiques des films multicouches. Ces films présentent en effet un grand intérêt pour réaliser des surfaces fonctionnelles adaptatives. Nous avons choisi de présenter des exemples répondant à trois stimuli très étudiés : le pH, la température et la lumière.

1.3.1 Films répondant au pH

Dans le cas des films multicouches de polyélectrolytes contenant des polyacides ou des polybases faibles, la distribution de charge à l'intérieur du film peut être modulée par le pH du milieu environnant. De même pour les films basés sur des liaisons hydrogène constitués de polyacides faibles, la distribution de liaisons hydrogènes peut également être modifiée par une variation de pH. Cette redistribution des liaisons intermoléculaires entraîne différents effets macroscopiques sur la structure comme la dissolution, la formation de pores uniformément distribués sur toute la surface ou encore le gonflement du film.

Dissolution de films

Des films multicouches à liaisons hydrogène ont la propriété de se dissoudre complètement sous l'effet d'une augmentation de pH. En effet l'ionisation des fonctions acides de l'assemblage en groupes carboxylates, entraîne l'effondrement du réseau de liaison hydrogènes, stable à bas pH. Ainsi, des films constitués de poly(éthylène oxyde)/poly(acide méthacrylique) (PEO/PMAA) et de poly(N-vinylpyrrolidone)/poly(acide méthacrylique) (PVPO/PMAA) commencent à se disloquer à des pH respectivement voisins de pH = 4.6 et pH = 6.9, puis se dissolvent complètement pour des pH supérieurs à ces valeurs (Sukhishvili and Granick 2000; Sukhishvili and Granick 2002).

Perméabilité contrôlée par micro/nanoporosité

La formation de pores induits par une variation de pH a été expérimentalement mise en évidence aussi bien pour les films multicouches de polyélectrolytes construits sur des supports plans (Mendelsohn et al. 2000) que pour les capsules creuses. Ainsi, la nanoporosité induite réversiblement par le pH dans les parois des capsules à base de films PSS/PAH permet de concevoir des capsules à perméabilité contrôlée (Antipov et al. 2002), (Sukhorukov et al. 2004). En effet, lorsque le pH est inférieur à 6.5, la paroi des capsules s'ouvre par augmentation de la taille des pores permettant la diffusion de macromolécules de dextrane à l'intérieur de la capsule. Lorsque le pH est supérieur à 8.2, les pores de la paroi se referment, empêchant le passage des macromolécules de dextrane (**Figure 1.15**).

L'existence d'une telle nanoporosité réversiblement contrôlée par le pH a été également démontrée avec des films PAH/PAA (Hiller et al. 2002). Les auteurs de ce travail ont prouvé que de tels assemblages nanostructurés utilisés comme revêtement de surface sur des verres optiques présentaient des propriétés anti-réfléchissantes remarquables réduisant la lumière réfléchie de 8 % à 0.1 %.

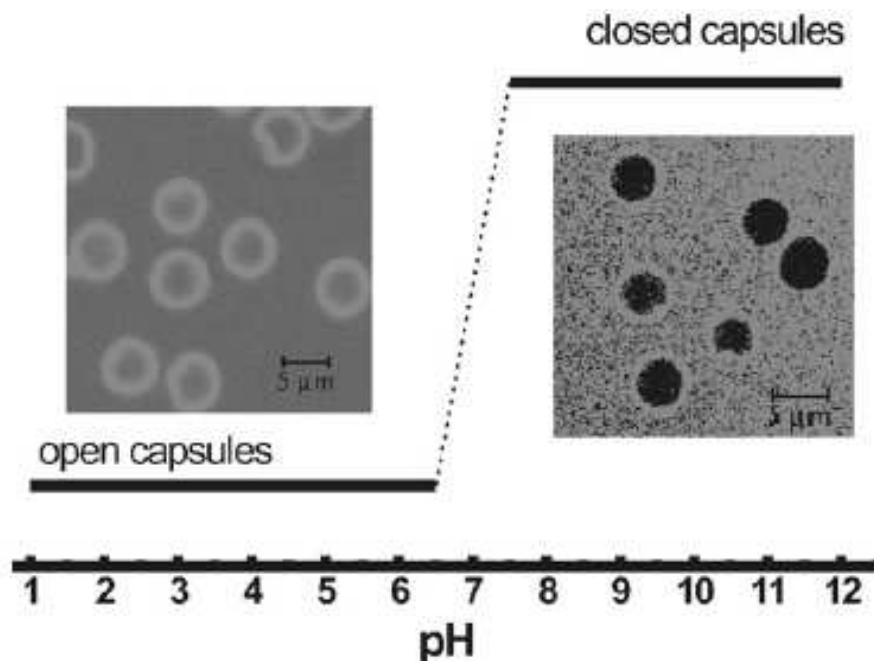


Figure 1.15. Observations par microscopie confocale de la perméabilité de capsules creuses composées de $(\text{PSS/PAH})_4$ vis-à-vis de molécules de dextrane-FITC (masse molaire 77 000 g/mol). Ouverture à $\text{pH}=3.5$ et fermeture à $\text{pH}=10.0$ des capsules (Antipov et al. 2002).

Membranes à selectivité ionique bi-polaire

Récemment, Park et coll., ont montré que la construction de films multicouches à base de polyélectrolytes partiellement couplés à la benzophénone (BP), PAA-BP/PAH-BP, suivie d'une réticulation photochimique entre ces groupements benzophénone, permettait d'obtenir des membranes très résistantes et d'une grande stabilité sur une très large gamme de pH (Park et al. 2004). La composition en groupes ionisables acides carboxyliques et amines du film a pu être facilement modulée par variation de pH permettant ainsi l'obtention d'une membrane ionique bi-polaire par passage d'un excès de charges positives (dûes aux groupes ammoniums) à un excès de charges négatives (dûes aux groupes carboxylates). Les auteurs de ce travail ont démontré que ces assemblages constituaient des membranes sélectives aux ions, avec une sélectivité aux anions lorsque l'on se place dans un milieu extérieur de faible pH et aux cations lorsque l'on se place dans un milieu extérieur de pH élevé.

1.3.2 Films répondant à la température

Par transition vitreuse

La température influence l'état de la matière dans lequel se trouvent les films multicouches de polyélectrolytes. En effet, l'étude du comportement thermique de microcapsules à base de PDADMA/PSS a permis de mettre en évidence une transition de

phase pour une température d'environ 35°C : on passe alors d'une phase de nature vitreuse à une phase gel de type liquide visqueux (Mueller et al. 2005). D'un point de vue moléculaire, cette transition de phase vitreuse se traduit par une forte augmentation de la mobilité des chaînes de polymères au sein de la capsule. Ces auteurs ont mesuré des grandeurs viscoélastiques qui seront discutées par la suite. De plus, la nature du polyélectrolyte déposé à la surface de la capsule influence énormément leur comportement thermique (Köhler and Möhwald 2006). En effet, sous l'action de la chaleur, les capsules se terminant par PSS se contractent (le rayon diminue) avec une forte augmentation de l'épaisseur de la paroi, alors que les capsules se terminant par PDADMA se dilatent (**Figure 1.16**).

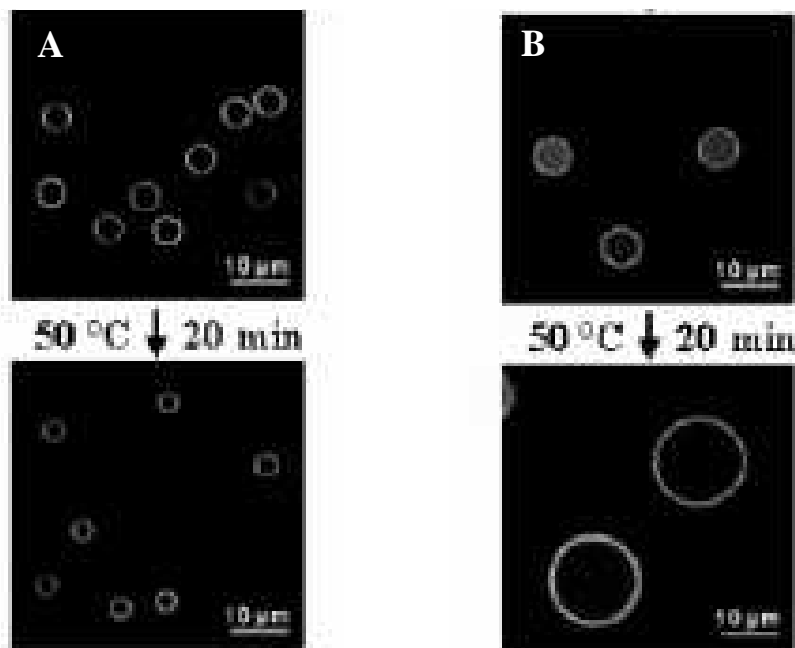


Figure 1.16. Effets de la température sur des capsules creuses à base de films multicouches PDADMA/PSS. A) Capsules se terminant par PSS : effet de contraction, B) Capsules se terminant par PDADMA : effet de dilatation (Köhler and Möhwald 2006).

Ces effets sont notamment attribués à des interactions de surface entre le solvant (milieu tampon) et les chaînes polymères très mobiles à haute température. Les chaînes de PSS possédant des groupes aromatiques n'ayant pas d'interactions favorables avec les molécules d'eau du milieu (effet hydrophobe), le comportement thermique de la capsule se traduit par un effet de contraction due à une minimisation de la surface polymère-eau. Par contre, les chaînes de PDADMA étant très chargées en surface et pas très hydrophobes, le comportement thermique de la capsule se traduit par une expansion de la capsule pour minimiser la répulsion électrostatique entre les charges positives de la surface. Ces

observations suggèrent que l'augmentation de la température permet d'accroître la fluidité de la capsule et donc sa capacité à se déformer.

Utilisation de copolymères à blocs hydrophiles-hydrophobes

Le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) est un polymère thermosensible soluble en milieu aqueux à basse température, mais insoluble au dessus d'une température critique (lower critical solution temperature LCST) vers 32 °C. A cette température, le polymère subit une transition de phase réversible en expulsant les molécules d'eau solvatant initialement les monomères.

Des films multicouches de polyélectrolytes thermosensibles ont été fabriquées à partir de copolymères chargés contenant le poly(N-isopropylacrylamide) : PSS-co-PNIPAM et PAH-co-PNIPAM. L'étude de la quantité d'eau dans le film en fonction de la température a mis en évidence l'existence de deux transitions de phase, microscopique et macroscopique respectivement à 33°C et 45°C (Jaber and Schlenoff 2005). Sous l'action du chauffage, près de 50% de la quantité d'eau contenue initialement dans le film est expulsée de façon réversible. Une application prometteuse de tels assemblages thermosensibles concerne la libération de médicaments par changement de température, par exemple en réalisant le chargement d'un principe actif dans le film à 20°C et en provoquant sa libération spontanée en le plaçant dans un milieu physiologique à 37°C. Ainsi, des microgels constitués de poly(N-isopropylacrylamide-co-acide acrylique) (PNIPAM-co-PAA) et de polyallylamine (PAH) ont été chargés par un médicament utilisé en chimiothérapie, la doxorubicine. Par déclenchement de pulses thermiques entre 20 et 50°C, ce médicament a pu être libéré de façon contrôlée (Serpe et al. 2005).

1.3.3 Films répondant aux rayonnements UV, Visible, IR

Modulation de la perméabilité par une réaction photochimique

Des réactions photochimiques peuvent être utilisées soit pour augmenter, soit pour diminuer la perméabilité de capsules creuses à base de multicouches de polyélectrolytes. Ainsi, le Rouge Congo, molécule photosensible, a été utilisé comme un des constituants de la paroi de capsules creuses formées par l'association de films PSS/PAH et PDADMA/Rouge Congo. Sous l'action de la lumière visible, le Rouge Congo est éliminé de la paroi de la capsule la rendant perméable vis-à-vis d'une macromolécule comme le dextrane (Tao et al. 2001).

Inversement, il est possible de diminuer la perméabilité de la paroi des capsules creuses par réticulation photochimique. Sous l'action d'un rayonnement UV, les interactions électrostatiques faibles entre des chaînes de diazorésine et de poly(styrène sulfonate) constituant la capsule, sont converties en liaisons covalentes, renforçant ainsi sa cohésion (Zhu and McShane 2005). Ces auteurs ont montré qu'il était possible d'encapsuler une enzyme, la glucose oxydase, tout d'abord par diffusion à travers la paroi de la capsule perméable. Ensuite, une irradiation des particules par rayonnement UV rend la capsule imperméable et conduit à l'emprisonnement de l'enzyme à l'intérieur de celle-ci (**Figure 1.17**).

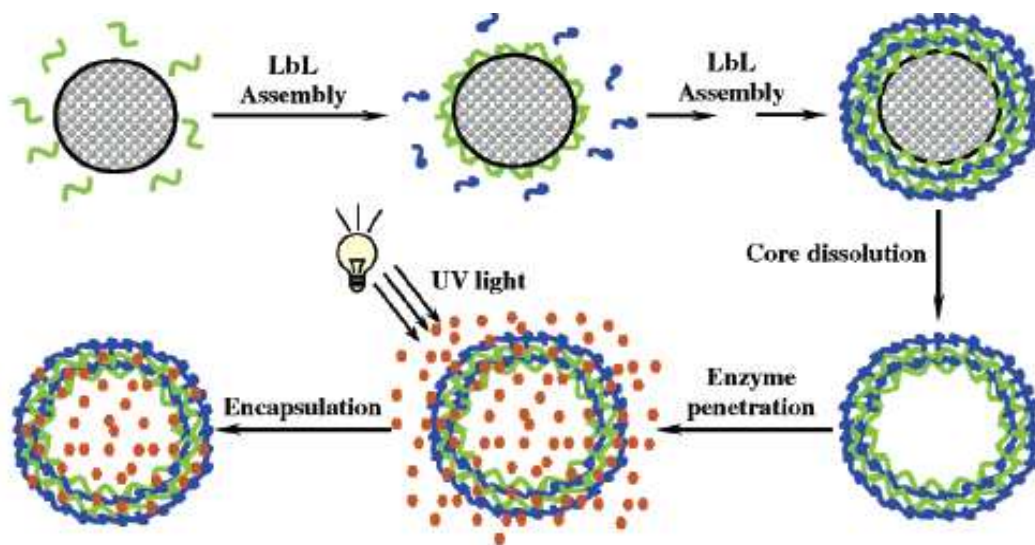


Figure 1.17. Diagramme schématique illustrant l'encapsulation par réticulation photochimique de la glucose oxydase dans des microcapsules à base de films diazorésine/poly(styrène sulfonate) (DAR/PSS) (Zhu and McShane 2005).

Libération d'un principe actif par effet plasmon de surface

La conversion d'un rayonnement en chaleur par des nanoparticules métalliques permet d'envisager de nombreuses applications pour la libération contrôlée de principes actifs par pulses lasers. En effet, des nanoparticules d'or ou d'argent incluses dans les parois des capsules ont la propriété d'absorber fortement l'énergie du rayonnement IR et de la restituer au milieu sous la forme d'échauffement local entraînant la dégradation voire la rupture des capsules (Skirtach et al. 2004; Angelatos et al. 2005). L'utilisation d'un tel rayonnement est particulièrement attractive dans le cas d'applications biomédicales en raison de la faible absorption du rayonnement IR par la plupart des tissus humains. Des macromolécules biologiques comme le dextrane ont été encapsulées dans des microcapsules creuses composées d'un assemblage de couches de (PSS/PAH) et de nanoparticules d'or. Sous l'effet

de pulses laser courts émis dans un rayonnement IR proche, le dextrane a pu être libéré par désintégration de la capsule (**Figure 1.18**) suite à l'effet plasmon des particules d'or (Angelatos et al. 2005).

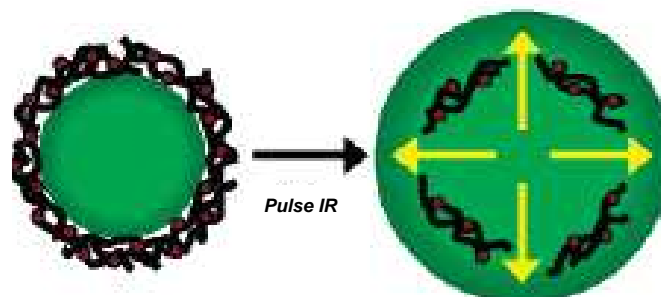


Figure 1.18. Schéma d'une capsule à base de multicouches PAH/PSS et de nanoparticules d'or (en rouge) chargée en macromolécules de dextran-FITC (en vert). La libération à distance de la macromolécule encapsulée est réalisée par dégradation de la coquille photo-activable en utilisant des pulses courts de rayonnement laser dans l'IR proche (Angelatos et al. 2005).

Ce travail s'inscrit notamment dans le développement de nano/microcapsules à visée thérapeutique pour la vectorisation de médicaments vers des cellules cancéreuses.

1.4 Assemblages polymériques sous stimuli mécaniques

1.4.1 Propriétés mécaniques des films multicouches

Des propriétés mécaniques très variables

Interprétation moléculaire des propriétés mécaniques

Facteurs influençant la mobilité des chaînes de polyélectrolytes

1.4.2 Films polymériques répondant aux stimuli mécaniques

Surfaces à mouillabilité/hydrophobicité réversiblement contrôlées

Surfaces à gradients moléculaires

Libération contrôlée de molécules sous contrainte mécanique

1.4.1 Propriétés mécaniques des films multicouches

La connaissance des propriétés mécaniques des films multicouches de polyélectrolytes est d'une importance primordiale en vue d'applications notamment dans le domaine des membranes auto-supportées ou encore dans le développement de surfaces adhérentes aux cellules.

Des propriétés mécaniques très variables

Les films multicouches de polyélectrolytes existent à température ambiante dans différents états de la matière, ce qui leur confère des propriétés mécaniques très diverses. De nombreux films consistent en des gels viscoélastiques, c'est-à-dire des matériaux mous ayant à la fois un comportement de type fluide visqueux caractérisé par la viscosité η et un comportement de matériau solide élastique caractérisé par le module élastique E (ou module d'Young) qui quantifie la contrainte surfacique nécessaire à déformer le matériau dans son domaine élastique. Ainsi les films PLL/HA présentent les caractéristiques d'un liquide avec une forte viscosité égale à environ 0.1 poiseuille (Picart et al. 2001) et un faible module élastique de l'ordre de quelques kilopascals (Schneider et al. 2006). De même, les films PLL/PGA possèdent les caractéristiques de gels viscoélastiques (Kulcsar et al. 2005). Il est même possible de réaliser des films multicouches de polyélectrolytes avec une réponse purement élastique par réticulation chimique entre des chaînes de polyélectrolytes dans des films PLL/HA en utilisant de l'éthyl-diméthylaminopropyl-carbodiimide (EDC) comme agent de réticulation en présence de N-hydroxysulfosuccinimide (NHS) jouant le rôle de catalyseur

(Collin et al. 2004). Enfin, d'autres films possèdent un état de la matière proche d'un état solide ou vitreux, tels que les films PSS/PAH (Kulcsar et al. 2005); (von Klitzing 2006).

Les paramètres mécaniques sont obtenus à partir de différentes méthodes expérimentales :

- Détermination du module élastique et de la résistance mécanique (*ultimate tensile strenght*) par traction de membranes autosupportées constituées de multicouches (Mamedov et al. 2002; Tang et al. 2003)
- Mesure du module élastique par des courbes d'indentation en utilisant une pointe d'AFM ou une particule sphérique colloïdale déposée sur la pointe du cantilever (Mermut et al. 2003; Schneider et al. 2006)
- Mesure du module élastique de capsules constituées de multicouches de polyélectrolytes par différence de pression osmotique (Gao et al. 2001; Gao et al. 2001)
- Accès à la viscosité et au module élastique par piezo-rhéométrie en mesurant le module de cisaillement complexe ($G = G' + iG''$), déterminé en régime fréquentiel (Collin et al. 2004)

La détermination des modules élastiques a pu être réalisée pour de nombreux films multicouches assemblés sur une surface plane ou sous la forme de capsules creuses. Ces résultats sont résumés dans le tableau suivant (**Tableau 1.2**) :

Films multicouches	Module élastique (MPa)	Méthode et référence
PLL/HA Films plans	0.01	Courbes d'indentation AFM (Schneider et al. 2006)
PLL/HA réticulés avec EDC/NHS, Films Plans	0.1 - 0.5	Courbes d'indentation AFM (Schneider et al. 2006), Piezo-rhéométrie (Collin et al. 2004)
PDADMA/PSS Films Plans Capsules	10 - 100	Système d'analyse micromécanique (Jaber and Schlenoff 2006), Différence de pression osmotique sur des capsules (Gao et al. 2001)
PAH/PSS Capsules creuses	500	Déformation de capsules par AFM (Gao et al. 2001)

Tableau 1.2. Modules élastiques (modules d'Young) de différents films multicouches de polyélectrolytes.

La résistance mécanique des films multicouches de polyélectrolytes peut être largement améliorée soit par réticulation chimique entre les chaînes de polyélectrolytes, soit

par insertion d'agents rigidifiants. Ainsi, des membranes de type « briques et mortier », de structure similaire à la nacre, ont été construites à partir de chaînes de PDADMA jouant le rôle de ciment entre des nano-plaquettes de montmorillonite (Tang et al. 2003). Ces assemblages possèdent une résistance mécanique proche des matériaux plastiques les plus durs. De même, des membranes extrêmement solides fabriqués par l'assemblage de PEI et de nanotubes de carbone (SWNT), possèdent une résistance mécanique voisine de celles de céramiques ultradures (Mamedov et al. 2002). Les valeurs des résistances mécaniques sont rassemblées dans le tableau suivant (**Tableau 1.3**) :

Assemblages polymériques ou matériaux	Résistance mécanique (MPa) (<i>Ultimate tensile strength</i>)
Films PEI/PAA	1-10 (Mamedov et al. 2002)
Films PDADMA/argile	50 (Tang et al. 2003)
Plastiques industriels durs	20-70 (Mamedov et al. 2002)
Nacre	150 (Tang et al. 2003)
PEI/SWNT	200 (Mamedov et al. 2002)
Céramiques ultra-dures	300 (Mamedov et al. 2002)
Nanotubes de carbones (SWNT)	20 000-50 000 (Mamedov et al. 2002)

Tableau 1.3. Résistance mécanique (*ultimate tensile strength*) de différents assemblages moléculaires et supramoléculaires (Mamedov et al. 2002; Tang et al. 2003).

Interprétation moléculaire des propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des films multicouches de polyélectrolytes sont directement reliées à la mobilité des chaînes de polyélectrolytes au sein du film. En effet, les chaînes de polymères ne sont pas systématiquement figées par attraction électrostatique et il existe un certain degré de mobilité qui dépend de la nature de l'assemblage. De nombreux travaux ont concerné la mesure des coefficients de diffusion des chaînes de polyélectrolytes pour des films multicouches à croissance linéaire ou exponentielle. Par exemple, le coefficient de diffusion des chaînes de polymères dans des films à croissance linéaire tels que PAH/PSS, a été estimé à moins de $10^{-14} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (R. von Klitzing 2006) indiquant pour ces films vitreux une très faible mobilité des chaînes de polyélectrolytes, alors que celui de films à croissance exponentielle PLL/HA a été estimé à des valeurs comprise entre 10^{-8} et $10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Richert et al. 2004; Picart et al. 2005) indiquant pour ces films viscoélastiques une très forte mobilité des chaînes.

La dynamique moléculaire des chaînes de polyélectrolytes résulte notamment de la compétition énergétique entre l'attraction électrostatique et l'agitation thermique. A température fixée (température ambiante), les propriétés mécaniques dépendent donc de la force d'interaction électrostatique s'exerçant entre les polycations et les polyanions dans le film. Laugel et al., ont mis en évidence une relation entre le mode de croissance des films multicouches de polyélectrolytes et l'enthalpie de complexation relative à la formation des complexes polycation/polyanion dans le film (Laugel et al. 2006). Des films à croissance linéaire, comme PAH/PSS, présentent un processus de complexation fortement exothermique traduisant une forte attraction électrostatique entre les chaînes de polyélectrolytes. Inversement, des films à croissance exponentielle comme PGA/PLL se caractérisent par un processus de complexation endothermique conséquence d'une faible attraction électrostatique. Cette étude montre une corrélation entre le degré d'association des chaînes de polyélectrolytes et le mode de croissance des films multicouches de polyélectrolytes. Elle suggère également que les propriétés mécaniques des films multicouches de polyélectrolytes dépendent largement de la cohésion électrostatique de l'assemblage.

Facteurs influençant la mobilité des chaînes de polyélectrolytes

Influence de la force ionique

Différents facteurs influent sur la mobilité des chaînes dans un film multicouches de polyélectrolytes. Ainsi la diffusion inter-chaînes entre les couches d'un film pseudo-stratifié PDADMA/PSS sous l'effet de la force ionique a été mise en évidence par réflectivité des neutrons (Jomaa and Schlenoff 2005). La force ionique permet notamment de contrôler le degré d'association entre les chaînes de polyélectrolytes. En effet, plus le taux de sel est important et plus les contre-ions ont tendance à écranter les charges des chaînes de polyélectrolytes. Ceci affaiblit la force de la liaison électrostatique entre les polycations et les polyanions et par conséquent accroît la mobilité des chaînes de polyélectrolytes. D'un point de vue macroscopique, l'augmentation de la mobilité des chaînes avec la force ionique entraîne une diminution du module élastique du film. Jaber et Schlenoff ont étudié le comportement viscoélastique de films PDADMA/PSS par des cycles d'étirement mécaniques (**Figure 1.19**) et ont mis en évidence l'influence du taux de sel sur la valeur du module élastique de ces assemblages (Jaber and Schlenoff 2006).

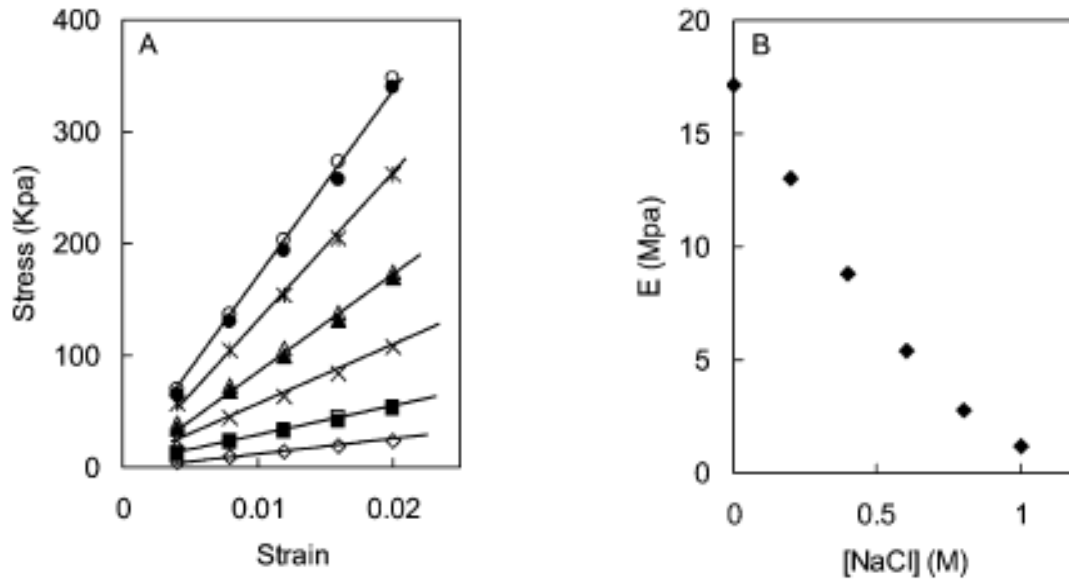


Figure 1.19. (A) Courbes de contrainte-déformation obtenue par des cycles d'étirement sur des films PDADMA/PSS pour différentes concentrations de NaCl. Les courbes obtenues correspondent du bas vers le haut à des concentrations de 0 (\diamond), 0.2 (\blacksquare), 0.4 (\times), 0.6 (\blacktriangle), 0.8($*$) et 1M (\circ et \bullet) en NaCl. (B) Evolution du module élastique en fonction du taux de NaCl. Les modules élastiques ont été obtenus à partir des courbes de gauche (Jaber and Schlenoff 2006).

Influence de la température

La température influence aussi les propriétés viscoélastiques des films multicouches. Par exemple, Mueller et al, ont montré que le module élastique de capsules creuses à base de multicouches PDADMA/PSS était divisé d'un facteur proche de 100 passant de 100 MPa à 1 MPa, par simple chauffage (Mueller et al. 2005). En fait cette diminution importante du module d'Young est attribuée à une transition de phase vitreuse se situant vers 35°C faisant passer le film initialement vitreux à température ambiante à un état beaucoup plus mou pour des températures supérieures, se traduisant par une très forte augmentation de la mobilité des chaînes par agitation thermique moléculaire.

1.4.2 Films polymériques répondant aux stimuli mécaniques

Dans cette partie, nous nous intéressons à la description d'assemblages polymériques et moléculaires utilisés comme films mécaniquement actifs, c'est-à-dire, répondant sous l'action de stimuli mécaniques par la modification de leurs propriétés physiques ou chimiques. Une action mécanique (de type étirement ou relaxation) permet notamment de moduler le caractère hydrophile ou hydrophobe, de créer des gradients moléculaires sur une surface ou encore de libérer des principes actifs contenus dans la matrice polymérique constituant le film.

Surfaces à mouillabilité/hydrophobicité réversiblement contrôlées

Des surfaces hydrophiles aux surfaces hydrophobes

Récemment, un nouveau type de surface basé sur le dépôt direct de multicouches de polyélectrolytes sur des feuilles de silicone, a permis de passer réversiblement d'un comportement surfacique hydrophile à un comportement surfacique hydrophobe, par simple étirement mécanique longitudinal du substrat de silicone (Hemmerle et al. 2005). Un polyélectrolyte hydrophobe, le Nafion a été utilisé pour construire des assemblages formés de films multicouches poly(allylamine)/Nafion (PAH/Naf) en tant que strate hydrophobe et poly(allylamine)/poly(acrylic acid) (PAH/PAA) en tant que strate hydrophile. L'angle de contact d'un film PEI/(Naf/PAH)₄/Naf/(PAH/PAA)₂ a été mesuré au cours de plusieurs cycles d'élongation/rétraction successifs et a conduit à des valeurs alternant réversiblement entre 57 et 100° lorsque l'on passe d'un état non-étiré à un état étiré (taux d'étirement de 2.2) (**Figure 1.20**). Cette observation s'explique notamment par l'exposition en surface de la strate hydrophobe Naf/PAH sous étirement et son ré-enfouissement lors du retour à un état de repos (rétraction).

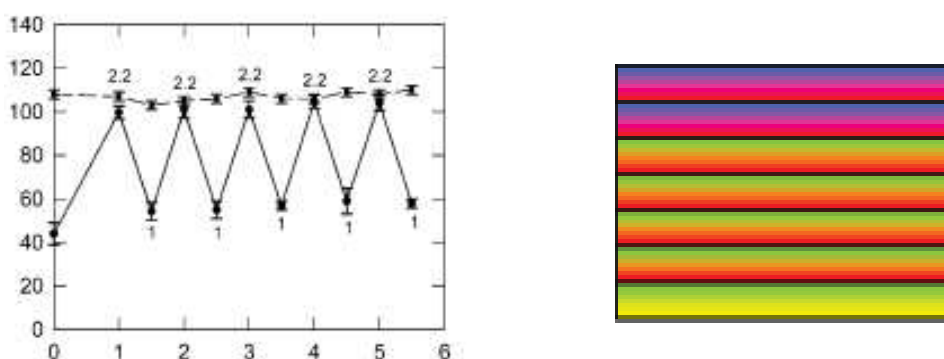


Figure 1.20. A gauche : Courbe représentant l'évolution de l'angle de contact durant les cycles d'élongation/rétraction pour une multicouche (PEI/Naf)/(PAH/Naf)₄/(PAH/PAA)₂. La valeur de 1 correspond à l'état non-étiré et la valeur de 2.2 à l'état étiré (d'un taux égal à 2.2 fois la longueur initiale du substrat de silicone). A droite : Schéma de la structure supposée stratifiée d'un tel film : les bandes vertes et jaunes correspondent à (PEI/Naf), les bandes rouges et vertes à (PAH/Naf) et les bandes rouges et bleues à (PAH/PAA) (Hemmerle et al. 2005).

Surfaces superhydrophobes à base de monocouches mécaniquement assemblées

Les propriétés hydrophobes des matériaux peuvent également être améliorées en couplant des molécules organiques par liaison covalente aux surfaces. La manipulation mécanique des sites de greffages de ces molécules sur un substrat élastomère fournit un moyen de fabriquer des monocouches mécaniquement assemblées avec des propriétés super

hydrophobes. Ainsi, Genzer et Efimenko ont montré qu'il était possible d'augmenter la densité surfacique de chaînes perfluoroalcanes sur une surface élastomère de poly(diméthylsiloxane) (PDMS) par une simple manipulation mécanique du substrat (Genzer and Efimenko 2000). La méthode pour fabriquer de telles surfaces est présentée sur la **Figure 1.21** décrite dans le paragraphe qui suit.

Lorsque la surface de PDMS est soumise à un étirement mécanique, d'une elongation Δx , le nombre de points de greffages hydroxyles créée par un traitement UV/Ozone (UVO) sur la surface de PDMS est augmenté par rapport à l'état non-étiré (suite à une augmentation de l'aire du substrat de PDMS). Les chaînes de perfluoroalcanes sont alors greffées sur la surface étirée par réaction chimique entre ces fonctions hydroxyles présentes en surface et des trichlorosilanes semi fluorés $F(CF_2)_y(CH_2)_xSiCl_3$ noté $FyHx$. Lorsque la surface est relaxée à son aire initiale, la diminution de l'aire de l'élastomère par rétraction entraîne une augmentation de la densité surfacique de chaînes de perfluoroalcanes. L'angle de contact θ d'une goutte d'eau déposée en surface du substrat, a été mesuré en fonction de l'elongation Δx pour deux types de perfluoroalcanes F_6H_2 et F_8H_2 : dans les deux cas, θ varie de 100° pour $\Delta x=0$ (surface avec greffage réalisé sans étirement) à 130° pour un greffage réalisé sur un substrat soumis à une elongation $\Delta x \geq 95\%$. Cette méthode simple à l'avantage majeur de pouvoir augmenter l'angle de contact d'une surface hydrophobe semi-fluoré de plus de 30° , permettant la réalisation de surfaces super hydrophobes.

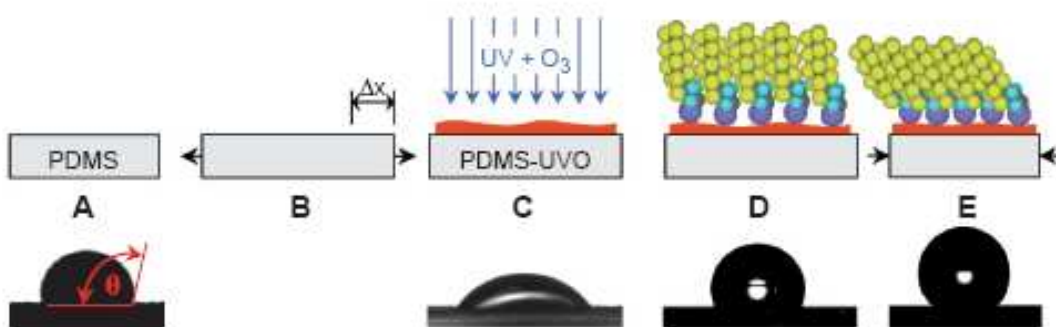


Figure 1.21. Illustration schématique des étapes permettant la formation de surfaces super hydrophobes. (A) Feuille de PDMS non étirée. (B) Etirement mécanique d'une feuille de PDMS d'une elongation de Δx . (C) L'exposition à un traitement UVO produit des surfaces de PDMS hydrophiles composées majoritairement de groupes hydroxyles. (D) Les molécules $FyHx$ sont déposées en phase vapeur sur ce substrat étiré et forment une monocouche auto-assemblée organisée. (E) La contrainte est relaxée et la surface retourne à son état initial ce qui a pour conséquence de former une monocouche de molécules assemblées très dense. Les images en dessous de chaque schéma correspondent à la morphologie des gouttes d'eau étalées sur chacune des surfaces. (Genzer and Efimenko 2000)

Surfaces à gradients moléculaires

Alors que la plupart des applications font intervenir des surfaces qui sont chimiquement homogènes, d'autres cas nécessitent l'utilisation de surfaces constituées de régions chimiquement hétérogènes. De telles surfaces sont notamment utiles pour des procédés de lithographie ou encore des dispositifs permettant de diriger des liquides (microfluidique). De multiples surfaces à gradients moléculaires ont été développées au cours de ces dernières années.

Une nouvelle stratégie pour générer des substrats avec des propriétés physicochimiques dépendant de la position (x,y) sur la surface consiste à utiliser la technique précédemment décrite de monocouches mécaniquement assemblées. Des gradients moléculaires à 2 dimensions ont été réalisés en combinant l'étirement inhomogène d'une feuille de silicone (PDMS) et le dépôt uniforme d'organosilanes lors de l'étirement (Genzer et al. 2003). Les feuilles de silicone ont été découpées sous des formes non conventionnelles et uni-longitudinalement étirées (**Figure 1.22.a et b**). La distribution des contraintes locales sous étirement a été cartographiée sur ces deux échantillons en utilisant un logiciel de simulation adéquat. Les résultats pour ces 2 échantillons sont montrés sur la **Figure 1.22.c**, les zones les plus étirées correspondant aux zones les plus sombres.

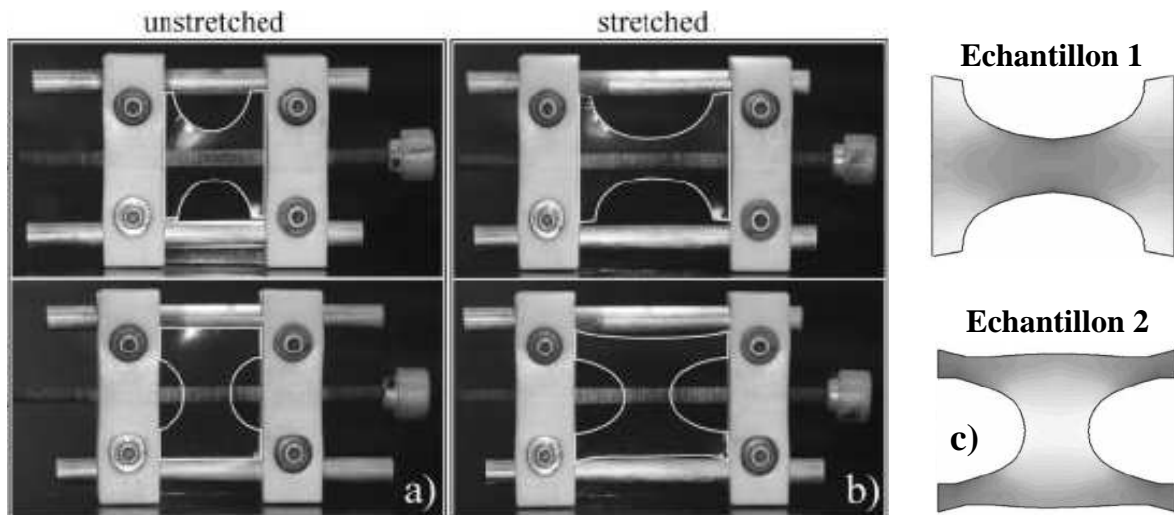


Figure 1.22. Photographies de feuilles de PDMS fixées dans un dispositif d'étirement avant étirement (a) et après une élongation uni-axiale de 40% (b). Deux géométries d'échantillons ont été utilisées. (c) Distributions des contraintes mécaniques locales calculées par simulation pour des feuilles de PDMS étirées avec des géométries correspondant aux échantillons 1 et 2. Les régions les plus sombres sur ces représentations correspondent aux zones de plus fortes tensions mécaniques (Genzer et al. 2003).

Des gradients moléculaires de perfluoroalcanes F8H2 ($F(CF_2)_y(CH_2)_xSiCl_3$) ont été créés en réalisant des monocouches mécaniquement assemblés comme indiqué précédemment. A l'état étiré, les échantillons de PDMS ont tout d'abord été traités aux UVO puis ils ont été recouverts d'une couche dense homogène de F8H2 sur la surface avant d'être relaxés. La spectroscopie d'absorption aux rayons X, (technique NEXAFS) a été utilisée pour mesurer la concentration surfacique en molécules de perfluoroalcanes F8H2 par la mesure des intensités des signaux relatifs aux excitations électroniques des liaisons Carbone-Fluor (C-F). Ces données ont été normalisées en utilisant une procédure standard. Dans la **Figure 1.23**, cette intensité normalisée I_{CF} est représentée en fonction de la position (x,y) sur la surface des deux échantillons. Les régions les plus sombres correspondent aux régions avec les plus fortes concentrations en liaisons C-F et le ratio entre les régions les plus et les moins concentrées est environ de 1.3 pour les deux échantillons. Plus spécifiquement, pour l'échantillon 1, la concentration en fluor est la plus grande au milieu de l'échantillon contrairement à l'échantillon 2 où elle est la plus grande sur les bords du substrat. La comparaison des **Figures 1.22.c et 1.23**, permet de conclure que les régions avec les plus fortes concentrations en molécules F8H2 (à l'état relaxé) correspondent aux régions soumises aux plus fortes contraintes locales sous étirement. Cette méthode a ainsi permis la construction de surfaces à gradients moléculaires.

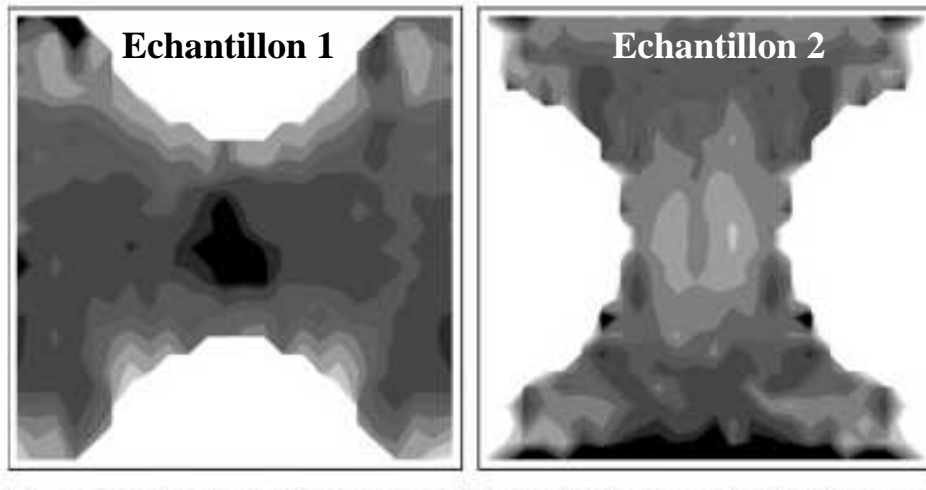


Figure 1.23. Cartographie de l'intensité des signaux relatifs aux liaisons C-F enregistrés pour les 2 échantillons après greffage des molécules F8H2 sur la surface étirée et relaxation de la surface. Les régions les plus sombres correspondent aux régions avec la plus grande intensité en signal relatif au fluor.

Libération contrôlée de molécules sous contrainte mécanique

Le corps humain étant intrinsèquement sujet à de nombreuses contraintes mécaniques au niveau des muscles (étirements longitudinaux), des articulations (déformations ou torsions), ou encore des artères (étirements longitudinaux et radiaux), la libération contrôlée de principes actifs par stimuli biomécaniques est un sujet permettant d'envisager de nombreuses applications bio-médicales.

Ainsi, la libération de protéines par un implant polymérique biodégradable a été étudiée sous l'action de contraintes mécaniques cycliques (Arm and Tencer 1997). Deux protéines modèles, l'albumine bovine (BA) et la "trypsine-inhibiteur" (TI) ont été enfouies dans des implants cylindriques à base de co-polyester d'acide lactique et glycolique (poly(lactic-co-glycolic) acid, PLGA). Ces matrices ont été soumises à des déformations cycliques de 720 cycles par jour pendant 2 semaines. Les auteurs ont montré que la déformation mécanique cyclique avait comme effet de créer des microfissures et des micropores sur toute la surface de l'implant. Les micropores se situent dans les zones soumises aux plus faibles contraintes mécaniques alors que les microfissures se situent dans les zones soumises aux plus fortes tensions. Ils ont également mis en évidence que la libération des protéines en solution était d'autant plus importante que l'amplitude de la déformation était forte. Ces auteurs ont ainsi montré la possibilité de libérer des substances thérapeutiques par des actions mécaniques de type déformation ou étirement.

CHAPITRE 2 : Matériels et Méthodes

2.1 Matériels, construction et étirement des échantillons

2.1.1 Solutions de polyélectrolytes, enzymes et molécules substrats

2.1.2 Construction des échantillons

2.1.3 Dispositif d'étirement

2.2 Méthodes de caractérisation et d'analyse

2.2.1 Microscopie confocale à balayage laser

2.2.2 Microscopie à force atomique

2.2.3 Microbalance à cristal de quartz

2.1 Matériels, construction et étirement des échantillons

2.1.1 Solutions de polyélectrolytes, enzymes et molécules substrats

Solutions de polyélectrolytes

Les polyélectrolytes utilisés pour construire les films multicouches sont dissous dans une solution aqueuse de chlorure de sodium (NaCl) préparée avec de l'eau ultra-pure (de résistivité 18.2 MΩ.cm, système Milli-Q-plus, Millipore) et tamponnée avec du tris-(hydroxyméthyl) aminométhane (tampon Tris 10 mM/NaCl 0.15 M). Les solutions de polyélectrolytes sont réalisées à une concentration de 1 mg.mL⁻¹ et le pH de ces solutions est ajusté à 7.4 avec des solutions concentrées de HCl et de NaOH. Les **tableaux 2.1 et 2.2** récapitulent les polycations et les polyanions utilisés.

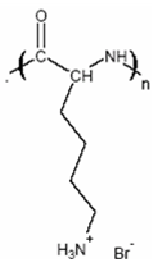
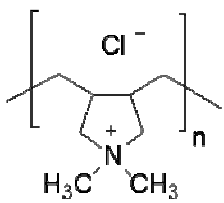
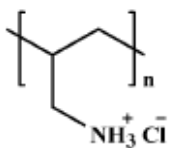
Nature du polyélectrolyte / Notation	Structure moléculaire	M _w (g/mol)	pKa	Fournisseur
Poly(L-lysine) PLL		55700	10.5	Sigma-Aldrich
Poly(diallyldiméthylammonium) PDADMA		200 000 – 350 000	/	Sigma-Aldrich
Poly(allylamine) PAH		70 000	9.0	Sigma-Aldrich

Tableau 2.1. Polycations utilisés

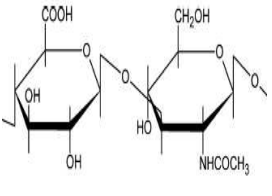
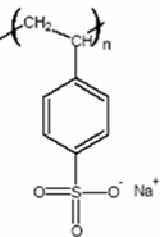
Nature du polyélectrolyte / Notation	Structure moléculaire	M _w (g/mol)	pKa	Fournisseur
Acide Hyaluronique HA		420 000	2.9	Bioiberica Lifecore Biomedical
Poly(sodium 4-styrene sulfonate) PSS		70 000	/	Sigma-Aldrich

Tableau 2.2. Polyanions utilisés

Polyélectrolytes fluorescents

Pour les expériences de microscopie confocale à balayage laser, des polyélectrolytes fluorescents ont été employés. Ces polymères d'origine commerciale ou préparés au laboratoire ont été marqués par couplage covalent avec des sondes fluorescentes, la fluorescéine isothiocyanate, verte fluorescente (FITC, longueur d'onde d'absorption $\lambda = 488$ nm/d'émission $\lambda = 520$ nm) ou encore la rhodamine succinimidyl ester, rouge fluorescente (Rho, longueur d'onde d'absorption $\lambda = 570$ nm /d'émission $\lambda = 595$ nm) (**Figure 2.1**).

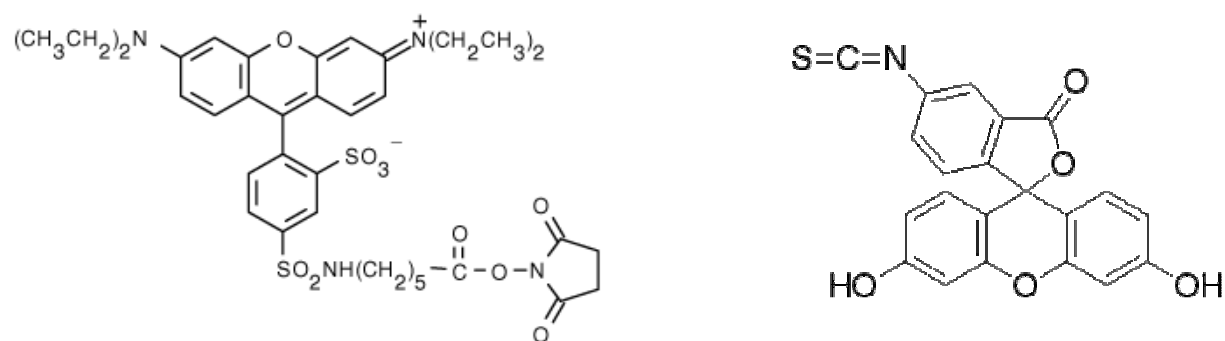


Figure 2.1. Structures moléculaires des sondes fluorescentes greffées de façon covalente sur les polyélectrolytes. A gauche, la rhodamine succinimidyl ester (excitation $\lambda = 570$ nm/émission $\lambda = 595$ nm). A droite, la fluorescéine isothiocyanate (excitation $\lambda = 488$ nm/émission $\lambda = 520$ nm).

Le couplage de ces sondes fluorescentes avec des polyélectrolytes comme la poly(L-lysine) (PLL) ou encore la poly(allylamine) (PAH) est obtenu par l'attaque nucléophile de ces polyamines sur le carbone électrophile du groupe isothiocyanate de la FITC ou du groupe ester de la rhodamine succinimidyl ester, il en résulte la formation d'une liaison covalente reliant la sonde fluorescente et le polyélectrolyte. Les caractéristiques de ces polyélectrolytes notés PLL^{FITC}, PLL^{Rho}, PAH^{FITC} et PAH^{Rho}, sont données dans le **tableau 2.3**. La poly(L-lysine) et la poly(allylamine) marquées à la fluorescéine isothiocyanate (PLL^{FITC}, PAH^{FITC}) ont été obtenues commercialement (fournisseur Sigma) alors que le marquage de ces polyélectrolytes avec la rhodamine succinimidyl ester a été réalisé au laboratoire. Pour cela, une quantité appropriée de PLL est dissoute dans une solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) (0.1 M, pH = 8.5) à 1 mg.mL⁻¹. Parallèlement, la rhodamine succinimidyl ester (Rhodamine RedTM-X, Molecular Probes) est dissoute dans du diméthylesulfoxyde (DMSO) à une concentration de 2 mg.mL⁻¹. Les deux solutions sont mélangées avec un rapport de 1 mg de rhodamine pour 50 mg de PLL (stoechiométrie Rho/PLL ~ 1/1) à température ambiante durant 2 heures sous agitation douce. Le polyélectrolyte marqué PLL^{Rho} est finalement purifié par dialyse (Cut off 12000-16000 g/mol, Membra-Cel TM, Viskase Companies, USA) contre de l'eau pendant plusieurs jours en changeant régulièrement l'eau du dialysat. L'absence de rhodamine libre dans le dialysat est vérifiée au moyen d'un spectromètre UV/visible (Hermanson 1996). Un protocole similaire pour la synthèse de PAH^{Rho} a été réalisé.

En ce qui concerne le poly(styrène sulfonate) marqué à la rhodamine (PSS^{Rho}), la stratégie de couplage est différente. Le PSS^{Rho} a été synthétisé suivant le protocole suivant : 2.5 mmol de monomères de 4-styrène sulfonate de sodium (SS, Sigma,) sont dissous dans 7.5 mL d'eau ultra-pure. Puis une solution de methacryloxyéthyl-thiocarbamoyl-rhodamine B (MRho, Polysciences, Allemagne) à 0.0125 mmol dans 2 mL de méthanol, est ajoutée à la solution précédente de SS, obtenant un rapport molaire MRho/SS de 0.5 %. Ce mélange est maintenu sous agitation pendant une heure sous atmosphère d'azote. Puis 250 µL d'une solution aqueuse de tetra-méthylethylènediamine (TMEDA, Sigma) à 0.1 M et 250 µL d'une solution aqueuse de peroxy-disulfate d'ammonium ((NH₄)₂S₂O₈, Sigma) à 0.05 M sont ajoutés au milieu réactionnel sous atmosphère d'azote afin d'initialiser la réaction de polymérisation. La solution, maintenue sous atmosphère d'azote, est chauffée à 40 °C pendant 4 heures puis refroidie à température ambiante pendant 12 heures sous agitation. La solution finale est dialysée pendant une semaine contre de l'eau et finalement lyophilisée pour donner un solide rouge fluorescent de PSS^{Rho} (Dahne et al. 2001).

Polyélectrolytes fluorescents Notation	Fournisseur ou méthode de couplage	M_w (g/mol)	pKa
Poly(allylamine) marquée à la fluorescéine isothiocyanate PAH ^{FITC}	Sigma-Aldrich Taux de substitution : 1-2 % FITC par allylamine.	70 000	9.0
Poly(L-lysine) marquée à la fluorescéine isothiocyanate PLL ^{FITC}	Sigma-Aldrich Taux de substitution : de 0.3 à 1 % FITC par lysine.	70 000	10.5
Poly(allylamine) et Poly(L-lysine) marquées à la Rhodamine PAH ^{Rho} et PLL ^{Rho}	Réaction de couplage avec la rhodamine succinimidyl ester Red TM -X (Molecular Probes) Purification par dialyse Caractérisation par spectroscopie UV/Vis et Fluorimétrie	70 000	9.0 (PAH ^{Rho}) 10.5 (PLL ^{Rho})
Poly(styrene-sulfonate) marqué à la Rhodamine PSS ^{Rho}	Réaction de polymérisation Purification par dialyse Caractérisation par spectroscopie UV/Vis	Non renseigné	/

Tableau 2.3. Polyélectrolytes fluorescents utilisés

Solutions d'enzymes

Pour la construction des films multicouches enzymatiques, la phosphatase alcaline (notée AP, alkaline phosphatase, Sigma-Aldrich, P-4002) a été utilisée. Elle a été dissoute à une concentration de 1 mg.mL⁻¹ selon les mêmes conditions indiquées précédemment (tampon Tris 10 mM/NaCl 0.15 M, pH = 7.4).

Enzymes marquées par un fluorophore

Pour la visualisation de la phosphatase alcaline en microscopie confocale à balayage laser, les sondes fluorescentes FITC et Rho ont été greffées sur cette enzyme. De la phosphatase alcaline marquée à la rhodamine (notée AP^{Rho}), a été obtenue en couplant l'enzyme (AP) dissoute à 10 mg.mL⁻¹ dans une solution de Na₂CO₃ (0.1 M, pH = 8.5) avec la rhodamine succinimidyl ester (Rhodamine RedTM-X, Molecular Probes) dissoute dans du DMSO (diméthylesulfoxyde) à 10 mg.mL⁻¹. Nous avons utilisé un ratio de 1 mg de rhodamine pour 10 mg d'enzyme (stoechiométrie Rho/AP ~ 10/1). Ces deux solutions ont été mélangées sous agitation magnétique à température ambiante pendant 1 heure. AP^{Rho} a été purifiée par dialyse pendant plusieurs jours et l'absence de rhodamine libre dans la solution a été vérifiée par spectroscopie UV/visible. Un protocole similaire pour AP^{FITC} a été utilisé en couplant la phosphatase alcaline avec la fluorescéine-isothiocyanate (FITC Isomer I, Invitrogen) et l'absence de FITC libre dans la solution a été vérifiée par spectroscopie UV/visible puis par fluorimétrie.

Molécules substrats enzymatiques

Para-nitrophénylphosphate (PNP)

L'activité enzymatique de la phosphatase alcaline a été suivie par incubation des films multicouches enzymatiques dans une solution de *p*-nitrophényl phosphate (PNP) (**Figure 2.2**) à 5 mg.mL⁻¹ dans le tampon Tris 10 mM/NaCl 0.15 M (pH = 8.5). En effet, sous l'action de cette enzyme, le *p*-nitrophényl phosphate (PNP) s'hydrolyse en *p*-nitrophénol (PN) et en un ion phosphate. Le PN produit par la réaction enzymatique est alors détecté en solution en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde de 405 nm (maximum d'absorption) à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible.

Fluorescéine di-phosphate (FDP)

L'activité de la phosphatase alcaline a également été mesurée par incubation des films multicouches enzymatiques dans une solution de fluorescéine di-phosphate (FDP, Invitrogen, F-2999) à 100 µg.mL⁻¹ dans le tampon Tris 10 mM/NaCl 0.15 M (pH = 7.4). La fluorescéine di-phosphate (FDP) (**Figure 2.2**) est un substrat incolore et non fluorescent de la phosphatase alcaline qui permet, après transformation enzymatique en fluorescéine, une plus grande résolution de détection que le PNP. L'hydrolyse enzymatique séquentielle des deux substituants phosphates de la FDP fournit d'abord de la fluorescéine mono-phosphate faiblement fluorescente suivie de la fluorescéine fortement fluorescente (excitation/émission

490/515 nm). Notons que les solutions de FDP utilisées présentent un faible bruit de fond de fluorescence dû principalement à la fluorescéine mono-phosphate ou bien à la fluorescéine initialement présente en faible quantité dans le produit commercial. Au cours de la réaction enzymatique dans les films multicouches, la variation de fluorescence est alors visualisée par microscopie confocale et la mesure relative de l'intensité de fluorescence est possible en utilisant le microscope confocal en tant que fluorimètre. Ainsi, le microscope confocal a permis la détection de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline.

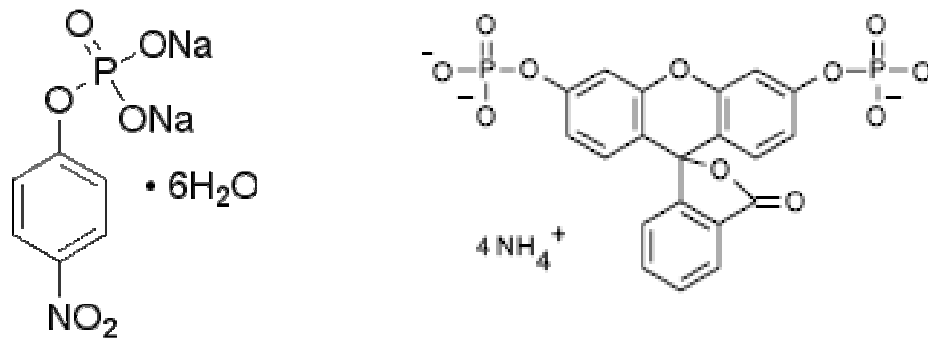


Figure 2.2. Structures moléculaires des deux substrats enzymatiques (utilisés) de la phosphatase alcaline. A gauche : le *p*-nitrophényl phosphate (PNP), à droite : la fluorescéine di-phosphate (FDP).

2.1.2 Construction des échantillons

Nature des substrats de dépôt utilisés

Pour des études préalables sans étirement mécanique, des lamelles de verre (à base de silice) chargées négativement en surface (diamètre 12 mm, VWR) ont été utilisées comme substrats des films multicouches de polyélectrolytes. Elles présentent une faible rugosité et leur transparence permet les observations optiques ce qui en fait de très bons supports d'étude. Les résultats obtenus sur le verre sont facilement transposables à d'autres surfaces car les films multicouches de polyélectrolytes, après le dépôt de quelques couches, possèdent des caractéristiques de construction indépendantes du substrat (Ladam et al. 2000). Les lamelles de verre sont préalablement nettoyées à l'aide d'une solution de SDS 0.01 M (10 min, au bain-marie), rincées à l'eau puis trempées dans une solution de HCl 0.1 M (10 min, au bain-marie). Enfin, elles sont rincées abondamment à l'eau et séchées sous flux d'azote.

En ce qui concerne les expériences d'étirement mécanique, des feuilles de silicone, non chargées en surface, d'épaisseur 254 μm (Fournisseur, Specialty Manufacturing Inc. SMI, Saginaw, Michigan, USA) ont été utilisées comme substrats élastomériques. Ces feuilles de silicone, découpées en surface carrées de 18 \times 18 mm² sont plaquées sur des lamelles de verre

carrées de même surface, de façon à pouvoir les manipuler aisément et les maintenir sur un portoir lors de la construction des échantillons. Elles sont nettoyées préalablement avec de l'éthanol (quelques minutes) puis rincées abondamment avec de l'eau.

Construction des assemblages multicouches

Pour la réalisation de films contenant un nombre élevé de couches, l'opération de dépôt sur les substrats précédents est programmée à l'aide d'un bras automatisé (Dipping Robot, Riegler et Kirstein, GmbH, Berlin, Allemagne) (**Figure 2.3**). Les substrats maintenus sur ce bras robot sont séquentiellement plongés dans les solutions de polyelectrolytes et de rinçage. Ils sont tout d'abord immergés dans la solution de polycations (10 min.) puis sont rincés (10 min.) avec une solution de rinçage identique à la solution de dissolution des polyelectrolytes. Ils sont ensuite plongés dans la solution de polyanions et rincés en suivant le même protocole que pour le dépôt des polycations. Ces opérations d'immersions successives sont répétées jusqu'à l'obtention du nombre de couches souhaité. En ce qui concerne les films fonctionnalisés avec l'enzyme, la phosphatase alcaline (marquée fluorescente ou non) a été adsorbée dans le film pendant 30 minutes à une certaine étape de la construction puis une étape de rinçage a été réalisée pendant 10 min.

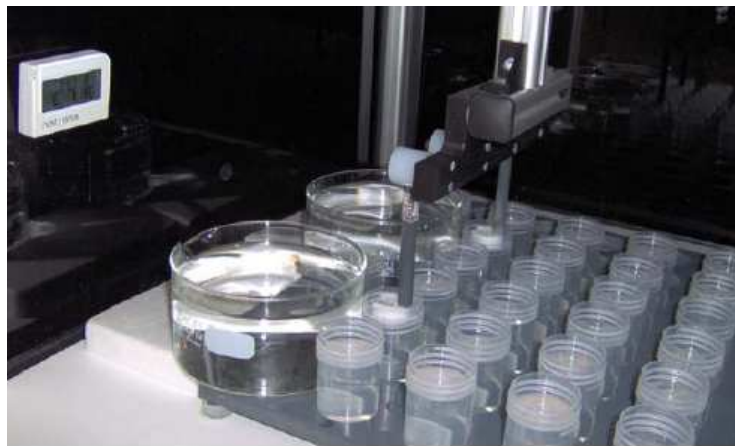


Figure 2.3. Construction des films multicouches à l'aide du bras automatisé (Dipping Robot, Riegler et Kirstein, GmbH, Berlin, Allemagne)

2.1.3 Dispositif d'étirement

Un dispositif d'étirement réalisé au laboratoire, permet d'étirer de façon longitudinale les films multicouches solidaires de leur substrat élastomérique en silicone, directement sous le microscope confocal (**Figure 2.4**). Le degré d'étirement (%) est défini par le paramètre $\alpha = (l - l_0)/l_0$ où l_0 et l correspondent respectivement aux longueurs initiale et étirée de la

feuille de silicone. Le mouvement d'étirement est réalisé par un moteur électrique de précision à une vitesse de 0.74 mm.s^{-1} . Toutes les expériences d'étirement ont été réalisées à température ambiante dans des conditions liquides.

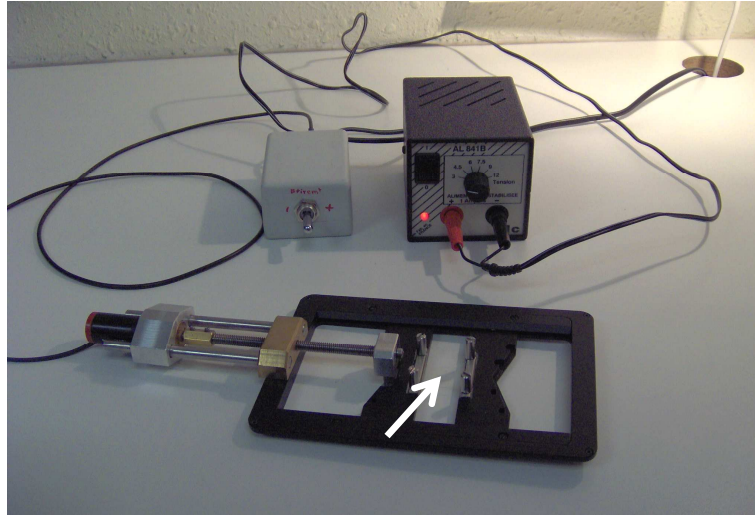


Figure 2.4. Dispositif d'étirement adapté sur un cadre-plate de microscopie (confocale ou à épifluorescence). L'échantillon (film multicouche solidaire du silicone indiqué par la flèche blanche) est fixé sur le dispositif et son étirement est réalisé à l'aide d'un moteur électrique alimenté en courant continu.

Pour déterminer les contraintes locales d'étirement appliquées lors d'un étirement macroscopique donné, des expériences de photoblanchiment ont été réalisées sur une feuille de silicone recouverte de PLL^{FITC}. Ces expériences ont consisté à photoblanchir deux zones rectangulaires de dimensions $15 \times 120 \mu\text{m}^2$ par application d'un faisceau laser de forte puissance à $\lambda = 490 \text{ nm}$ permettant l'extinction de la fluorescence verte à l'intérieur de ces zones (**Figure 2.5.a**).

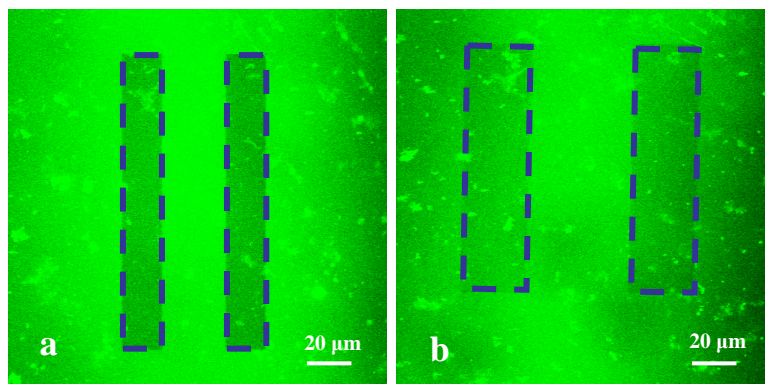


Figure 2.5. Expériences de photoblanchiment réalisées sur une feuille de silicone recouverte de PLL^{FITC} permettant la mesure des contraintes locales d'étirement. A gauche (a), silicone non étiré, à droite (b) étirement macroscopique de 100%.

Un étirement régulier a été appliqué et les déformations et écartements de ces deux rectangles ont été mesurées. Pour un étirement macroscopique de 100% (**Figure 2.5.b**), nous avons mesuré un effet d'allongement de 80% suivant la direction de l'étirement et un effet de compression d'un facteur de 15% suivant la direction perpendiculaire. Pour la suite de nos expériences, nous parlerons toujours de l'étirement macroscopique tout en ayant à l'esprit les étirements locaux.

2.2 Méthodes de caractérisation et d'analyse

2.2.1 Microscopie confocale à balayage laser

Phénomène de Fluorescence

La fluorescence est la propriété d'une molécule à absorber un photon, puis à le réémettre à une longueur d'onde plus élevée (Diagramme de Jablonski, **Figure 2.6**). Soumise à une excitation lumineuse de longueur d'onde donnée, la molécule fluorescente est portée dans un état vibronique excité (S_1'). A température ambiante, la conversion interne entraîne une perte partielle de l'énergie absorbée par relaxation vibrationnelle et la molécule se retrouve à un état excité moins élevé en énergie (S_1). Le retour de la molécule à son état électronique fondamental (S_0) est associé à une libération d'énergie lumineuse plus faible que l'énergie associée à l'excitation lumineuse ce qui se traduit par une longueur d'onde d'émission supérieure à la longueur d'onde d'absorption (Déplacement de Stokes).

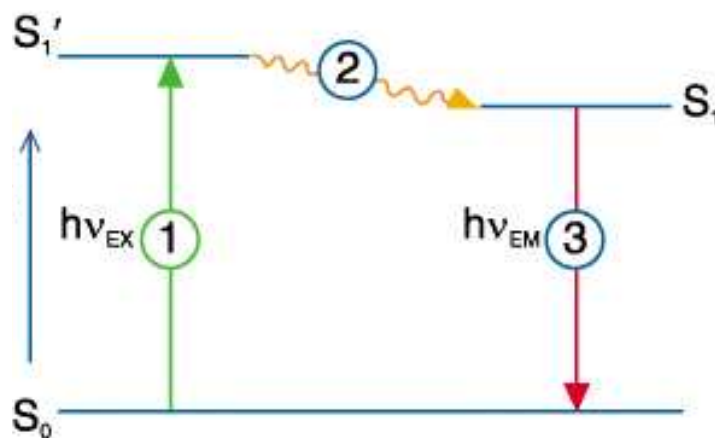


Figure 2.6. Diagramme de Jablonski. La molécule fluorescente initialement à l'état fondamental S_0 absorbe de l'énergie lumineuse (1) et se retrouve à l'état excité S_1' . Lors de la désexcitation, la molécule perd d'abord de l'énergie par conversion interne (2) (vibrations, chocs moléculaires) et se retrouve à l'état excité d'énergie inférieure S_1 puis subit une transition électronique de l'état S_1 à son état stable S_0 (3). Cette transition libère de l'énergie sous forme lumineuse à une longueur d'onde plus élevée que la longueur d'onde d'excitation (car l'énergie d'émission est plus faible que celle d'excitation).

Sondes fluorescentes

Les sondes fluorescentes sont des molécules relativement petites pouvant être couplées de façon covalente à différents polyélectrolytes ou macromolécules biologiques. En raison de leur large rendement quantique de fluorescence, les sondes fluorescentes peuvent fournir une très grande sensibilité de détection et permettent l'imagerie d'espèces moléculaires présentes dans les films multicouches de polyélectrolytes par des techniques de microscopie de fluorescence telle que la microscopie confocale à balayage laser.

Principe de la microscopie confocale à balayage laser

Le principe général de la microscopie confocale a été proposé par Minsky (1957). Il s'agit de diriger un faisceau laser sur un point précis (point focal) de l'échantillon à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence. Cependant, le trajet du faisceau laser dans l'échantillon génère de la fluorescence en dehors du plan focal. Pour éliminer cette fluorescence parasite, un trou de filtrage appelé pinhole (« trou d'aiguille ») est placé en amont du détecteur et ne laisse passer que la lumière en provenance du point focal (**Figure 2.7**). L'image ainsi obtenue présente un bon rapport signal/bruit.

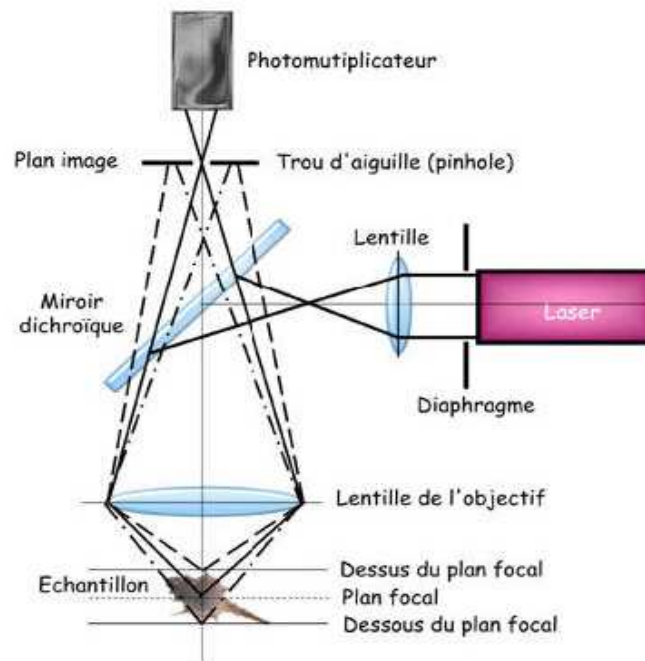


Figure 2.7. Schéma de principe d'un microscope confocale à balayage laser. La source laser est condensée par l'intermédiaire d'une première lentille, d'un miroir dichroïque et de l'objectif en un point focal. La fluorescence émise par l'échantillon est ensuite recueillie par un photomultiplicateur. Pour éliminer la fluorescence parasite (ligne en pointillé), le trou de filtrage (pinhole) est disposé au niveau du plan image de l'objectif.

Le balayage de l'échantillon par le laser, en tout point (x,y) de la surface fournit une image du plan focal. Ce balayage dans le plan horizontal est obtenu à l'aide de miroirs motorisés disposés sur le trajet optique du laser. Pour le balayage vertical (en z), l'objectif est monté sur un moteur piézo-électrique. Il est ainsi possible d'obtenir des images en provenance de différents plans focaux de l'échantillon et ainsi de reconstituer une structure en trois dimensions avec une résolution latérale et normale respectivement de 0.15 μm et 0.5 μm pour un objectif ayant une ouverture numérique de 1.4 et l'utilisation d'une longueur d'onde de 500 nm. Cette caractéristique est particulièrement intéressante pour étudier la structure normale des films multicouches épais (micrométriques) en milieu aqueux. La configuration la plus courante est le mode réflexion que nous avons utilisé pour l'observation des films multicouches. Dans ce mode, la même lentille sert à focaliser la source et à faire l'image sur le détecteur.

Reconstitution d'images

Le faisceau laser se déplace par lignes pour imager un plan (x,y). La platine porte-objet, support de l'échantillon (lame de verre ou feuille de silicone fixée dans le dispositif d'étirement), est également déplacée en z d'un pas fini constant (Δz). Une image numérique des plans (x,y) du film est prise successivement pour chaque pas Δz et l'utilisation du pinhole (« trou d'aiguille ») permet d'imager un plan donné en éliminant les contributions des zones situées en-dessus et en-dessous de ce plan. L'image tridimensionnelle peut alors être reconstituée et l'objet peut être visualisé par tranches, sous différentes vues à l'aide du logiciel Zeiss LSM Image Browser (**Figure 2.8**).

Les lasers les plus couramment utilisés sont :

- Laser Argon contenant trois raies : 459 nm, 488 nm (bleu) et 514 nm (bleu-vert),
- Laser Hélium Néon I : 543 nm (vert),
- Laser Hélium Néon II: 633 nm (rouge).

Procédure

Au cours des expériences de microscopie confocale, nous avons utilisé les raies d'excitation à 488 nm fournie par le laser Argon et celle à 543 nm fournie par le laser Hélium Néon I. Le microscope confocale utilisé (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS, Strasbourg) est de type LSM 510 (Zeiss), monté sur un microscope AxioVert 100M (Zeiss) associé aux lasers Hélium/Néon et Argon. Pour visualiser les films multicouches de polyélectrolytes, les polyélectrolytes sont couplés avec des sondes fluorescentes,

généralement la fluorescéine isothiocyanate (FITC excitation 488 nm/émission 520 nm) ou bien la rhodamine (Rho excitation 570 nm/émission 595 nm).

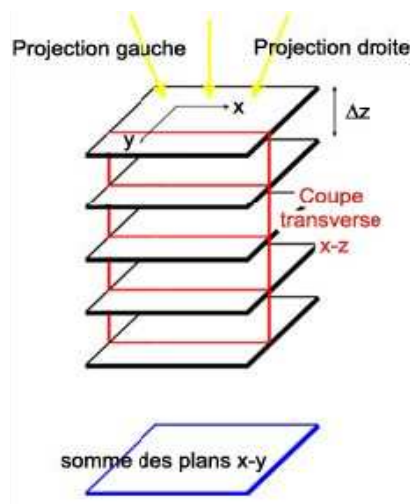


Figure 2.8. Principe de reconstitution d'images en 3D. Une image numérique (x,y) est réalisée à différentes hauteurs en z avec un pas de déplacement constant Δz et l'image en 3 D est reconstituée par la somme de ces plans. On peut alors accéder aux coupes transversales suivant les plans verticaux (xz) et (yz). La résolution verticale du microscope confocale dépend de la longueur d'onde utilisée et se situe aux alentours de 500 nm.

Sur les films multicouches dont l'un au moins des polyélectrolytes diffuse à travers l'ensemble de la construction, le dépôt d'un polyélectrolyte marqué permet de visualiser l'intégralité du film (**Figure 2.9**). Ainsi, pour obtenir un marquage complet du film, le polyélectrolyte est déposé en couche terminale pendant une dizaine de minutes. Le microscope confocal utilisé disposant de plusieurs lasers, il est possible de co-marquer les films multicouches à l'aide de deux sondes fluorescentes différentes.

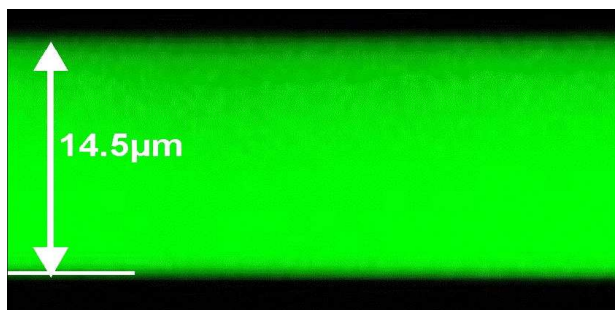


Figure 2.9. Coupe verticale (en z) d'un film multicouche $(PLL/HA)_{60}/PLL^{FITC}$ construit sur une lamelle de verre et observé par microscopie confocale avec un objectif X 40. La bande verte correspond à la diffusion de la PLL^{FITC} à travers tout le film et permet de mesurer l'épaisseur du film, ici environ 14.5 μm .

2.2.2 Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM, Atomic Force Microscopy) est une microscopie à champ proche développée dans les années 1980 avec la microscopie à effet tunnel (Binnig et al., 1982). L'AFM est une variante de la microscopie à effet tunnel destinée à l'observation de la topographie des surfaces non-conductrices (Binnig et al., 1986). Le principe consiste à balayer la surface de l'échantillon avec une pointe très fine (jouant le rôle de sonde) et à détecter les interactions entre cette pointe et la surface. L'AFM est ainsi utilisée pour imager les surfaces biologiques avec une résolution latérale (dans le plan (x,y)) de l'ordre de la dizaine de nanomètres et une résolution normale (en z) de l'ordre de l'Angström. Les évolutions des techniques AFM ont permis notamment la cartographie de différentes propriétés mécaniques (Burnham et al., 1990), électrostatiques et magnétiques (Martin et al., 1988).

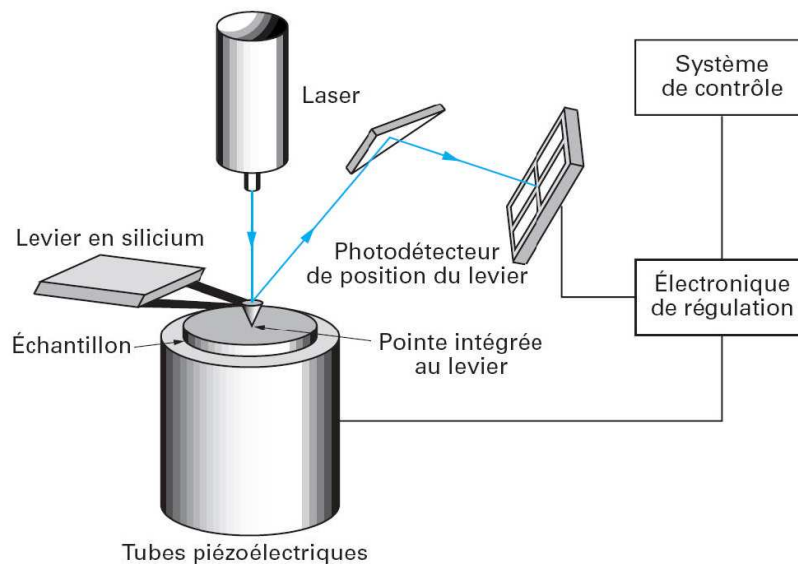


Figure 2.10. Schéma d'un microscope à force atomique. L'échantillon est fixé sur le tube piézo-électrique. La pointe du cantilever (ou levier) est approchée de la surface. Les interactions entre la pointe et la surface génèrent une déflexion du cantilever qui est mesurée optiquement. Un faisceau laser est réfléchi par l'extrémité de la pointe sur une photodiode. La tension mesurée par la photodiode indique la déflexion du cantilever.

La technique consiste à balayer la surface de l'échantillon avec une sonde qui correspond généralement à une fine pointe de nitrure de silicium (Si_3N_4) montée à l'extrémité d'un levier de constante de raideur connue (**Figure 2.10**), l'ensemble formant le micro-levier ou *cantilever*. L'échantillon est fixé sur un tube piézo-électrique 3D ce qui permet un mouvement dans les 3 directions de l'espace. Lors du balayage, les interactions intermoléculaires de Van der Waals de la sonde avec la surface génèrent la déflexion du

cantilever. Pour mesurer la déflexion, un faisceau laser est focalisé sur l'extrémité du cantilever (zone réfléchissante) et est réfléchi sur une photodiode à quatre cadrans (**Figure 2.10**). La différence de potentiels entre les différents quadrants indique avec précision la déflexion du cantilever. Cette méthode de mesure de la déflexion présente l'avantage de ne détecter que les variations angulaires du cantilever. En revanche, ce type de mesure est sensible à la dérive thermique et nécessite un temps d'attente avant l'obtention d'un signal stable. La déflexion est reliée à la force (F) exercée sur la pointe par la loi de Hooke :

$$F = -k_c \Delta d \quad (2.2.2 - 1)$$

avec k_c la constante de raideur du cantilever et Δd la déflexion du cantilever.

Imagerie AFM

L'image en AFM est obtenue par la mesure de la déflexion du cantilever en chaque point (x,y) de la surface ce qui permet d'avoir accès à la topographie de l'échantillon. Différents modes ont été développés afin de cartographier et de quantifier les propriétés physicochimiques de la surface : modes contact, non-contact et tapping (oscillant). Dans ce qui suit, nous nous intéresserons à l'imagerie en mode contact et en mode tapping.

Mode contact

Dans ce mode, la pointe est maintenue en contact avec la surface de l'échantillon, généralement avec une force constante de l'ordre de 10 nN. Une boucle de rétroaction ajuste en permanence la position en z de l'échantillon à l'aide du déplacement de la céramique piézo-électrique (**Figure 2.10**). Le déplacement vertical (en z) du tube piézo-électrique en fonction de la position (x,y) donne alors l'image topographique de la surface.

Mode tapping

Dans ce mode, le cantilever oscille à sa fréquence de résonance avec une certaine amplitude et la pointe interagit périodiquement avec la surface. Il est particulièrement bien adapté pour imager des échantillons mous car il réduit le risque de dégradation de la surface. L'étude de la variation d'amplitude et du déphasage entre le signal fréquentiel appliqué et celui détecté à la photodiode permet de remonter à la topographie des échantillons ainsi qu'à l'obtention des images de phase.

Procédure

La réalisation des images topographiques est effectuée sur un appareillage Nanoscope IIIa (Veeco, Santa Barbara, CA) avec des pointes pyramidales montées sur des cantilevers de

constante de raideurs variables (**Figure 2.11**). Les observations des films ont été réalisées en mode contact à une fréquence de balayage d'environ 2 Hz en utilisant des cantilevers de raideurs 0.03 N.m^{-1} (Modèle MSCT-AUHW, Veeco) et en mode tapping en utilisant des cantilevers de raideurs 0.05 N.m^{-1} , de fréquence de résonance 150 kHz (Modèle MPP 12100, Veeco, Santa Barbara, CA).



Figure 2.11. Schéma d'un support de cantilevers à pointes pyramidales de constantes de raideur différentes (Modèle MSCT-AUHW, Veeco). Généralement, seuls les cantilevers C et D sont utilisés pour l'imagerie.

2.2.3 Microbalance à cristal de quartz

Principe général

La technique de microbalance à cristal de quartz (QCM) est utilisée depuis de nombreuses années pour contrôler les dépôts de couches métalliques sur des supports solides. Son principe repose sur les propriétés piézo-électriques du cristal de quartz. En effet le quartz est un matériau qui se déforme sous l'application d'une différence de potentiels électriques et réciproquement une contrainte mécanique entraîne l'apparition d'une polarisation à ses bords. Le cristal se présente sous la forme d'un disque de quartz de 0.3 mm d'épaisseur environ, entouré de deux électrodes en or, l'une d'entre elles étant recouverte de silice (**Figure 2.12**).

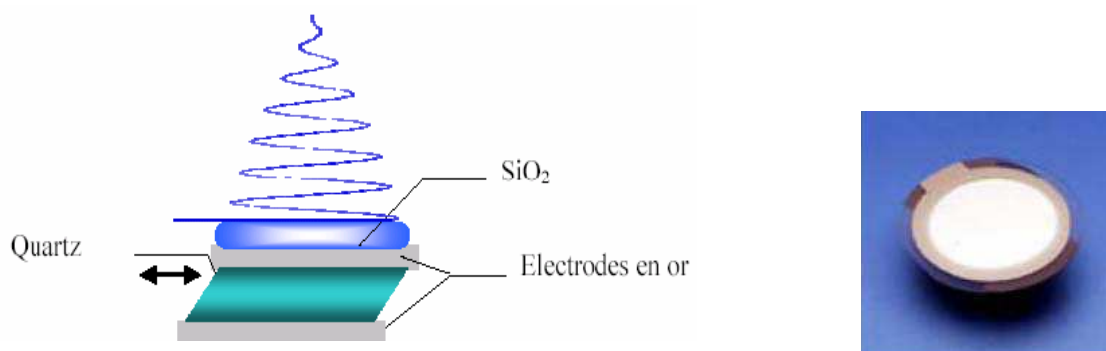


Figure 2.12. (a) Schéma de principe d'un cristal de quartz entouré par deux électrodes en or et recouvert d'une couche superficielle de SiO_2 . La différence de potentiels appliquée entre les électrodes induit une contrainte de cisaillement sur le cristal perpendiculairement au champ électrique appliqué. (b) Photo du cristal de quartz. Le film est déposé sur une des deux faces en or constituant les deux électrodes.

En appliquant une différence de potentiel entre les deux faces, un mouvement de cisaillement pur est induit. Si la face inférieure de la lame est fixée sur un support immobile, la face supérieure subira un mouvement de translation horizontal se traduisant par des oscillations mécaniques. En première approximation, l'ensemble du système est équivalent à un oscillateur harmonique. La différence de potentiel appliquée entre les électrodes est équivalente à une force mécanique extérieure qui s'applique sur l'oscillateur. Cet oscillateur harmonique est caractérisé par sa fréquence de résonance f_r :

$$f_r = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{M}} \quad (2.2.3 - 1)$$

où M représente la masse de l'oscillateur (le cristal de quartz) et k sa constante de raideur. En déposant une masse m d'un matériau ($m \ll M$) sur la lame de quartz, la masse totale de l'oscillateur est alors égale à $M+m$ et la nouvelle fréquence de résonance f devient :

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{M+m}} \approx f_r \left(1 - \frac{m}{2M}\right) \quad (2.2.3 - 2)$$

Ainsi, le dépôt d'une masse m d'un matériau sur la lame de quartz conduit à une différence de fréquence de résonance donnée par la relation :

$$\Delta f = f - f_r = \frac{-mf_r}{2M} = -\frac{m}{C} \quad (2.2.3 - 3)$$

où C est une constante caractéristique de la lame de quartz appelée constante de Sauerbrey :

$$C = \frac{2M}{f_r} \quad (2.2.3 - 4)$$

Le principe de la microbalance à cristal de quartz consiste à mesurer cette variation de fréquence de résonance Δf après le dépôt d'un matériau de masse m et permet donc d'avoir accès à la masse déposée par unité de surface avec une précision proche du ng.cm^{-2} . De plus, une telle lame de quartz peut non seulement être mise en résonance à sa fréquence fondamentale (notée f), mais également à toutes ses harmoniques impaires ($f_v = \nu f$ où ν est un entier impair positif). A chaque harmonique correspondra aussi un changement de fréquence de résonance consécutif au dépôt de matière et m sera relié à Δf_v par la relation de Sauerbrey :

$$m = -C \frac{\Delta f_v}{\nu} \quad (2.2.3 - 5)$$

Cette relation s'applique de façon approchée, à un dépôt de matériau en milieu liquide (Rodahl and Kasemo 1996), mais toujours pour des films fins, rigides et uniformes. Or, les films multicouches étudiés tels que PLL/HA sont très hydratés et possèdent généralement un comportement semblable à celui d'un gel ou d'un liquide visqueux lorsqu'ils deviennent épais. La relation de Sauerbrey n'est alors plus applicable et un autre modèle qui tient compte des propriétés viscoélastiques des films multicouches est utilisé. Les récentes évolutions techniques ont permis l'acquisition d'un nouveau paramètre expérimental : le facteur de dissipation visqueuse noté D (d'où le nom de l'appareil : QCM-D) qui est lié aux propriétés viscoélastiques du film déposé. Une analyse de l'évolution des fréquences et de la dissipation a été réalisée à partir du modèle proposé par Voinova *et al.* (Voinova et al. 1999). Ce modèle a été étendu par le Dr B. Senger (Inserm Unité 595) aux données issues des mesures réalisées avec l'appareillage de QCM-D (Q-Sense). Le programme détermine ainsi l'évolution de l'épaisseur sur plusieurs centaines de nanomètres ainsi que la viscosité et le module élastique pour des films multicouches de polyélectrolytes (Zhang et al. 2004).

Fonctionnement de la QCM-D

L'appareil que nous avons utilisé est de marque Q-Sense (Q-Sense AB, Göteborg, Suède) de type QCM-D301. Il comporte une chambre de mesure thermostatée par un système Pelletier et une unité électronique interfacée à un ordinateur (**Figure 2.13**).



Figure 2.13. Photographie de l'appareillage de QCM-D comprenant une chambre de mesure thermostatée et une unité électronique interfacée à un ordinateur.

Cet appareil fonctionne sur le principe suivant : un générateur de fréquence excite le cristal de quartz avec une tension sinusoïdale de fréquence f_1 . Cette fréquence prend successivement la valeur de la fréquence fondamentale de résonance de la lame (5 MHz) et de

ses harmoniques (15, 25 et 35 MHz). L'excitation du cristal est imposée sur une durée très brève (quelques μs). Après l'arrêt de l'excitation, pour chaque résonance ($\nu=1, 3, 5, 7$), le cristal oscille librement à une fréquence de résonance proche de la fréquence d'excitation du cristal. Ces oscillations mécaniques génèrent des oscillations électriques aux bords du cristal, qui sont enregistrées et traitées informatiquement. Ces oscillations sont amorties, comme cela est représenté sur la **Figure 2.14**. La constante d'amortissement est inversement proportionnelle au temps de relaxation du cristal après son excitation et elle est liée au facteur de dissipation visqueuse D du système. En effet, l'amortissement du signal est dû à l'énergie dissipée dans la lame, mais surtout dans le film et dans le fluide au contact de la lame. En QCM-D, les grandeurs que l'on mesure sont la fréquence de résonance et le facteur de dissipation visqueuse D (déterminé via la constante d'amortissement) pour les 4 fréquences d'excitation (5, 15, 25 et 35 MHz). Cette dissipation renseigne en principe sur les propriétés viscoélastiques des films.

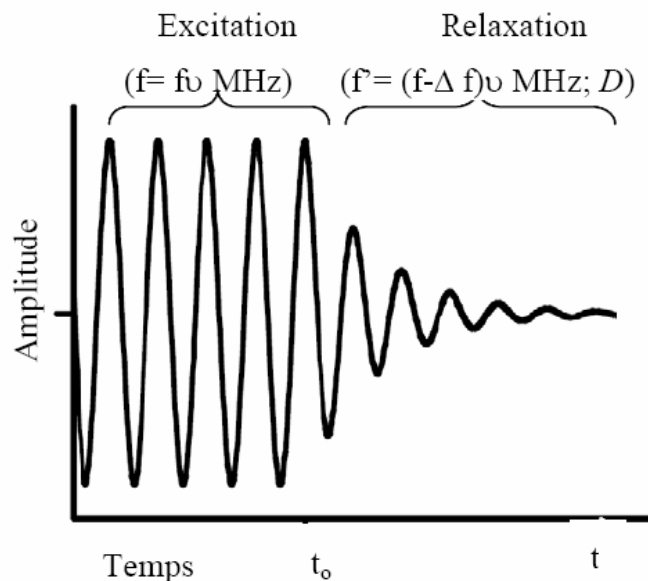


Figure 2.14. Amplitude des oscillations du cristal en fonction du temps lors d'une expérience en QCM-D. Première phase (jusqu'à t_0) : excitation du cristal à sa fréquence de résonance. Seconde phase ($t > t_0$) : étude de la relaxation du cristal avec obtention de la nouvelle fréquence de résonance ($f' = f - \Delta f$) et du facteur de dissipation visqueuse (D) relié à la constante d'amortissement.

Protocole expérimental

Les cristaux utilisés sont du type QSX 303 (Q-Sense) : ils sont recouverts d'un film de SiO_2 de 100 nm d'épaisseur et ils possèdent une fréquence fondamentale de résonance à 5 MHz et des harmoniques à 15, 25 et 35 MHz. Avant chaque expérience, le cristal est nettoyé *in situ*, avec une solution de Hellmanex à 2% pendant une demi-heure à température

ambiante. Il est ensuite rincé avec une solution de HCl 0.1M puis lavé à l'eau et séché à l'azote. La construction d'un film multicouche de polyelectrolytes se fait dans la chambre de mesure de l'appareil QCM-D (**Figure 2.15**) où se trouve le cristal de quartz. Tout d'abord, on injecte 1.5 mL de la solution de polycations (le support ayant une charge négative) dans un circuit thermostaté appelé T-Loop. Ce système de boucle (Loop) permet de réguler très précisément la température des solutions (fixée à 25°C) avant leur injection dans la cellule de mesure, afin d'éviter les instabilités thermiques de mesure. Après 2 minutes, 0.5 mL de cette solution sont mis en contact avec le cristal dans la cellule de mesure et laissés 8 minutes au repos. L'opération est répétée avec la solution de rinçage (0.15 M de NaCl ou H₂O) puis la solution de polyanions est injectée de façon similaire. Les étapes d'injection et de rinçage sont poursuivies jusqu'à obtenir le nombre de couches voulu.

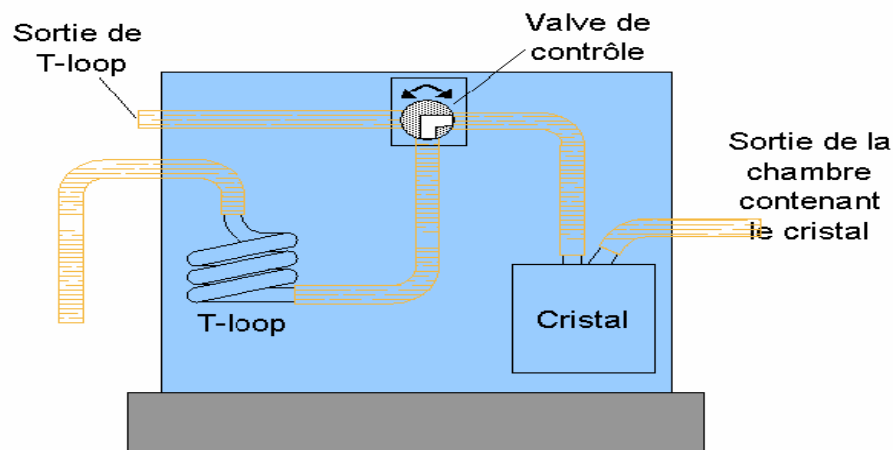


Figure 2.15. Schéma de la chambre de mesure de l'appareil QCM-D. Le liquide est injecté dans un système de boucles (T-Loop) utilisé pour la régulation de température. La valve de contrôle permet d'injecter le liquide dans la chambre de mesure thermostatée contenant le cristal de quartz ou bien d'écouler le liquide à l'extérieur (sortie de la T-loop).

CHAPITRE 3 : Films multicouches de polyélectrolytes répondant aux stimuli mécaniques

3.1 Résumé

3.2 Article 1

D. Mertz, J. Hemmerlé, F. Boulmedais, J.-C. Voegel, P. Lavalley, P. Schaaf, «*Polyelectrolyte Multilayer Films under Mechanical Stretch*», **Soft Matter**, 2007, 3, 1413.

3.3 Article 2

D. Mertz, J. Hemmerlé, J. Mutterer, S. Ollivier, J.-C. Voegel, P. Schaaf, P. Lavalley, «*Mechanically Responding Nanovalves Based on Polyelectrolyte Multilayers*», **Nano Letters**, 2007, 7, 657.

3.4 Résultats complémentaires

3.1 Résumé

Dans ce chapitre, des multicouches de polyélectrolytes ont été utilisées pour concevoir des films répondant à des stimuli mécaniques. Ce travail représente une première étape vers le développement d'assemblages supramoléculaires à réponse chimique ou biologique induite par contrainte mécanique. En particulier, les applications visées sont des dispositifs à libération contrôlée d'agents bio-actifs telles que des molécules thérapeutiques, des protéines ou des polysaccharides.

La première partie de ce travail a consisté à étudier par microscopie confocale et par microscopie à force atomique, la réponse mécanique, sous un étirement longitudinal, de trois films multicouches différents : poly(L-lysine)/acide hyaluronique (PLL/HA), poly(allylamine)/poly(styrène sulfonate) (PAH/PSS) et poly(diallyldiméthylammonium)/poly(styrène sulfonate) (PDADMA/PSS), directement déposés sur des feuilles de silicone. Sous étirement en phase liquide, alors que les films composés de 30 paires de couches PLL/HA et PDADMA/PSS (notés respectivement (PLL/HA)₃₀ et (PDADMA/PSS)₃₀) ne présentent aucune fissure à leur surface indiquant leur caractère viscoélastique, les films (PAH/PSS)₃₀ ont manifesté un comportement de type matériaux vitreux fragiles, avec l'apparition de microfissures à leurs surfaces. Ces fissures apparaissent uniformément sur toute la surface et sont orientées en moyenne perpendiculairement à la direction de l'étirement (**Figure 3.1**). Une fois les films (PAH/PSS)₃₀ ramenés à l'état non-étiré, ces fissures se rapprochent mais ne se referment pas.

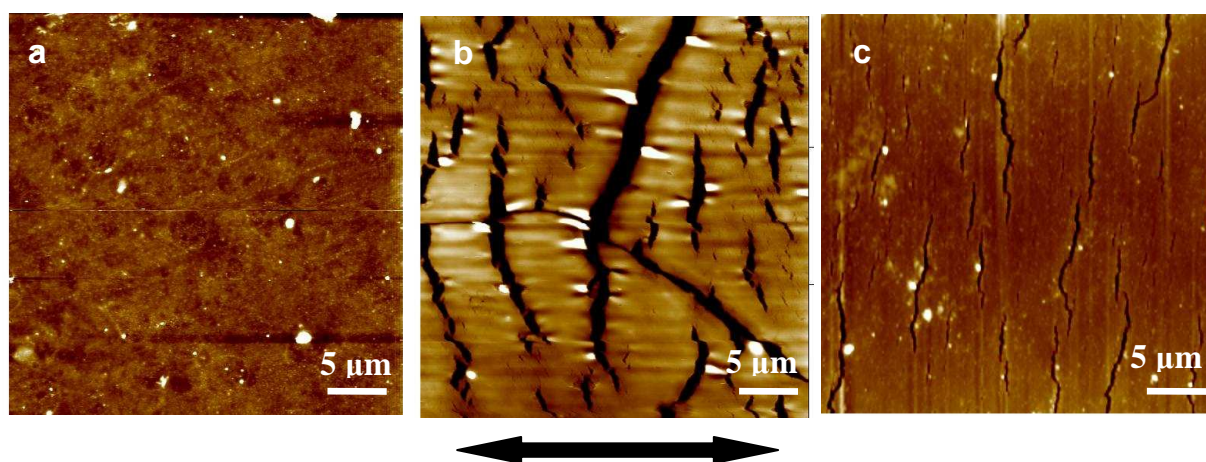


Figure 3.1. Images de microscopie à force atomique (AFM) représentant le comportement d'un film (PAH/PSS)₃₀ sous un étirement mécanique de 100%, (a) à l'état non étiré, (b) à l'état étiré, (c) au retour à l'état non étiré. La flèche noire indique la direction de l'étirement qui sera toujours identique par la suite.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié le comportement sous étirement mécanique, de systèmes multicouches de type « réservoir/barrière » obtenus par l'association de films jouant le rôle de réservoirs (PLL/HA) et de barrières (PAH/PSS ou PDADMA/PSS). Une barrière est soit déposée sur un réservoir PLL/HA ou soit enfouie entre deux réservoirs PLL/HA. Nous avons tout d'abord vérifié que les films PDADMA/PSS se comportaient comme des barrières vis-à-vis de la diffusion de chaînes de PLL^{FITC} comme cela avait été montré avec les films PAH/PSS dans des travaux antérieurs. Nous avons alors comparé le comportement sous étirement mécanique de ces deux types de barrières et deux réponses très différentes ont été observées.

En ce qui concerne les barrières PAH/PSS, nous avons tout d'abord construit des systèmes réservoir/barrière de type $(PLL/HA)_n/(PAH/PSS)_m$, puis des bi-réservoirs de type $(PLL/HA)_n/(PAH/PSS)_m/(PLL/HA)_n$. Pour ces deux structures, dès l'application d'un faible étirement, la strate barrière se fissure comme un matériau vitreux avec la formation de fractures de taille micrométriques sur toute l'interface (**Figure 3.2**). Une fois ces systèmes ramenés à l'état non-étiré, ces fissures se rapprochent mais ne se referment pas comme cela était le cas pour les films PAH/PSS.

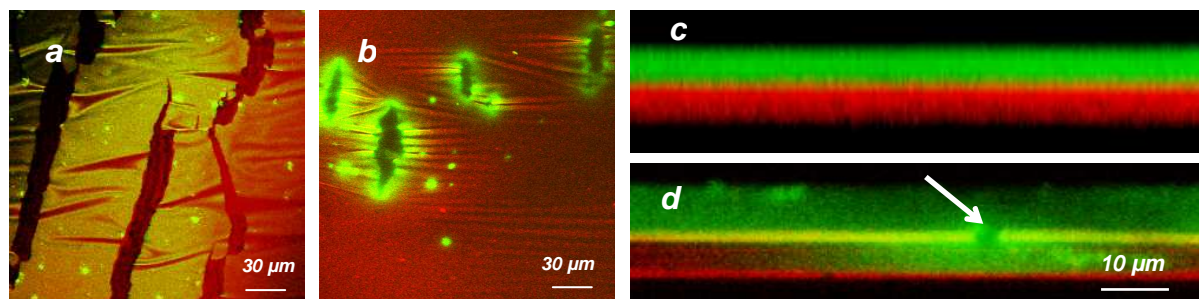


Figure 3.2. A gauche (a et b), images (x,y) de microscopie confocale (CLSM) de systèmes $(PLL/HA)_n/(PAH/PSS)_m$ (réservoir/barrière) sous un étirement mécanique de 30% représentant les fissures formées à la surface de la barrière. La diminution des temps de dépôts des polyélectrolytes de la barrière (PAH et PSS) permet d'obtenir des fissures moins étendues (b). A droite (c et d), sections (x,z) CLSM représentant un film $(PLL/HA)_{30}/PLL^{Rho}/(HA/PLL)/(PSS/PAH)_{30}/(HA/PLL)_{30}/HA/PLL^{FITC}$ (deux réservoirs séparés par une barrière) (c) à l'état non étiré, (d) sous un étirement mécanique de 40%. La flèche blanche indique la diffusion de chaînes de PLL^{FITC} d'un réservoir à l'autre à travers une fissure.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à des barrières PDADMA/PSS, plus « souples » d'un point de vue mécanique que les barrières PAH/PSS. Nous avons construit des systèmes réservoir/barrière de type $(PLL/HA)_n/(PDADMA/PSS)_m$ et leur réponse sous contrainte mécanique a été étudiée. Les observations en microscopie confocale et en microscopie à force atomique ont montré que les barrières PDADMA/PSS ne se fissuraient pas sous étirement

comme les barrières PAH/PSS, mais qu'elles s'ouvraient en formant des nanopores dont les tailles varient de quelques dizaines à quelques centaines de nm (**Figure 3.3**). Nous avons montré que ces nanopores se forment à des taux critiques d'étirement qui dépendent de façon croissante avec le nombre de couches constituant la barrière. Par ailleurs, ce mécanisme est réversible, c'est-à-dire que les pores se referment et la barrière redevient imperméable lorsque le film est replacé à l'état non-étiré. En effet, une fois le système relaxé au retour à l'état non-étiré, l'ajout d'une solution de PLL^{FITC} a permis de confirmer que la barrière devenait à nouveau imperméable aux chaînes de PLL^{FITC}. De plus, il apparaît que la fermeture de ces nanopores est liée à un processus de relaxation mécanique faisant intervenir des oscillations qui s'amortissent sur une certaine durée, au niveau des couches composant la barrière (**Figure 3.3**). Ainsi, ces propriétés nous indiquent la possibilité pour ces systèmes polymériques de jouer le rôle de nano-valves à commande mécanique.

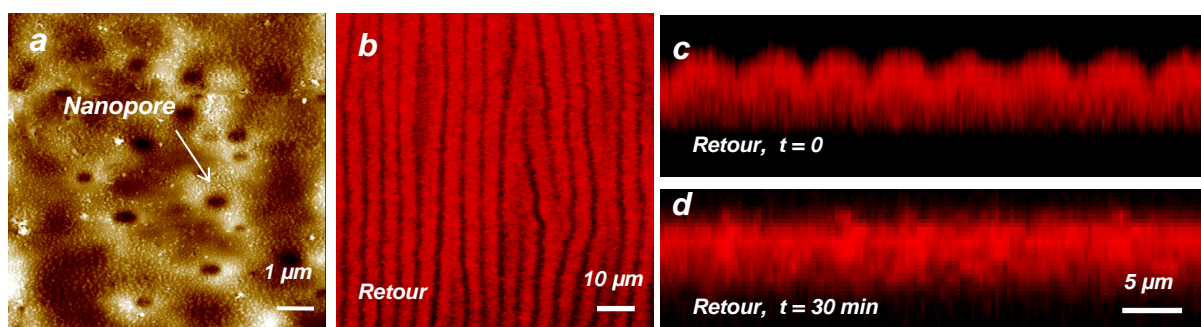


Figure 3.3. (a) Image AFM de nanopores formés sur la barrière d'un système réservoir/barrière $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}/(\text{PSS}/\text{PDADMA})_5$ sous un étirement de 100%, (b) Image (x,y) CLSM représentant le phénomène de relaxation de la barrière d'un système réservoir/barrière $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}^{\text{Rho}}/(\text{HA}/\text{PLL})/(\text{PSS}/\text{PDADMA})_5$ au retour à l'état non-étiré, (c et d) sections verticales (x,z) CLSM illustrant la cinétique de relaxation des oscillations de la barrière entre $t=0$ (c) et $t=30$ min (d).

En ce qui concerne les systèmes bi-réservoirs, $(\text{PLL}/\text{HA})_n/(\text{PDADMA}/\text{PSS})_m/(\text{PLL}/\text{HA})_n$, l'application d'un étirement mécanique a permis de déclencher de façon contrôlée la diffusion des chaînes de PLL d'un réservoir PLL/HA à l'autre (**Figure 3.4**). La présence de nanopores dans la barrière PDADMA/PSS, à l'interface entre les deux réservoirs PLL/HA, a également été observée par microscopie confocale. Ces pores sont probablement à l'origine de la perméabilité de la barrière sous étirement mécanique et par conséquent de la diffusion des chaînes de PLL d'un réservoir à l'autre.

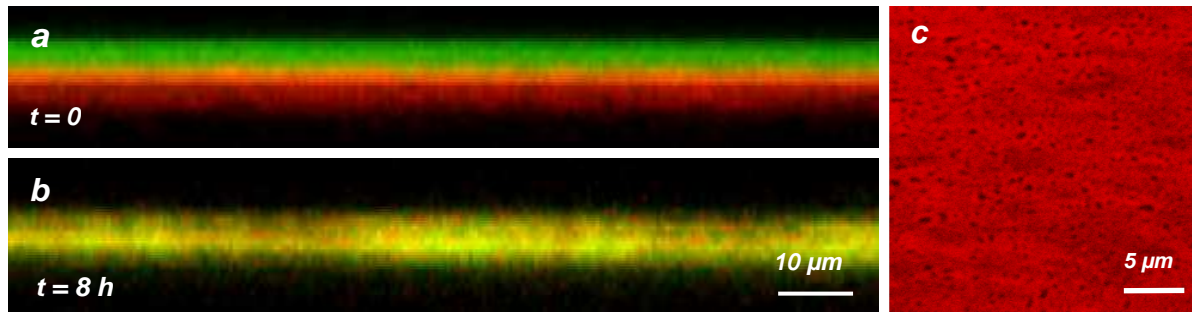


Figure 3.4. Images CLSM d'un système bi-réservoirs $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}^{\text{Rho}}/(\text{HA}/\text{PLL})/(\text{PSS}/\text{PDADMA})_5/(\text{HA}/\text{PLL})_{30}/\text{HA}/\text{PLL}^{\text{FITC}}$ (deux réservoirs séparés par une barrière), sous un étirement mécanique de 90%. A gauche : sections (x,z) représentant la diffusion des chaînes de PLL^{FITC} et de PLL^{Rho} à travers la barrière PDADMA/PSS (a) à $t = 0$, (b) à $t = 8\text{h}$. A droite (c) : image (x,y) à l'interface entre les deux réservoirs représentant les nanopores formés dans la barrière.

3.2 Article 1

[Signalement bibliographique ajouté par :
SICD Strasbourg - Département de la Documentation électronique
Service des thèses électroniques]

Polyelectrolyte Multilayer Films under Mechanical Stretch

Damien Mertz, Joseph Hemmerlé, Fouzia Boulmedais, Jean-Claude Voegel, Philippe Lavalley, Pierre Schaaf

Soft Matter, 2007, Vol. 3, Pages 1413–1420

Pages 80-87 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1039/b710305k>

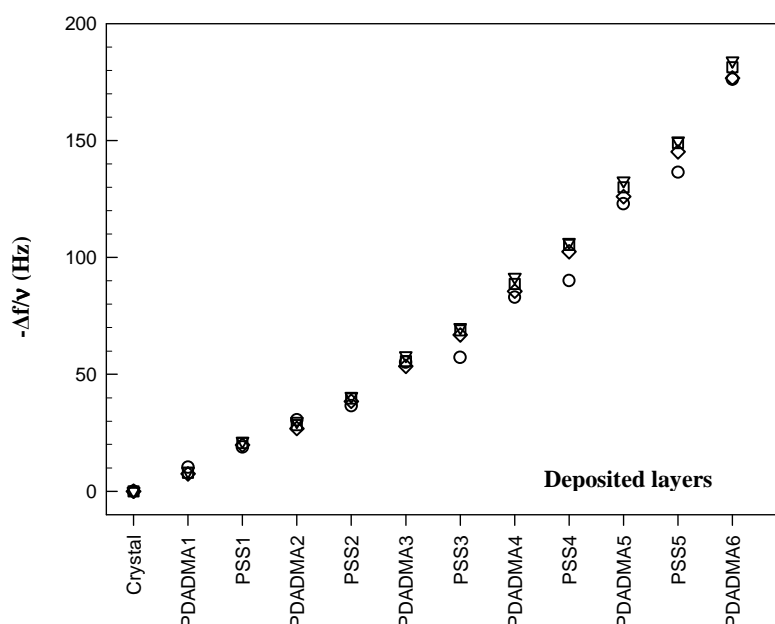
La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

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

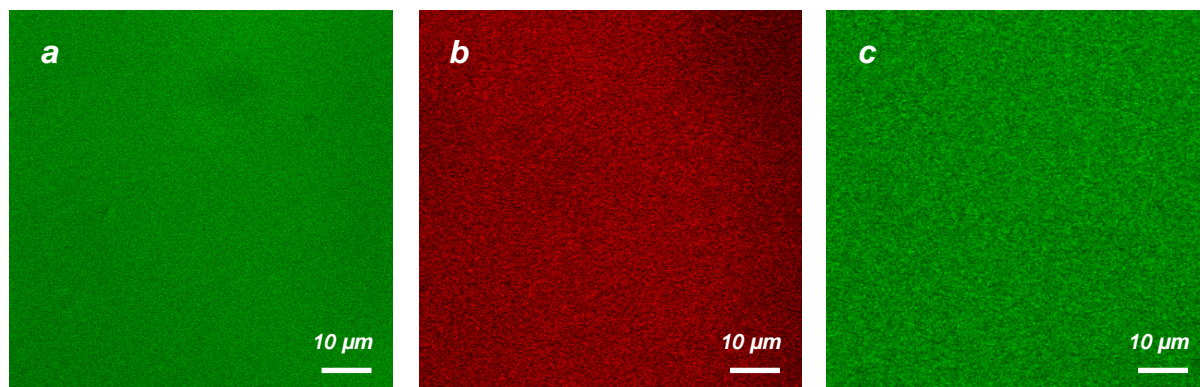
Article 1 (SUPPORTING INFORMATION)

Quartz Crystal Microbalance (QCM)

The build up process of the multilayered films was monitored *in situ* by quartz crystal microbalance-dissipation using the axial flow chamber QAFC 302 (QCM-D, D300, Q-Sense, Göteborg, Sweden). The QCM technique consists of measuring the resonance frequency (f) and the dissipation (D) of a quartz crystal induced by polyelectrolyte adsorption on the crystal, in comparison with the crystal in contact with the rinsing solution. The crystal used here is coated with a 50 nm thick SiO_2 film deposited by active sputter-coating. The quartz crystal is excited at its fundamental frequency (5 MHz), and the measurements are performed at the first, third, fifth and seventh overtones (denoted as ν) corresponding to 5, 15, 25 and 35 MHz, respectively. Changes in the resonance frequency, Δf , and in the dissipation factor, ΔD , during each adsorption step are measured. A shift in Δf can be associated, in first approximation, with a variation of the mass adsorbed to the crystal. To characterize the film at a given step, only the frequencies and dissipations at the end of the rinsing steps following the exposure to either polycation or polyanion were taken into consideration. The measurement methodology has been addressed in detail elsewhere and is applied in the present work (Picart et al. 2001).



Figures S1. Quartz Crystal Microbalance (QCM) measurements monitoring the changes in the normalized frequency shifts $-\Delta f/\nu$ at 5 MHz (○), 15 MHz (◊), 25 MHz (◻) and 35 MHz (▽) during the build-up of (PDADMA/PSS)₅/PDADMA multilayer films on a SiO_2 crystal.



Figures S2. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) (x,y) images of three different polyelectrolyte multilayers deposited on bare silicone sheets and observed at the non-stretched state : $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}^{\text{FITC}}$ film (a), $(\text{PDADMA}/\text{PSS})_{30}/(\text{PDADMA}/\text{PSS}^{\text{Rho}})$ film (b), $(\text{PAH}^{\text{FITC}}/\text{PSS})_{30}$ film (c). Image sizes are $77 \times 77 \mu\text{m}^2$.

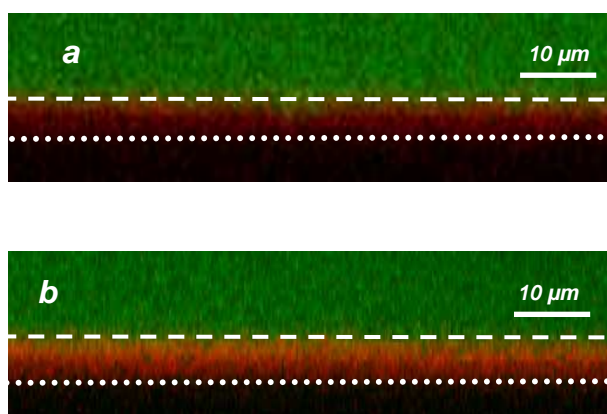


Figure S3. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) section (x,z) image of a) $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}^{\text{Rho}}/(\text{HA}/\text{PLL})/(\text{PSS}/\text{PAH})_5$ multilayer film and b) $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}^{\text{Rho}}/(\text{HA}/\text{PLL})/(\text{PSS}/\text{PDADMA})_5$ multilayer film deposited on a silicone sheet and brought in contact with a PLL^{FITC} solution. Observations are performed in both the green and the red channels at the non-stretched state. The dotted line indicates the interface between the silicone sheet and the multilayer film, whereas the dashed line locates the barrier on top of the PLL/HA compartment. Image sizes are $115 \times 32 \mu\text{m}^2$.

3.3 Article 2

[*Signalement bibliographique ajouté par :*
SICD Strasbourg - Département de la Documentation électronique
Service des thèses électroniques]

Mechanically Responding Nanovalves Based on Polyelectrolyte

Multilayers

D. Mertz, J. Hemmerlé, J. Mutterer, S. Ollivier, J.-C. Voegel, P. Schaaf, P. Lavalle

Nano Letters, 2007, Vol. 7, N° 3, Pages 657-662

Pages 90-95 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1021/nl062657+>

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/>

Article 2 (SUPPORTING INFORMATION)

I. Experimental section

Materials

Poly(L-lysine) (PLL, $M_w = 5.57 \times 10^4$ Da), poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS, $M_w = 7.0 \times 10^4$ Da), poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDADMA, $M_w = 2.0\text{-}3.5 \times 10^5$ Da) were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France), and hyaluronic acid (HA, $M_w = 4.0 \times 10^5$ Da) from BioIberica (Barcelona, Spain). Polyelectrolyte solutions were prepared by dissolution of adequate amounts of polyelectrolyte powders (or by dilution of commercial solution for PDADMA) in 0.15 M NaCl solution (pH = 6.5). The final concentrations of the polyelectrolyte solutions were $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. All solutions were prepared using ultrapure water (Milli Q-plus system, Millipore) with a resistivity of $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$.

Fluorescently labelled polyelectrolytes

Fluorescein isothiocyanate labelled poly(L-lysine) (PLL^{FTIC}, $M_w = 3.0\text{-}7.0 \times 10^4$ Da), was obtained from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). Rhodamine RedTM-X, succinimidyl ester (Invitrogen, France) was coupled to PLL. An appropriate amount of PLL ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) was dissolved in a Na_2CO_3 solution (0.1 M, pH = 8.5). Rhodamine (Rho) at $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ was dissolved in DMSO (dimethylsulfoxide). We used a ratio of 1 mg of rhodamine for 50 mg of PLL. The solutions were gently mixed at room temperature during 2 h. PLL^{Rho} was purified by dialysis during 3 days, and then the absence of free rhodamine in the solution was checked by UV spectroscopy (Hermanson 1996).

Build-up of Polyelectrolyte Multilayers

Multilayers were built with an automated dipping robot (Riegler & Kirstein GmbH, Berlin, Germany) on silicon sheets of $254 \mu\text{m}$ thick (Specialty Manufacturing Inc. SMI, Saginaw, Michigan, USA). Silicon sheets of $18 \times 18 \text{ mm}^2$ were previously cleaned with ethanol and then extensively rinsed with water. Silicon substrates were first dipped in a PLL solution (polycation) for 10 min. Then, a rinsing step was performed by dipping the sheets for 5 min in 0.15M NaCl solution. The polyanion (HA) was then deposited in the same manner. The build-up process was pursued by the alternated deposition of PLL and HA. After deposition of n bilayers, the film is denoted (PLL/HA) _{n} . The same method was applied for PSS (polyanion) and PDADMA (polycation) depositions leading to (PDADMA/PSS) _{m} multilayers. The dye-conjugated polyelectrolytes were adsorbed in the same way at a certain stage of the build-up process.

Stretching device

A homemade stretching device allowed to elongate silicon substrates in the longitudinal direction directly under the confocal microscope up to a stretching degree $l/l_0 = 2.3$. The stretching motion is achieved by a precision electric motor at a velocity of 0.74 mm.s^{-1}

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) observations were carried out with a Zeiss LSM 510 microscope using a $\times 40$ (Zeiss Achroplan) objective and with $0.4 \text{ }\mu\text{m}$ z -section intervals. FITC fluorescence was detected after excitation at $\lambda = 488 \text{ nm}$ with a cut-off dichroic mirror of 488 nm and an emission band-pass filter of $505\text{-}530 \text{ nm}$ (green emission). Rhodamine fluorescence was detected after excitation at $\lambda = 543 \text{ nm}$, dichroic mirror of 543 nm , and an emission long pass filter of 585 nm (red emission). Virtual vertical sections can be visualized, hence allowing the determination of the thickness of the film. All the experiments are performed in liquid condition (NaCl 0.15 M , $\text{pH} = 6.5$), and the multilayer films were never dried.

Atomic Force microscopy (AFM)

Atomic force imaging was performed using a D3000 Nanoscope IIIa (Veeco, Santa Barbara, CA). The apparatus operated in the tapping mode in dry condition. Cantilevers, with a spring constant of 0.05 N.m^{-1} and a resonant frequency of 150 kHz ending with a silicon tip were used (Model MPP 12100, Veeco, Santa Barbara, CA).

Quartz Crystal Microbalance (QCM)

The build up process of the multilayered films was monitored in situ by quartz crystal microbalance-dissipation using the axial flow chamber QAFC 302 (QCM-D, D300, Q-Sense, Göteborg, Sweden). The QCM technique consists of measuring the resonance frequency (f) and the dissipation (D) of a quartz crystal induced by polyelectrolyte adsorption on the crystal, in comparison with the crystal in contact with NaCl solution. The crystal used here is coated with a 50 nm thick SiO_2 film deposited by active sputter-coating. The quartz crystal is excited at its fundamental frequency (5 MHz), and the measurements are performed at the first, third, fifth and seventh overtones (denoted as ν) corresponding to 15 , 25 and 35 MHz , respectively. Changes in the resonance frequency, Δf , and in the dissipation factor, ΔD , during each adsorption step are measured. A shift in Δf can be associated, in first approximation, with a variation of the mass adsorbed to the crystal. To characterize the film at a given step,

only the frequencies and dissipations at the end of the rinsing steps following the exposure to either polycation or polyanion were taken into consideration. The experimental data (Δf and ΔD) can be analyzed in the framework of the model developed by Voinova et al. (Voinova et al. 1999). Under the hypothesis that the film is a homogeneous and isotropic viscoelastic layer, a unique series of thickness values, d , is derived from $\Delta f/v$ and ΔD corresponding to $v = 3, 5, \text{ and } 7$. The measurement methodology has been addressed in detail elsewhere and is applied in the present work (Picart et al. 2001).

II. Control of film build-up with QCM

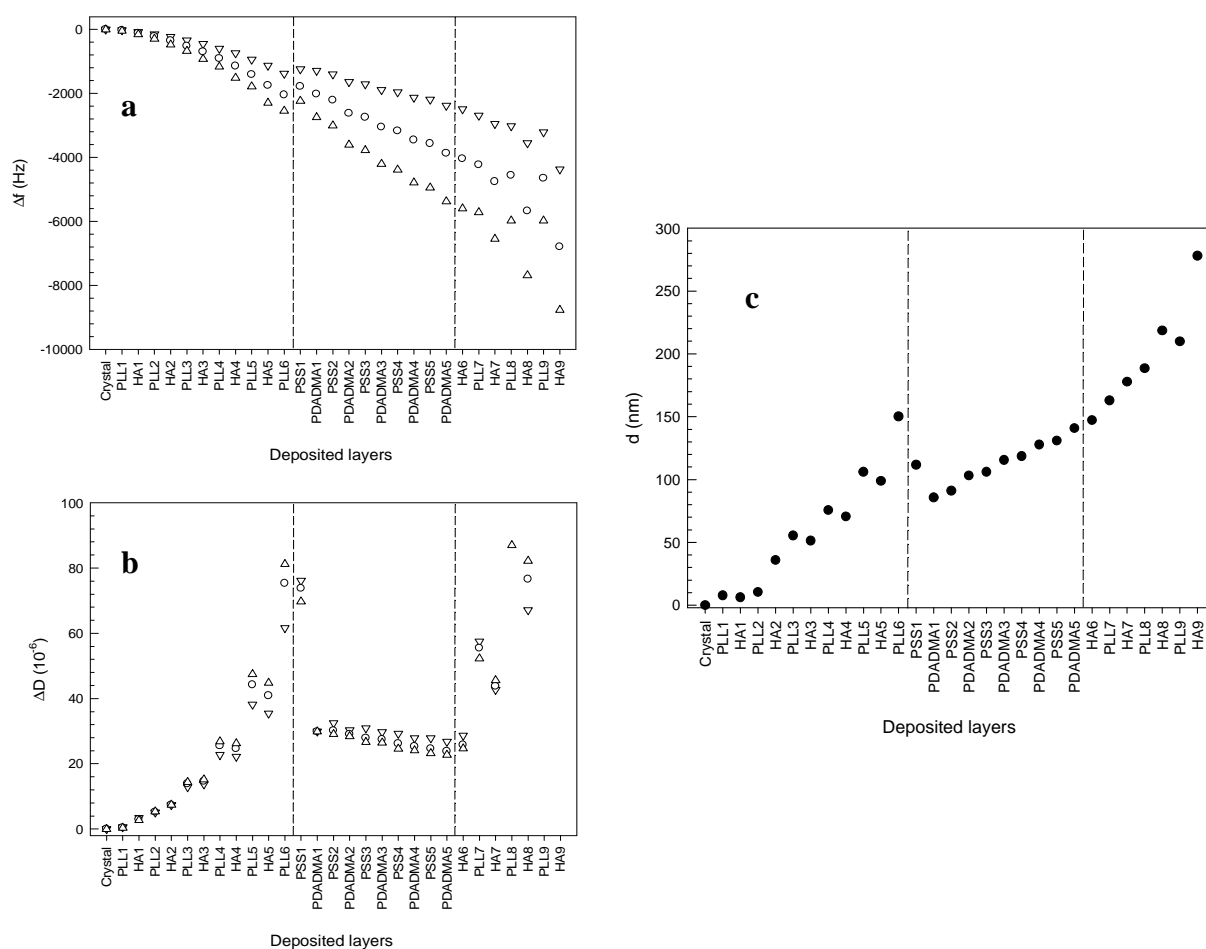


Figure SI. QCM measurements monitoring the changes a) in the frequency shifts Δf and b) in the dissipation shifts ΔD at 15 MHz (∇), 25 MHz (Δ) and 35 MHz (\circ) during the build-up of $(\text{PLL}/\text{HA})_5/\text{PLL}/(\text{PSS}/\text{PDADMA})_5/\text{HA}/(\text{PLL}/\text{HA})_3$ multilayer films. c) Evolution of the film thickness determined from the frequency changes and the dissipations measured at 15, 25 and 35 MHz by using the model of Voinova et al.

One observes that the thickness of the $(\text{PLL}/\text{HA})_5/\text{PLL}$ film decreases during the deposition of the first PSS/PDADMA bilayer. This can be due to a rearrangement of the $(\text{PLL}/\text{HA})_5/\text{PLL}$ film when the nature of the polyelectrolytes deposited on top of the

multilayer is changed. Such rearrangements could be the consequence of a change of the charge density on top of the film. It could also be due to a strong interaction of PSS and PDADMA respectively for PLL and HA. Some of these chains from the film beneath the barrier could thus be attracted towards the first PSS/PDADMA layer, leading to a thinning and densification of the (PLL/HA)₅/PLL film below. These explanations are however only speculative and would need an entire study to be confirmed which is, however, out of the scope of this paper. Finally, from the evolution of the film thickness with the number of deposition steps one deduces that the thickness increment per PSS/PDADMA bilayer is 14 nm so that, for example, a (PSS/PDADMA)₅ barrier has a total thickness of 70 nm.

III. Confocal image of a PSS/PAH barrier under stretching

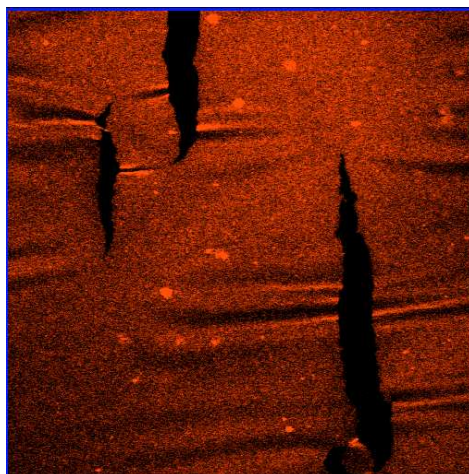


Figure SII. Confocal Laser Scanning Microscopy top view (x,y) image in the red channel of a (PLL/HA)₃₀/PLL/(PSS/PAH)₂/PSS^{MRho} multilayer film (one compartment capped with a barrier) deposited on a silicone sheet. The silicone sheet with the multilayers is stretched at $l/l_0 = 1.1$. PSS^{MRho} correspond to PSS chains labelled in red with methacryloxyethyl thiocarbamoyl rhodamine B. The labeling of PSS with with methacryloxyethyl thiocarbamoyl rhodamine B is described elsewhere (Vodouhé et al. 2006). Image sizes are 230×230 μm^2 .

3.4 Résultats complémentaires

A. Test d'adhésion des polyélectrolytes sur silicone

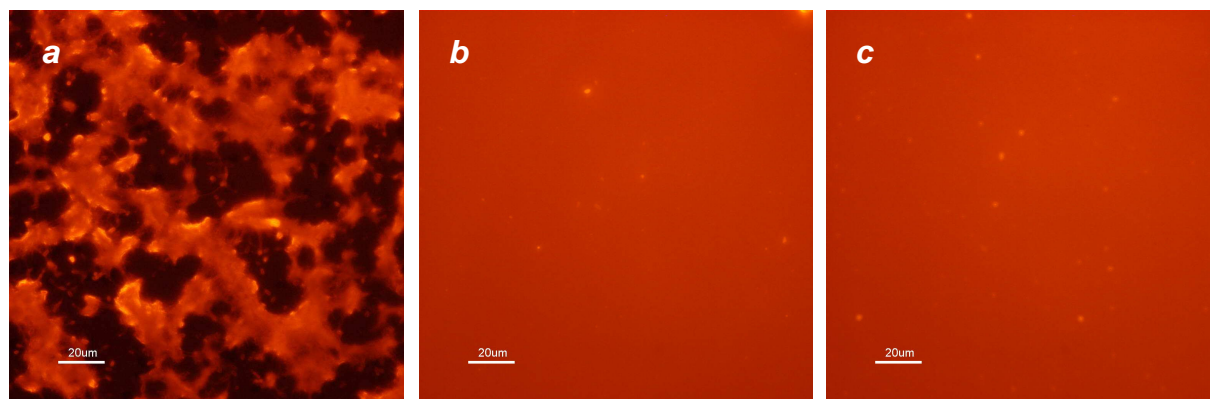


Figure RC1. Images de microscopie à épi-fluorescence représentant l'adhésion de trois différentes paires de couches de polyélectrolytes sur une feuille de silicone. (a) (PSS/PAH^{Rho}), (b) (PAH^{Rho}/PSS), (c) (PLL^{Rho}/PSS). Ces images montrent que des polyélectrolytes tels que PAH et PLL qui sont des polyammoniums s'adsorbent uniformément sur toute la surface du silicone pourtant non chargée (b et c) alors que le PSS ne recouvre pas la surface de façon homogène en formant des îlots répartis non-uniformément (a). On attribue ces différences d'adhésion à des différences d'interactions intermoléculaires (de type Van der Waals) à l'interface entre ces polyélectrolytes et le poly(diméthylsiloxane) constituant le silicone.

B. Influence de la déshydratation sur la viscoélasticité des films PDADMA/PSS

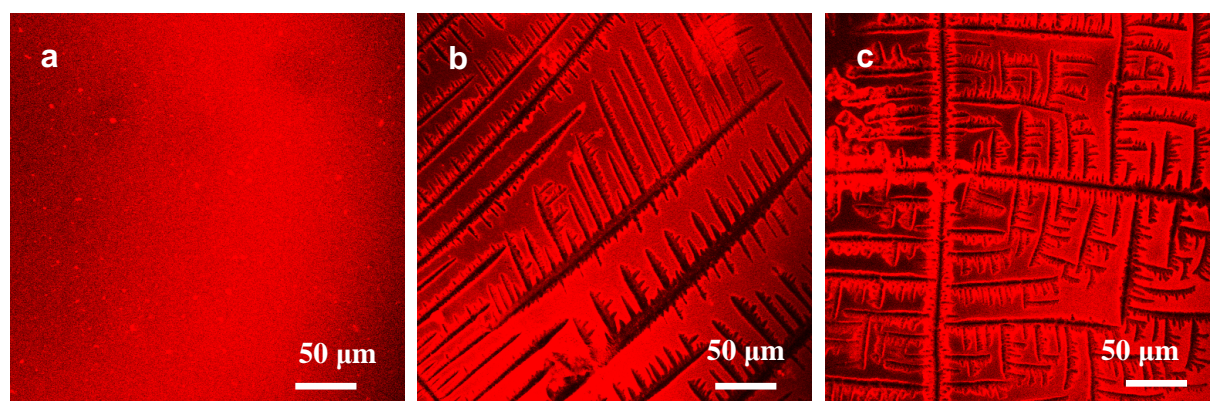


Figure RC2. Images de microscopie confocale (x,y) représentant la déshydratation d'un film (PDADMA/PSS^{Rho})₃₀ sous un étirement de 100%. (a) Le film est en milieu liquide, il présente un comportement visco-élastique, (b) et (c) le film est séché, la formation de fractures géométriques est observée sur toute la surface indiquant le caractère vitreux des films PDADMA/PSS lorsqu'ils sont déshydratés. La quantité d'eau dans ces films semble donc influencer fortement leurs propriétés mécaniques.

C. Construction des barrières PSS/PAH sur les films PLL/HA

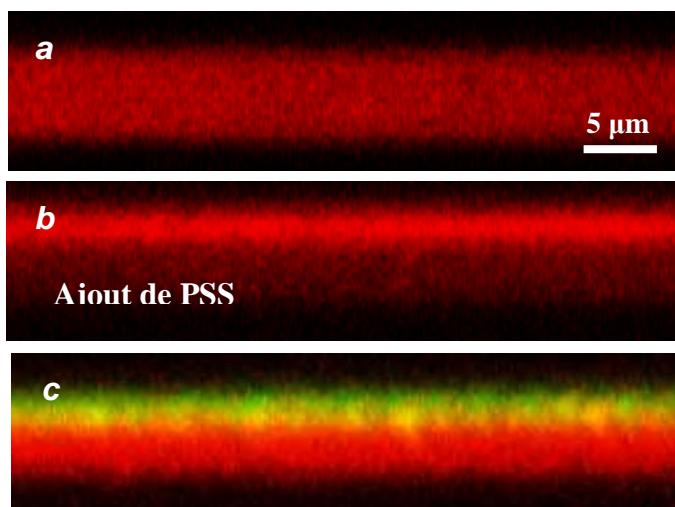


Figure RC3. Sections verticales (x,z) de microscopie confocale représentant la construction d'une barrière $(\text{PSS}/\text{PAH}^{\text{FITC}})_5$ sur un film $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}^{\text{Rho}}/(\text{HA}/\text{PLL})$. (a) Film $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}^{\text{Rho}}/(\text{HA}/\text{PLL})$, (b) Ajout de PSS pour former le film $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}^{\text{Rho}}/(\text{HA}/\text{PLL})/\text{PSS}$ et (c) Film réservoir-barrière $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}^{\text{Rho}}/(\text{HA}/\text{PLL})/(\text{PSS}/\text{PAH}^{\text{FITC}})_5$. Dès l'ajout de PSS sur le film $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}^{\text{Rho}}/(\text{HA}/\text{PLL})$, la surface du film se concentre très fortement en PLL^{Rho} (b), ceci est attribué à l'existence d'une forte affinité chimique de complexation entre les chaînes de PLL et de PSS.

D. Relaxation des barrières PDADMA/PSS dans des systèmes bi-réservoirs

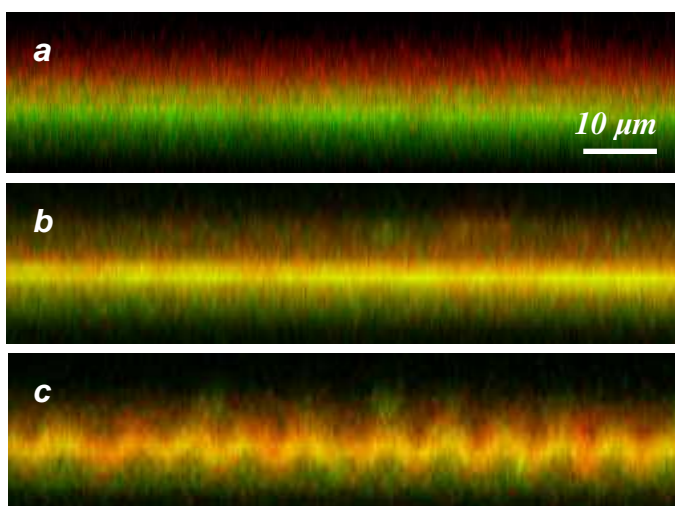


Figure RC4. Sections verticales (x,z) de microscopie confocale d'un système bi-réservoirs : $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}^{\text{FITC}}/(\text{HA}/\text{PLL})/(\text{PSS}/\text{PDADMA})_5/(\text{HA}/\text{PLL})_{30}/\text{HA}/\text{PLL}^{\text{Rho}}$ (a) à l'état non-étiré, (b) à l'état étiré de 80% après quelques heures, (c) au retour à l'état non-étiré, dans les premières minutes lors de la relaxation mécanique de la barrières.

CHAPITRE 4 : Multicouches enzymatiques à biocatalyse contrôlée

4.1 Systèmes enzymatiques réservoir/barrière à perméabilité contrôlée

4.1.1 Résumé

4.1.2 Projet Article 3

D. Mertz, J. Hemmerlé, J.-C. Voegel, P. Schaaf, P. Lavalley, “Tuneable Permeability of Enzymatic Reservoir/Barrier Systems Made of Polyelectrolyte Multilayers”, in preparation.

4.2 Application à la biocatalyse réversiblement modulée

4.2.1 Résumé

4.2.2 Projet Article 4

D. Mertz, C. Vogt, J. Hemmerlé, J.-C. Voegel, P. Lavalley, P. Schaaf, “Cryptic Site Surfaces Inspired by Mechanotransduction Proteins for Biocatalysis Modulation”, in preparation.

4.3 Résultats Complémentaires

4.3.1 Détermination des conditions expérimentales optimales

4.3.2 Systèmes à réservoirs de molécules substrats pour la détection enzymatique

Dans ce deuxième chapitre de résultats expérimentaux, nous nous sommes intéressés à construire des assemblages multicouches fonctionnalisés par une enzyme, dans le but de développer des systèmes à propriétés biocatalytiques contrôlées par des stimuli mécaniques. La phosphatase alcaline (notée AP), qui joue un rôle biologique important, a été choisie comme enzyme modèle. Cette enzyme catalyse, selon un processus appelé déphosphorylation, les réactions d'hydrolyse des groupements phosphates présents dans de nombreuses molécules et macromolécules biologiques (telles que des nucléotides ou des protéines).

Dans une première partie (**chapitre 4-1**), nous présentons la construction de systèmes enzymatiques réservoir/barrière construits à partir de films PLL/HA jouant le rôle de réservoirs d'enzymes et de films PDADMA/PSS jouant le rôle de barrières (empêchant la diffusion de molécules de la solution vers ces réservoirs). Nous montrons qu'il est possible de contrôler la perméabilité de ces barrières PDADMA/PSS et d'obtenir ainsi des barrières imperméables aux molécules substrats de l'enzyme. L'application d'un étirement mécanique sur ces systèmes, permet selon les conditions de construction, de déclencher une réaction enzymatique soit à *l'intérieur du réservoir* (réaction intra-réservoir), soit à *l'interface réservoir/barrière* (réaction interfaciale).

Dans la deuxième partie (**chapitre 4-2**), nous nous focalisons sur ces barrières à *réaction interfaciale*. Nous montrons qu'il est possible de contrôler de façon réversible l'activité catalytique de ces multicouches enzymatiques avec le degré d'étirement mécanique. Nous envisageons d'interpréter la modulation de la biocatalyse, à travers l'hypothèse d'un mécanisme de type « sites cryptiques » consistant à l'exposition des sites enzymatiques sous l'action de l'étirement mécanique et à leur ré-enfouissement lors du retour à l'état non étiré.

Dans la troisième partie (**chapitre 4-3**), nous présentons des résultats complémentaires à ce travail. Tout d'abord, nous détaillons le développement de certaines conditions expérimentales ayant permis la réalisation des systèmes réservoir/barrière précédents, utilisés dans les parties 4-1 et 4-2. Puis, nous présentons une stratégie *inverse* de celle qui a été présentée dans ces parties en fonctionnalisant les réservoirs PLL/HA par une molécule substrat de l'enzyme, au lieu de la phosphatase alcaline. Nous montrons que ce système répond sous l'action d'une force d'étirement mécanique, en émettant un pulse de lumière fluorescente due à la réaction enzymatique, lorsque de la phosphatase alcaline est présente dans le milieu.

4.1 Systèmes enzymatiques réservoir/barrière à perméabilité contrôlée

4.1.1 Résumé

Dans cette partie (chapitre 4-1), nous présentons la construction de systèmes enzymatiques réservoir/barrière à base de multicouches de polyélectrolytes (PLL/HA et PDADMA/PSS) et de phosphatase alcaline (notée AP). Les films PLL/HA sont utilisés en tant que réservoirs enzymatiques d'AP et ils sont recouverts par des films PDADMA/PSS qui jouent le rôle de barrière empêchant la diffusion de molécules (polyélectrolytes, molécule substrat) de la solution vers l'intérieur du réservoir.

En utilisant la microbalance à cristal de quartz (QCM), nous montrons tout d'abord que l'AP se dépose en grande quantité dans un film PLL/HA. L'emploi d'AP^{Rho} (AP marquée par de la rhodamine) couplée et purifiée au laboratoire, a permis de mettre en évidence par microscopie confocale (CLSM) une distribution homogène de l'enzyme dans l'ensemble du film PLL/HA. Ces expériences montrent ainsi que les films PLL/HA constituent de véritables réservoirs enzymatiques chargés en AP.

Des expériences par spectrophotométrie UV/Vis ont été menées pour mesurer l'activité catalytique en solution de tels réservoirs enzymatiques. Pour cela, nous avons utilisé une molécule substrat, le para-nitrophénylphosphate (PNP) dont la conversion enzymatique donne le para-nitrophénol (PN) qui absorbe dans le spectre UV/visible à $\lambda = 405$ nm. L'activité catalytique à l'intérieur du réservoir a, quant à elle, été détectée par CLSM en utilisant de la fluorescéine di-phosphate (FDP), une autre molécule substrat de l'enzyme. Cette molécule non fluorescente donne, par la conversion enzymatique, un produit fortement fluorescent, la fluorescéine, détectable par des techniques utilisant le phénomène de fluorescence (telles que la microscopie confocale ou la fluorimétrie).

Ensuite, nous avons déposé des films PDADMA/PSS sur de tels réservoirs enzymatiques pour former des systèmes multicouches mixtes homogènes : (PLL/HA)₁₅/PLL/AP^{Rho}/(PLL/HA)₁₅/(PDADMA/PSS)₅. Alors que les films PDADMA/PSS jouent le rôle de barrière vis-à-vis de la diffusion de chaînes de PLL^{FITC} (comme cela a été montré dans le chapitre 3), nous observons que ces films sont complètement perméables aux petites molécules substrats comme la FDP qui peuvent atteindre le réservoir et se transformer en fluorescéine par conversion enzymatique. Cette observation montre que la barrière (PDADMA/PSS)₅ possède une perméabilité précise, n'autorisant le passage que des

molécules de tailles réduites. Nous suggérons l'existence de pores ayant une certaine taille d'exclusion dans les barrières PDADMA/PSS pour interpréter cette perméabilité.

Dans le but de diminuer la perméabilité de ces couches (PDADMA/PSS) et ainsi d'empêcher la diffusion des molécules de FDP vers le réservoir enzymatique, deux paramètres expérimentaux intervenant dans la construction ont été étudiés : le nombre de couches et la cinétique de dépôt des polyélectrolytes PDADMA et PSS constituant la barrière. Nous montrons qu'il devient possible de construire des barrières imperméables vis-à-vis des molécules de FDP, soit en augmentant le nombre de couches de la barrière, soit en diminuant le temps de dépôt des polyélectrolytes constituant cette barrière.

Deux systèmes réservoir/barrière initialement non perméables à la FDP, un **premier système** construit avec un grand nombre de couches (PDADMA/PSS)_n déposées avec un temps d'adsorption *t* habituel ($n= 10, t= 4 \text{ min.}$) et un **second système** construit avec un nombre habituel de couches (PDADMA/PSS)_n déposées avec un temps court d'adsorption *t* ($n= 5, t= 1 \text{ min.}$), ont été réalisés et soumis à un étirement mécanique donné. Les observations effectuées en microscopie confocale montrent que dans les deux cas, la réaction enzymatique est induite suite à l'application de l'étirement mécanique mais donne lieu à deux phénomènes différents. Alors que l'application de l'étirement mécanique déclenche la réaction enzymatique à *l'intérieur du réservoir* pour le **premier système**, cette réaction se produit à *l'interface barrière/solution* pour le **second système**. Cette différence de comportement résulte probablement de deux mécanismes différents. Alors que le premier mécanisme semble être relié à une augmentation de la taille d'exclusion des pores de la barrière sous contrainte mécanique (permettant ainsi la diffusion complète des molécules de FDP à l'intérieur du réservoir), le second mécanisme semble être réalisé par une augmentation de l'exposition des sites enzymatiques sans modification de l'imperméabilité de la barrière.

4.1.2. Projet Article 3

“Tuneable Permeability of Enzymatic Reservoir/Barrier Systems Made of Polyelectrolyte Multilayers”

1. Introduction

Polyelectrolyte multilayer (PEM) films functionalised with enzymes and able to maintain bioactivities, constitute an attractive research field in order to develop biosensors (Narvaez et al. 2000), multi-reactor systems with cascades of reactions (Onda et al, 1996) or biocatalytic nanobiocolloids (Lvov and Caruso 2001). Recently, our group has described the incorporation of alkaline phosphatase in exponentially growing polyelectrolyte multilayers like poly(L-lysine)/hyaluronic acid (PLL/HA) or poly(L-lysine)/poly(glutamic acid) (PLL/PGA) and showed that enzyme activities were maintained (Derbal et al. 2003; Lavalley et al. 2005).

In this article, we address the design of enzymatic reservoir/barrier systems made of polyelectrolyte multilayer films. Alkaline phosphatase (AP) constitutes an adequate model of enzyme to investigate the validity of these systems. We show that AP is homogeneously distributed within a poly(L-lysine)/hyaluronic acid (PLL/HA) reservoir, with a constant catalytic activity (measured in solution) over at least a period of 24 hours. This PLL/HA enzymatic reservoir is capped with poly(diallyldimethylammonium)/poly(styrene sulfonate) (PDADMA/PSS) multilayers acting as barriers towards the diffusion of macromolecules such as PLL. We demonstrate that by adjusting experimental parameters such as the number of layers and the adsorption times of the polyelectrolytes constituting the PDADMA/PSS cappings, it becomes possible to tune the permeability of this capping towards low molecular weight enzymatic substrates such as fluorescein di-phosphate (FDP) molecules. Thus, these new designed polymeric systems bear catalytic activity that can be switched off by the use of an impermeable barrier blocking the permeation of enzymatic substrates. This work opens the route to catalytic systems responding by opening the barrier in response to external stimuli. We report here the application of a mechanical stretching on the films to render the barriers permeable and to trigger enzymatic reactions.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Poly(L-lysine) (PLL, $M_w = 5.57 \times 10^4$ Da), poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS, $M_w = 7.0 \times 10^4$ Da), poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDADMA, $M_w = 2.0-3.5 \times 10^5$ Da) were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France), and hyaluronic acid (HA, $M_w = 4.0 \times 10^5$ Da) from BioIberica (Barcelona, Spain). Polyelectrolyte solutions were prepared by dissolution of adequate amounts of polyelectrolyte powders (or by dilution of commercial solution for PDADMA) in 0.15 M NaCl/10 mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) solutions (pH = 7.4). The final concentrations of the polyelectrolyte solutions were 1 mg/mL. All solutions were prepared using ultrapure water (Milli Q-plus system, Millipore, Molsheim, France) with a resistivity of 18.2 M Ω .cm.

For films functionalized with enzymes, alkaline phosphatase (noted AP, Sigma-Aldrich, P-4002, St Quentin Fallavier, France) was also dissolved in a 0.15 M NaCl/10 mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) (pH = 7.4) buffer at a concentration of 1 mg.mL⁻¹. Rhodamine labelled alkaline phosphatase (AP^{Rho}), was obtained by coupling the enzyme (AP) dissolved at 10 mg.mL⁻¹ in a Na₂CO₃ solution (0.1 M, pH = 8.5) with the red fluorescent dye Rhodamine RedTM-X, succinimidyl ester (Invitrogen, France) dissolved in DMSO (dimethylsulfoxyde) at 10 mg.mL⁻¹. We used a ratio of 1 mg of rhodamine for 10 mg of enzyme. These two solutions were gently mixed at room temperature during 1 h. AP^{Rho} was purified by dialysis during 3 days (Cut Off 12000-16000 g/mol Membra-Cel TM, Viskase Companies, Darien, Illinois, USA), and the absence of free rhodamine in the solution was checked by UV spectroscopy. A similar protocol was used for labelling alkaline phosphatase with the green fluorescent dye fluorescein-5-isothiocyanate (FITC Isomer I, Invitrogen) leading to AP^{FITC} and the absence of free FITC in the solution was checked by UV spectroscopy and by fluorimetry.

Rhodamine RedTM-X, succinimidyl ester was also covalently bound to PLL. The appropriate amount of PLL (1 mg.mL⁻¹) was dissolved in a Na₂CO₃ solution (0.1 M, pH = 8.5). Rhodamine (Rho) at 2 mg.mL⁻¹ was dissolved in DMSO. We used a ratio of 1 mg of rhodamine for 50 mg of PLL. The solutions were gently mixed at room temperature during 2 h. PLL^{Rho} was purified by dialysis during 3 days, and then the absence of free rhodamine in the solution was checked by UV spectroscopy (Hermanson 1996).

2.2. Build-up of polyelectrolyte multilayers

Multilayer films were built with an automated dipping robot (Riegler & Kirstein GmbH, Berlin, Germany) on silica slides (12 mm diameter, VWR International, Strasbourg, France) or on silicone sheets, 254 μm thick (Specialty Manufacturing Inc. SMI, Saginaw, Michigan, USA). Silica slides were pre-treated with a 10 mM SDS solution for 15 min followed by HCl 0.1 M for 15 min and then rinsed with pure water. Silicone sheets of $18 \times 18 \text{ mm}^2$ were previously cleaned with ethanol and then extensively rinsed with water. These substrates were first dipped in a PLL solution for 10 min. Then, a rinsing step was performed by dipping them for 5 min in a 0.15 M NaCl/10 mM Tris solution. The polyanion HA was then deposited in the same manner. The build-up process was pursued by the alternated deposition of PLL and HA. After deposition of n bilayers, the film is denoted $(\text{PLL}/\text{HA})_n$. The enzyme alkaline phosphatase (fluorescently labelled or not) was deposited on the PLL/HA film during 30 min. at a given stage of the build-up process and then a rinsing step was performed for 10 min. The capping layers $(\text{PDADMA}/\text{PSS})_n$ were deposited on the enzymatic PLL/HA reservoir according to the same layer-by-layer protocol. Three different adsorption times for PDADMA and PSS polyelectrolytes were respectively achieved : 1 minute (short time), 4 minutes (usual time), and 10 minutes (long time). The suitable adsorption time will be specified in the text if it corresponds to short, usual or long time (1, 4 or 10 min.).

2.3. Quartz Crystal Microbalance (QCM)

The build up process of the multilayered films was monitored *in situ* by quartz crystal microbalance-dissipation using the axial flow chamber QAFC 302 (QCM-D, D300, QSense, Götenborg, Sweden). The QCM technique consists of measuring the change of the resonance frequency (Δf) and the dissipation (ΔD) of a quartz crystal induced by polyelectrolyte adsorption on the crystal, in comparison with the crystal in contact with the rinsing solution. The crystal used here is coated with a 50 nm thick SiO_2 film deposited by active sputter-coating. The quartz crystal is excited at its fundamental frequency (5 MHz), and the measurements are performed at this frequency. Changes in the resonance frequency, Δf , and in the dissipation factor, ΔD , during each adsorption step are measured. A shift in Δf can be associated, in first approximation, with a variation of the mass adsorbed to the crystal. To characterize the film at a given build-up step, only the frequencies and dissipations at the end of the rinsing steps following the exposure to either polycation or polyanion, were taken into consideration. The measurement methodology has been addressed in detail elsewhere and is applied in the present work.

2.4. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) observations were carried out with a Zeiss LSM 510 microscope using a $\times 40$ objective (Zeiss Achroplan) with $0.4 \mu\text{m}$ z -section intervals. FITC fluorescence was detected after excitation at $\lambda = 488 \text{ nm}$ with a cut-off dichroic mirror of 488 nm and an emission band-pass filter of $505\text{-}530 \text{ nm}$ (green emission). Rhodamine fluorescence was detected after excitation at $\lambda = 543 \text{ nm}$, dichroic mirror of 543 nm , and an emission long pass filter of 585 nm (red emission). Virtual vertical sections can be visualized, hence allowing the determination of the thickness of the film. All the experiments are performed in liquid condition ($0.15 \text{ M NaCl}/10 \text{ mM Tris}$, $\text{pH} = 7.4$) and the multilayer films were never dried.

2.5. Measurement of enzymatic activity

The alkaline phosphatase activity of the enzymatic multilayer films deposited on glass slides or silicone sheets was detected by using two different enzymatic substrate molecules : p-nitrophenylphosphate (PNP, Sigma Aldrich, P-4744) and fluorescein di-phosphate, tetraammonium salt (FDP, Invitrogen, F-2999).

P-nitrophenylphosphate (PNP) is used to measure the enzymatic activity of the biocatalytic multilayer in solution. The PNP solution ($200 \mu\text{L}$) at $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in $0.15 \text{ M NaCl}/10 \text{ mM Tris}$ buffer ($\text{pH} = 8.5$) is brought in contact with the film and the formation of p-nitrophenol (PN) and a phosphate ion by enzymatic conversion of PNP, is followed by spectrophotometry UV/Vis at $\lambda = 405 \text{ nm}$ corresponding to the maximum absorption of the PN.

Fluorescein di-phosphate, tetraammonium salt (FDP, Invitrogen, F-2999) solution ($200 \mu\text{L}$) at $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in $0.15 \text{ M NaCl}/10 \text{ mM Tris}$ buffer ($\text{pH} = 7.4$) is used to detect the enzymatic reaction within the biocatalytic multilayer and also to measure the enzymatic activity in solution with a higher detection than PNP. Fluorescein di-phosphate (FDP) is a colorless and nonfluorescent alkaline phosphatase substrate. The sequential enzymatic hydrolysis of the two phosphate substituents yields weakly fluorescent fluorescein monophosphate followed by strongly fluorescent fluorescein (excitation/emission = $490/515 \text{ nm}$). This fluorescence was then visualized by the confocal microscope and the measure of the fluorescence intensity was possible by using the confocal microscope as a fluorimeter. Thereby, the confocal microscope allowed the visualization and the detection of the enzymatic activity even if a background fluorescence of FDP solutions is primarily due to

fluorescein mono-phosphate or fluorescein initially present at low quantity in the commercial product.

2.6. Stretching device

A homemade stretching device allowed the elongation of silicone substrates directly under the confocal microscope (Mertz et al. 2007). The stretching degree (%) is defined by the parameter $\alpha = (l-l_0)/l_0$ where l_0 and l correspond respectively to the initial and to the stretched length of the silicone sheet. The stretching motion is achieved by a precision electric motor at a velocity of 0.74 mm.s^{-1} . All the stretching experiments were performed at ambient temperature in liquid conditions.

3. Results and discussion

3.1 Design of enzymatic reservoir/barrier systems

PLL/HA enzymatic reservoirs

The buildup process of PLL/HA multilayer films and the embedding of the enzymes was monitored *in situ* by QCM (**Figure 1**). Alkaline phosphatase (AP) is negatively charged at pH = 7.4 and was thus deposited on a PLL ending film [(PLL/HA)₅/PLL]. The results and the kinetics of AP adsorption (**see insert of Figure 1**) clearly indicate that a huge amount of enzyme was deposited on or within the film. The subsequent depositions of (PLL/HA) layers indicate a regular shift in $-\Delta f/v$ proving that the film still grows and that the enzyme can be embedded. Incubation of the enzyme during the sequential deposition of the multilayer can lead to two different mechanisms :

- i) Adsorption of a single enzyme layer as it was the case for protein A deposited in poly(L-lysine)/poly(L-glutamic acid) film (Jessel et al. 2003) ;
- ii) Diffusion of the enzyme through the film section as it was the case with paclitaxel deposited in PLL/HA film. In this case, the entire film acts as a reservoir for the bioactive molecule (Vodouhé et al. 2006).

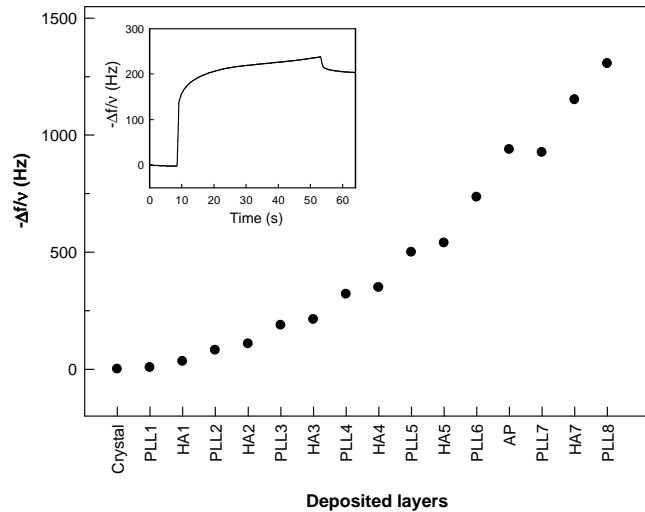


Figure 1. QCM measurements monitoring the changes in the frequency shifts $-\Delta f/v$ (monitored at 5 MHz) during the buildup of a PLL/HA multilayer film and the adsorption of alkaline phosphatase (AP). Evolution of the frequency shifts as a function of time during AP deposition on a $(\text{PLL}/\text{HA})_5/\text{PLL}$ multilayer film is detailed in the inset.

To determine which mechanism is involved in the present case, confocal experiments were performed with thick PLL/HA films functionalized with alkaline phosphatase labelled with rhodamine (AP^{Rho}) or with fluorescein-5-isothiocyanate (AP^{FITC}) (**Figure 2.a and 2.b** respectively). PLL/HA multilayers correspond to films of 5 to 7 micrometers thick after deposition of thirty bilayers. Deposition of AP^{Rho} or AP^{FITC} on $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}$ multilayer films clearly indicates that the enzymes diffuse through the whole film section and are homogeneously distributed over the whole volume of the film. Thus, PLL/HA films act as reservoirs for alkaline phosphatase.

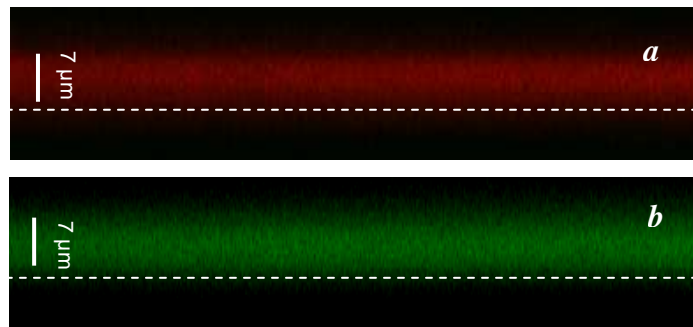


Figure 2. Confocal microscope section (x,z) images of $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_2$ (a) and $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{FITC}}/(\text{PLL}/\text{HA})_2$ (b) multilayer films deposited on silicone sheets. The total thicknesses of the films are around $7 \mu\text{m}$ and image sizes are $23 \times 105 \mu\text{m}^2$.

The biocatalytic activity of such enzymatic reservoirs was evidenced both in solution and inside the film by using two different enzymatic substrates : PNP and FDP. First, PNP was used in order to measure the enzymatic activity in solution. The PNP solutions were brought in contact with the (PLL/HA)₃₀/PLL/AP/(PLL/HA) film and the formation of PN by enzymatic hydrolysis of PNP was followed by UV/Vis spectrophotometry at $\lambda = 405$ nm corresponding to the maximum absorption of PN. The absorbance A of the supernatant was measured as a function of time t and the resulting graph $A = f(t)$ shows a linear increase of A with time (**Figure 3**). These results indicate that the enzyme remains active when embedded in the PLL/HA film with a constant activity near to 0.2 u.A/h (corresponding to the slope of the linear profile) over a period of at least 24 hours, as addressed by the linear profile. The same experiments without enzyme embedded in the film were carried out and they showed non-significant values of A (below the limit of detection) corresponding to the absence of PN in the supernatant.

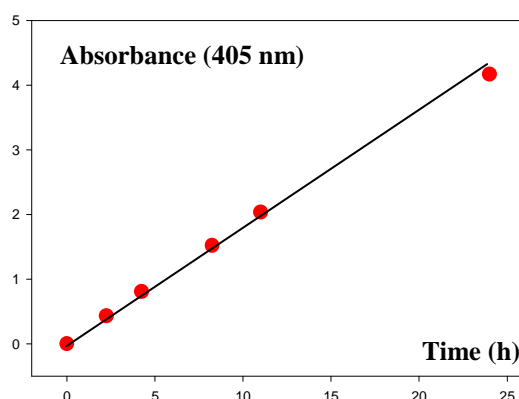


Figure 3. Spectrophotometry UV/Vis experiments monitoring the absorbance measurements as a function of the time at $\lambda = 405$ nm of a PNP solution brought in contact with an enzymatic multilayer reservoir (PLL/HA)₃₀/PLL/AP/(PLL/HA)₁ during 24 hours.

Next, the biocatalytic activity within the enzymatic PLL/HA reservoir was detected by means of confocal microscopy. The FDP solutions were brought in contact with the PLL/HA films functionalized with rhodamine labelled alkaline phosphatase. As soon as the FDP molecules were deposited, a huge green fluorescent band corresponding to the formation of a great amount of fluorescein molecules became visible and superposed on the red fluorescent band corresponding to the labelled enzymatic PLL/HA reservoir (**Figure 4**). These observations indicate that the enzymatic reaction occurs very quickly inside the reservoir and show also that the concentration of fluorescein is much higher in the PLL/HA film than in solution. This demonstrates that PLL/HA constitutes a reservoir for fluorescein molecules.

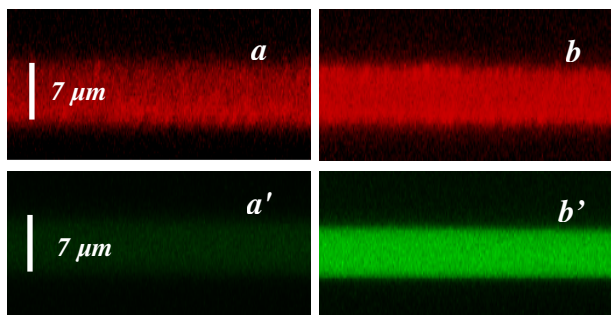


Figure 4. Confocal microscope section (x,z) images of a $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_2$ film brought in contact with a FDP solution (a and a') $t=0$, (b and b') $t= 5$ minutes. Film sections are observed (a and b) in the red channel, and (a' and b') in the green channel.

PDADMA/PSS multilayers capping PLL/HA enzymatic reservoirs

In a previous study, we have demonstrated that PDADMA/PSS multilayers capping PLL/HA films play the role of barriers towards the diffusion of green fluorescently labelled PLL chains (PLL^{FITC}). Here, preliminary studies should check that PDADMA/PSS multilayer films act as barriers towards PLL^{FITC} chains diffusion, even when they cap PLL/HA films functionalised with alkaline phosphatase. Then, we will investigate the permeability of $(\text{PDADMA}/\text{PSS})_5$ cappings towards the FDP substrate which has a very low molecular weight compared to PLL^{FITC} .

For this purpose, a $(\text{PDADMA}/\text{PSS})_5$ multilayer was deposited on the PLL/HA reservoir of AP^{Rho} leading to a $(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/(\text{PDADMA}/\text{PSS})_5$ film. This system was then brought in contact with solutions containing fluorescently labelled PLL chains (PLL^{FITC}). The capping effectively played the role of a barrier that prevents PLL diffusion from the bulk into the enzymatic PLL/HA reservoir (**Figure 5.a**). However, when a FDP solution was incubated with this film, we observed a huge and fast formation of green fluorescence within the whole reservoir, thus indicating the conversion of FDP into fluorescein, catalyzed by the embedded enzymes (**Figure 5.b**). This reaction evidences the permeation of FDP molecules through the PDADMA/PSS capping made of five bilayers.

These results strongly suggest that a $(\text{PDADMA}/\text{PSS})_5$ multilayer behaves as a barrier with a given size exclusion. When the size of the permeate molecule is higher than the exclusion size, there is no permeation through the capping which then behaves as a barrier. But, when the size of the molecule is smaller than the exclusion size, the permeation occurs and the capping doesn't behave as a barrier any longer. This exclusion size is probably related to a specific local structuration of the polyelectrolyte chains at the interface between the

PLL/HA reservoir and the PDADMA/PSS capping. It is expected that this structuration depends strongly upon the thermodynamic and kinetic parameters of the different complexes ((PLL/PSS) or (HA/PDADMA)) formed between the polyelectrolytes, when PSS and PDADMA are deposited on the PLL/HA reservoir. Moreover, the presence of the enzyme may strongly influence the structuration of this interface.

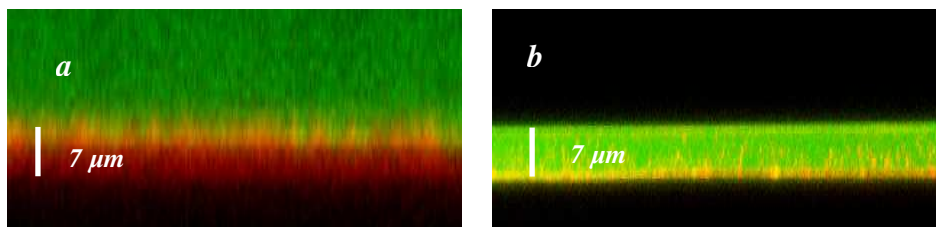


Figure 5. Confocal microscope section (x,z) images of $(\text{PLL/HA})_{15}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL/HA})_{15}/(\text{PDADMA/PSS})_5$ brought in contact (a) with PLL^{FITC} solution and (b) with FDP solution.

The control of these thermodynamic and kinetic parameters of adsorption is probably fundamental to determine the permeability behaviour of the capping and then the exclusion size.

3.2 Parameters controlling the permeation of fluorescein di-phosphate (FDP)

In order to render the PDADMA/PSS capping impermeable towards the small enzymatic substrate molecule FDP, two experimental parameters directly involved in the build-up process of the reservoir/barrier system have been studied. We show that, either by increasing the number of layers or by decreasing the adsorption time of the polyelectrolytes constituting the PDADMA/PSS capping, it becomes possible to control the permeability of the barriers towards FDP molecules. We will also address the ability to trigger the permeation of FDP molecules through a PDADMA/PSS barrier by using a mechanical stretching.

Influence of the number of layers constituting the capping (n = 5, 10, 20)

Previously (3.1), we observed that a capping made of $n = 5$ bilayers was permeable towards FDP molecules. This was evidenced by the strong band of green fluorescence that appeared in the reservoir which was due to the FDP hydrolysis into fluorescein as soon as FDP solution was brought in contact with the film (**Figure 5.b**). Then, we used cappings constituted of a larger number of bilayers ($n = 10$ and $n = 20$). When the FDP solutions were brought in contact with such films, no fluorescence, even weak, appeared anymore within the reservoir. **Figures 6.a and 6.b** depict the red fluorescence band due to the PLL/HA reservoir

labelled by AP^{Rho} and above it, the slight green fluorescent solution corresponding to the weak fluorescence background of the FDP solution. Thus, the permeability of the PDADMA/PSS capping could be strongly decreased by increasing the number of bilayers until it behaves as an efficient barrier towards the diffusion of FDP molecules.

This behaviour may be attributed to a decrease of the polymeric network porosity when the number of bilayers of the capping is increased. At the reservoir/barrier interface, the complexation process between PDADMA and PSS chains might be disturbed due to interactions respectively with HA and PLL coming from the reservoir underneath. This process should occur during deposition of the first PDADMA and PSS layers. This probably leads to a significant porosity and consequently to a major permeability allowing the permeation of FDP molecules through the capping within the reservoir. When a higher number of PDADMA and PSS bilayers is deposited on the capping, less HA and PLL chains coming from the reservoir are able to diffuse and to form complexes with PDADMA and PSS. This may lead to a weaker porosity, and thus prevent the permeation of FDP molecules through PDADMA/PSS from the bulk towards the reservoir.

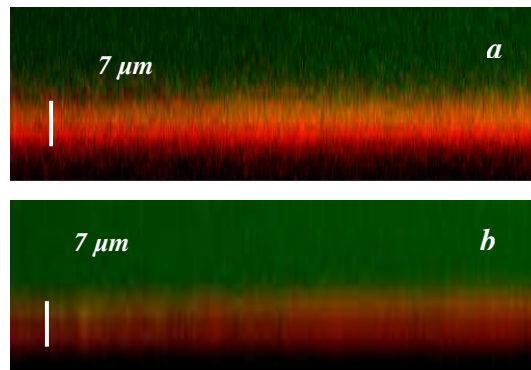


Figure 6. Confocal microscope section (x,z) images of a $(PLL/HA)_{15}/PLL/AP^{Rho}/(PLL/HA)_{15}/(PDADMA/PSS)_n$ film brought in contact with FDP solution (a) $n = 10$, (b) $n = 20$.

Influence of the adsorption time of the polyelectrolytes constituting the capping

We also investigated the permeation of FDP molecules through a $(PDADMA/PSS)_5$ capping built by varying the adsorption times of the polyelectrolytes constituting this capping. Only the adsorption time of PDADMA and PSS were varied, the enzymatic PLL/HA reservoir being built as previously described. A PDADMA/PSS capping with five bilayers was studied with 10 minutes (long adsorption time), 1 minute (short adsorption time) and 4 minutes (usual adsorption time). For 10 min. and 4 min. adsorption times (long and usual times), the cappings depict non-homogeneous structures with numerous complexes and

aggregates located on the surface, particularly for long adsorption times (**Figure 7.a and b**). As soon as FDP molecules were added to these non-homogeneous PEM systems, the formation of fluorescein was observed in the whole reservoirs (**Figure 7.a' and b'**). This indicates the strong porosity of such poorly built cappings. As far as short adsorption time (1 min.) is concerned, the capping depicts a very homogeneous interface at the resolution of the confocal microscope (**Figure 7.c**). When a FDP solution was brought in contact with this barrier, no infiltration of FDP molecules occurred within the reservoir (**Figure 7.c'**) unlike the long and usual adsorption times. This barrier effect towards FDP is evidenced by the clear separation of the two fluorescence strips observed between the enzymatic PEM system and the solution. These results demonstrate that the kinetic of adsorption is a fundamental parameter determining the structuration of the interface between the reservoir and the barrier. Indeed, the addition of PSS chains followed by PDADMA chains onto a PLL/HA multilayer film may lead to numerous exchange phenomena at the interface between the reservoir and the barrier. These exchange phenomena correspond for example to the formation of (PLL/PSS) complexes that are probably more thermodynamically favourable than (PLL/HA) complexes. Thus, the short adsorption kinetic may limit these exchanges at the reservoir/barrier interface and then may improve the cohesion of PDADMA/PSS barriers .

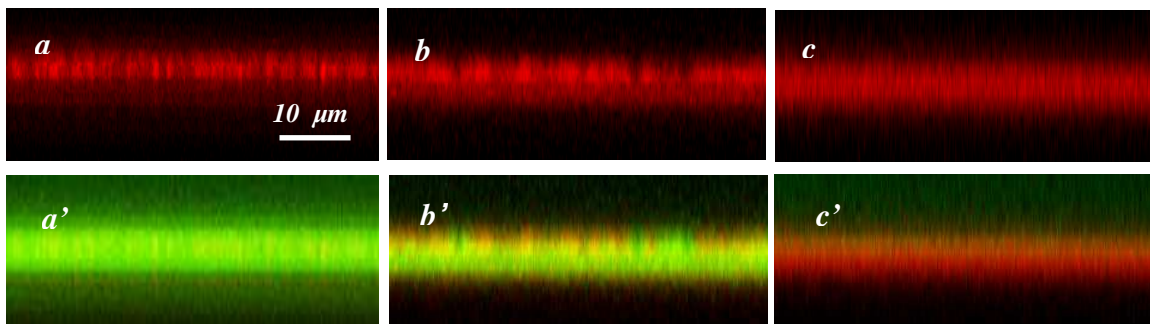


Figure 7. Confocal microscope section (x,z) images of $(\text{PLL/HA})_{15}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL/HA})_{15}/(\text{PDADMA/PSS})_5$ films for different adsorption times of the polyelectrolytes constituting the PDADMA/PSS capping (a) 10 min. (long time), (b) 4 min. (usual time), (c) 1 min. (short time). These multilayers (a,b,c) were respectively brought in contact with a FDP solution (a', b', c').

Thus, we have shown that either by increasing the number of layers or by decreasing the adsorption time of the polyelectrolytes constituting the PDADMA/PSS capping, it becomes possible to design efficient PDADMA/PSS barriers towards FDP molecules.

Influence of the mechanical stretching applied on the barrier : enzymatic reactions triggered by mechanical stretching

In a previous study, we demonstrated that PDADMA/PSS barriers deposited on PLL/HA reservoirs can be opened by mechanical stretching triggering then a diffusion process of PLL^{FITC} chains from the bulk to the reservoir through the barrier. This outlined that the application of a given mechanical stretching was a way to switch the (PDADMA/PSS)_n barriers from an impermeable to a permeable state towards PLL chains. Here, two different enzymatic reservoir/barrier systems initially non-permeable towards FDP molecules, were deposited on silicone substrates and then stretched at a given stretching degree. The observations were investigated by means of confocal microscopy.

The first system used was an enzymatic reservoir/barrier system built in usual conditions (usual time of adsorption for PDADMA and PSS, 4 minutes) with a capping barrier constituted by 10 (PDADMA/PSS) bilayers. We have shown in the previous paragraph that this system is an efficient barrier towards FDP molecules due to the sufficient number of bilayers deposited in the capping (**Figure 6.a or 8.a**). As soon as a stretching degree of 70% was applied on this PEM system, a huge green fluorescence located inside the whole reservoir and corresponding to a large conversion of FDP molecules into fluorescein molecules appeared immediately, indicating that the enzymatic reaction was triggered within the PLL/HA reservoir (**Figure 8.a'**). Hence this mechanical triggering allowed the enzyme and substrate molecules, previously separated by the barrier, to come in contact together within the reservoir inducing thereby the biocatalytic reaction. These observations indicate that the exclusion size of such a barrier has been enhanced by the application of a mechanical stretching, allowing then the diffusion of FDP molecules through the more porous structure. It was not the purpose of the study here to determine the evolution of the exclusion size by increasing the stretching. However, this would be a way to finely control the exclusion size of these barriers.

The second system studied was an enzymatic reservoir/barrier system, with a PDADMA/PSS barrier constituted by $n = 5$ bilayers built-up with short adsorption times (1 min.) instead of the usual times (4 min.). As indicated in the previous paragraph, the system was shown to be non permeable to FDP because of a short adsorption kinetic limiting polyelectrolytes exchanges phenomena at the reservoir/barrier interface (**Figure 7.c' or 8.b**). Unlike *the first reservoir/barrier system* studied above (built-up in usual conditions with $n = 10$ bilayers) where the mechanical stretching induced the triggering of the enzymatic

conversion inside the reservoir, here the enzymatic reaction was only observed at the interface between the barrier and the solution by the application of a stretching degree up to 150% (**Figure 8.b'**). As soon as the stretching was applied, a thin line of strong fluorescence located at this interface appeared (**Figure 8.b'**), corresponding to a high local concentration of fluorescein molecules very close to or probably adsorbed in the barrier. These observations indicate that FDP is converted into fluorescein at this interface and no fluorescein molecule is produced or reaches the enzymatic reservoir (as suggested by the absence of a huge green fluorescence within the reservoir). It seems thus that some AP molecules are also present within the barrier probably adsorbed or complexed with PDADMA or PSS polyelectrolytes chains. The ability of these systems to induce interfacial enzymatic reaction in response to mechanical stimuli strongly suggests that the barrier possesses buried enzymatic active sites that are exhibited under stretching.

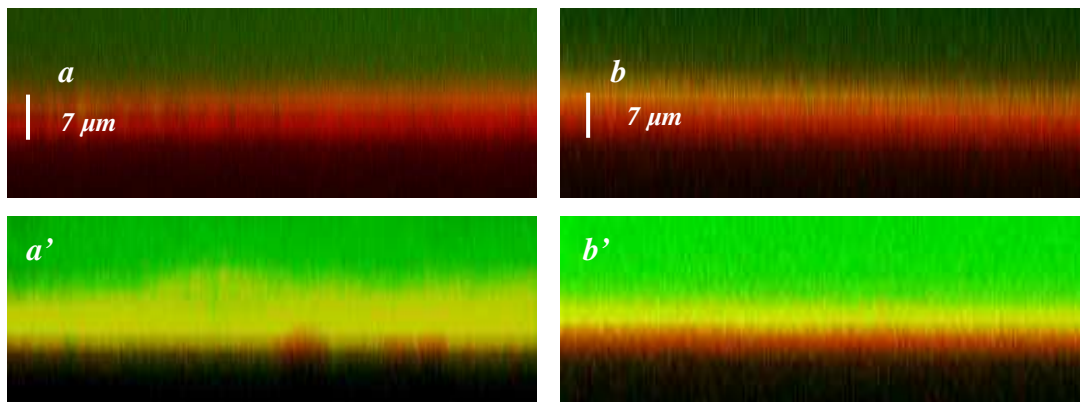


Figure 8. (a and a') Confocal microscope section (x,z) images of a $(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/(\text{PDADMA}/\text{PSS})_{10}$ PEM system with a barrier containing 10 bilayers built-up with usual adsorption time (4 min.) and brought in contact with a FDP solution (a) at the non-stretched state, (a') at a stretching degree of 70%. (b and b') Confocal microscope section (x,z) images of $(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/(\text{PDADMA}/\text{PSS})_5$ PEM system with a barrier containing 5 bilayers built-up with short adsorption time (1 min.) and brought in contact with a FDP solution (b) at the non-stretched state, (b') at a stretching degree of 100%.

Conclusion

To summarize, we designed enzymatic reservoir/barrier systems made of PEM films by capping a PLL/HA reservoir containing alkaline phosphatase with a PDADMA/PSS film. By adjusting experimental parameters such as the number of layers and deposition times of the polyelectrolytes constituting the PDADMA/PSS capping, we tailored the permeability properties of the capping to render it impermeable to FDP substrate.

Thus, two different reservoir/barrier systems, initially non-permeable towards FDP molecules were achieved and then stretched at a given stretching degree. *The first system* was built-up with an enhanced number of (PDADMA/PSS) bilayers deposited with a usual adsorption time ($n= 10, t= 4 \text{ min.}$), whereas the *second one* was designed with a usual number of (PDADMA/PSS) bilayers deposited with a short adsorption time ($n= 5, t= 1 \text{ min.}$). In contrary to the *first system* where the enzymatic reaction occurred *within the reservoir*, the *second system* allowed the conversion of FDP in fluorescein *at the barrier/solution interface*. These behaviour differences correspond to different mechanisms of barrier opening under mechanical stretching. Whereas the first mechanism seems to be related to an increase of exclusion size in the barrier by mechanical stretching allowing thus the entire permeation of small sized FDP molecules, the second mechanism seems to be related to an enhancement of enzymatic sites exhibition. This latter case may constitute a first example of enzymatic cryptic site substrate where the active molecule is embedded within the substrate and exposed on the surface once the stretching is applied. This opens the route to surfaces bearing adjustable active sites density with mechanical stretching.

4.2 Application à la biocatalyse réversiblement modulée

4.2.1 Résumé

Dans cette partie (chapitre 4-2), nous étudions en détail la biocatalyse induite par l'application de stimuli mécaniques sur des multicouches enzymatiques réservoir/barrière. Nous nous focalisons sur les systèmes à *réaction interfaciale* introduits dans la partie précédente (chapitre 4-1), compte tenu de leur tendance à se comporter comme des surfaces à « sites cryptiques ». Ce type de systèmes, inspirés par les protéines impliquées dans la mécano-transduction telles que la fibronectine, possèdent à l'état natif des sites actifs enfouis alors que sous l'action de forces mécaniques, ces sites sont exposés vers l'extérieur.

Tout d'abord, nous avons masqué l'activité catalytique de la phosphatase alcaline en construisant des systèmes enzymatiques réservoir/barrière (PLL/HA)₁₅/AP/(PLL/HA)₁₅/(PDADMA/PSS)₆. L'absence de fluorescence détectée lors de l'ajout de FDP, confirme l'imperméabilité de la barrière, rendant les molécules substrats inaccessibles à l'enzyme enfouie dans le réservoir. Ces films sont déposés sur des feuilles de silicone, mis au contact de la solution de FDP et sont soumis à des contraintes mécaniques. Une fois un étirement de 60-70% atteint, un fort pulse de fluorescence rapide et intense se produit à l'interface barrière/solution. Nous avons alors étudié ce phénomène en mesurant les intensités de fluorescence en solution, en fonction du taux d'étirement. Ces analyses révèlent que pour des valeurs inférieures à ce taux critique d'étirement de 70%, une faible évolution de l'intensité de fluorescence est observée. Au delà de cette valeur critique, l'intensité de fluorescence atteint un très haut niveau et l'activité biocatalytique augmente graduellement avec le taux d'étirement. Ces systèmes permettent donc de transformer un signal mécanique en un signal biochimique et même de moduler la biocatalyse avec le taux d'étirement mécanique.

La réversibilité d'une telle catalyse a également été étudiée. Nous observons qu'au retour à l'état non-étiré, après une relaxation d'une demi-heure, la surface retrouve une faible activité catalytique. Puis, par application d'un nouvel étirement mécanique sur ce système relaxé, un nouveau saut de fluorescence plus léger que le précédent apparaît. Ces observations suggèrent que le retour à l'état non-étiré correspond à un ré-enfouissement des sites enzymatiques après leur exposition à un certain taux d'étirement. Le phénomène de relaxation se traduit par des oscillations mécaniques dans la barrière (qui s'amortissent au bout d'une demi-heure) ce qui semble conforter le mécanisme proposé. Cependant, cette réversibilité n'est que partielle : il est probable que les sites enzymatiques soient inhibés par la présence de molécules de fluorescéine adsorbées dans la barrière.

4.2.2 Projet Article 4

*“Cryptic Site Surfaces Inspired by Mechanotransduction Proteins
for Biocatalysis Modulation”*

Abstract

Fibronectin, like other proteins involved in adhesion or mechanotransduction, has the ability to exhibit reversibly active sites under mechanical forces. Such cryptic sites, that are buried inside the protein structure in its native state, become unmasked under applied force and induce biochemical reactions. We report in this article a family of surface coatings which mimic this behavior and allow to modulate chemical reactions under surface stretching. Enzymes are embedded in exponentially growing polyelectrolyte multilayers which are deposited on silicone sheets and are capped with a polyelectrolyte multilayer barrier. In the absence of stretching, the enzymes are inactive. Once a critical stretching degree is reached, the embedded enzymes are exhibited and the enzymatic reaction takes place at the surface. The reaction rate increases with the stretching degree and stops when the substrate is turned back in its unstretched state. The reversibility of the process renders such coatings comparable to synthetic analogs of mechanotransduction proteins.

Many proteins involved in the mechanotransduction share the ability to exhibit specific active peptide sequences when denatured or extended by force. It is now admitted that force regulated exposure of cryptic sites represents an effective way to convert a mechanical force into a biochemical process either by exposing binding sites, phosphorylation sites or regions that display enzymatic activity only when unmasked by forces. However, in this later case it has not been clearly established whether the force can regulate the enzymatic activities of the cryptic sites. Single molecule experiments revealed a great diversity of ways into which cryptic sites are exhibited, including conformational changes of loop-exposed molecular recognition sites along complex unraveling pathways. Fascinated by the solutions that nature has found to transform mechanical forces into chemical processes and with the goal of creating mechanically responsive surfaces, we investigated whether reservoir/barrier polyelectrolyte multilayer architectures can be used to create cryptic site surfaces that induce an enzymatic reaction by applying a mechanical force, namely by surface stretching. Polyelectrolyte multilayers are a generic term for films constructed by the alternate deposition

of polyanions and polycations. There exist two kinds of polyelectrolyte multilayers : there are films whose thickness increases exponentially with the number of deposition steps. These films, which can be used as reservoirs for active compounds such as enzymes, behave more or less as liquids. Moreover, it is known that enzymes that are embedded in these films keep their enzymatic activity and that polyelectrolytes and proteins diffuse within these multilayers. There exist also multilayers whose thickness increases linearly with the number of deposition steps. Linearly growing films are much denser than exponentially growing ones. When deposited on top of exponentially growing films, they can act as barriers that prevent the diffusion of polyelectrolytes and even of smaller ions or molecules between the solution and the reservoir. Recently, we showed that barriers capping an exponentially growing multilayer which is deposited on a silicone sheet can be opened reversibly by stretching the substrate. Once a critical stretching degree, that depends upon the number of layers constituting the barrier, is reached, nano-holes appear which allows polyelectrolytes to diffuse into the reservoir. These holes close again when the substrate is brought back to its initial non stretched state.

$(\text{PLL}/\text{HA})_n$ (PLL : poly-(L-lysine), HA : hyaluronic acid), exponentially growing multilayers, are used as reservoirs and are capped with the linearly growing multilayer $(\text{PDADMA}/\text{PSS})_m$ (PDADMA : poly(diallyldimethylammonium) ; PSS, poly(styrene sulfonate)). AP (AP : alkaline phosphatase) a dephosphorylation enzyme, interacting with FDP (fluorescein di-phosphate) catalyzes the reaction that leads to the production of two phosphate ions and a fluorescein molecule which is detected by fluorescence. It is used here as a model enzymatic reaction. AP is embedded in the $(\text{PLL}/\text{HA})_n$ reservoir during its buildup by using rhodamin labeled AP and the reservoir becomes entirely and homogeneously fluorescent as observed by confocal laser scanning microscopy (**Figure 1**).



Figure 1. Confocal microscope section (x,z) image of $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_2$ multilayer film deposited on a silicone sheet. The dotted line indicates the interface between the silicone sheet and the multilayer film.

This indicates that AP diffuses in the whole PLL/HA reservoir. The multilayer architecture is built on a silicone sheet used for its high elasticity. When a FDP solution is brought in contact with a $(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}/\text{AP}/(\text{PLL}/\text{HA})_{15}$ multilayer without PDADMA/PSS capping, the film becomes entirely and homogeneously green (**Figure 2.A**). AP thus remains active in the multilayer, as expected, and FDP and/or fluorescein diffuse in the entire PLL/HA reservoir. On the other hand, when a FDP solution is brought in contact with a $(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}/\text{AP}/(\text{HA}/\text{PLL})_{15}/(\text{PDADMA}/\text{PSS})_6$ film (reservoir/barrier system) in the non-stretched state, a very weak fluorescence (corresponding to the weak background of the FDP commercial solution) is observed above the barrier (**Figure 2.B**) : the embedded enzymes remain inactive and FDP does not diffuse through the $(\text{PDADMA}/\text{PSS})_6$ multilayer. This latter thus acts as a barrier for both FDP and AP.

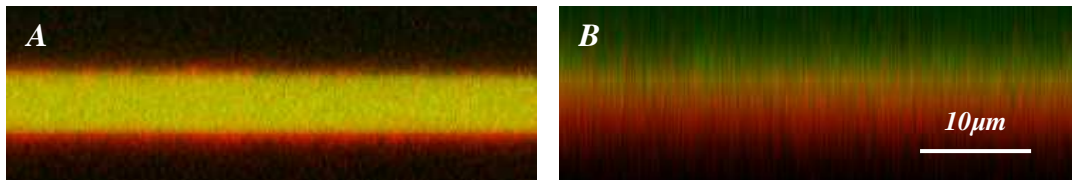


Figure 2. Confocal microscope section (x,z) images of (A) a $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_2$ multilayer film, (B) $(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/(\text{PDADMA}/\text{PSS})_6$ reservoir/barrier system, both brought in contact with a FDP solution.

The silicone substrate is then stretched and visualized under the confocal microscope. Once a critical stretching degree of 60-70% is reached, a first rapid and strong burst of the fluorescence in solution, takes place (**Figure 3**). As for mechanotransduction proteins, the active sites become accessible under stretching. Evolution of the fluorescence intensity in solution is measured as a function of time for several stretching degrees (**Figure 4**). We clearly identify on the graph the burst of fluorescence that occurs for a stretching degree of 70%, corresponding to a huge increase of the fluorescence intensity. Below this critical stretching degree, we observe a slow but continuous increase of the fluorescence indicating a weak biocatalytic activity (**Figure 4**). Above the critical stretching degree of 70%, further stretching degree increase of the substrate leads to an increase of the fluorescence production rate in solution. However, this evolution remains weak compared to the burst of fluorescence. A similar experiment investigating this latter behavior, for three different stretching degrees above a critical stretching degree of 60%, is shown in **Figure 5**. The graph shows an enhancement of the enzymatic reaction rate : more enzymatic sites become accessible upon stretching.

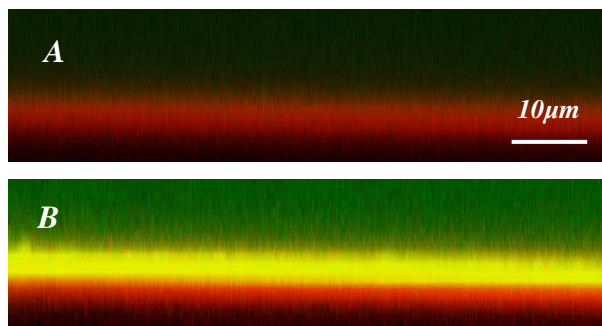


Figure 3. Confocal microscope section (x,z) images of a $(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/(\text{PDADMA}/\text{PSS})_6$ reservoir/barrier system brought in contact with a FDP solution (A) at the non-stretched state and (B) at a stretching degree of 70%.

Concomitantly to the initial burst of fluorescence when the film is stretched for the first time above the critical stretching degree, the top of the film becomes intensely green whereas the remainder of the film remains non fluorescent (**Figure 3**). The fluorescence burst corresponds to a very strong hydrolysis of FDP with a rapid diffusion of fluorescein in the solution. However, the fact that the top of the film becomes intensely green indicates that during the initial stages of the reaction, a fraction of the fluorescein remains adsorbed on or embedded in the PDADMA/PSS barrier. This corresponds to a local increase of fluorescein concentration, in the barrier, in the vicinity of the enzymatic sites. One can expect that the phosphate ion concentration also locally increases. This then leads naturally to an inhibition of fluorescein production and could explain why, after the initial burst, a plateau of green fluorescence with a slow rate appears (**Figure 4**).

In contrary to what was observed previously on $(\text{PLL}/\text{HA})_m/(\text{PDADMA}/\text{PSS})_n$ multilayers, the barrier does not open through the formation of nano-holes when stretched above the critical stretching degree. Such a formation of nano-holes would lead to a diffusion of FDP into the reservoir. This observation clearly points towards an exhibition of the enzymatic sites through the barrier which remains tight. This difference in behavior of the barrier may be due to the presence of the AP enzymes in the reservoir and at the barrier/reservoir interface. Moreover, the adsorption time of the polyelectrolytes constituting the barrier are not the same in these two cases (4 min. and 1 min.) and they influence in a different way the permeability of the barrier, as previously described (chapitre 4-1). In contrast to usual adsorption time (4 min.), a short adsorption kinetic (1 min.) of PDADMA and PSS probably improves the barrier structure by limiting polyelectrolytes exchanges phenomena at the reservoir/barrier interface.

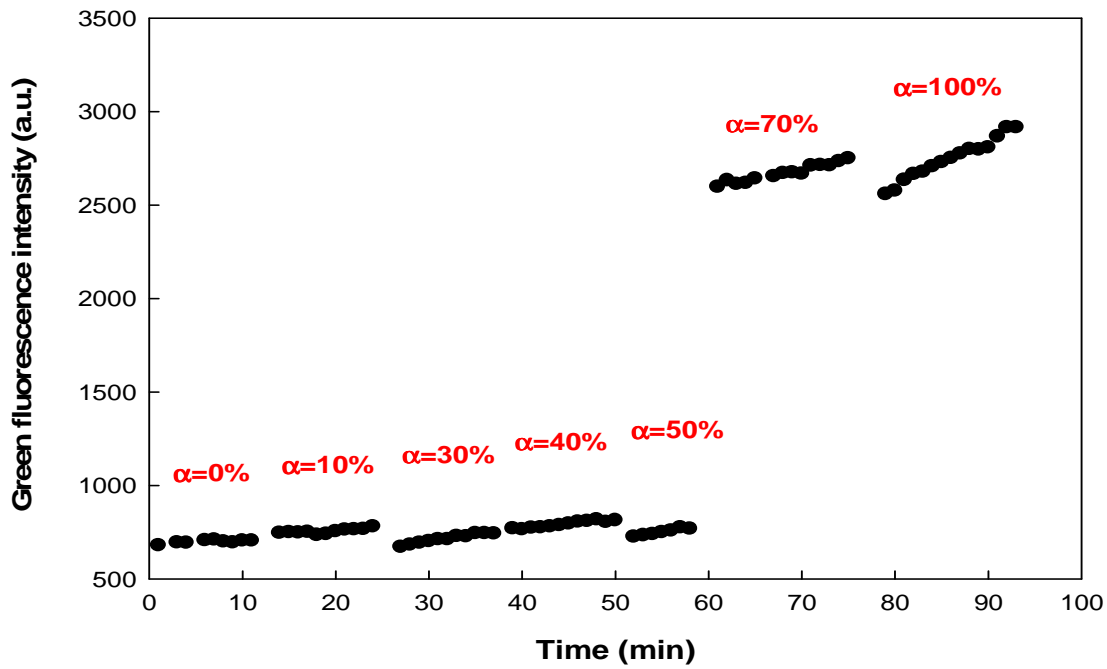


Figure 4. Fluorescence intensity measurements monitored with confocal microscope as a function of the time for a FDP solution brought in contact with an enzymatic reservoir/barrier system $(PLL/HA)_{15}/PLL/AP^{Rho}/(PLL/HA)_{15}/(PDADMA/PSS)_6$ for various stretching degrees ranging from 0% to 100%.

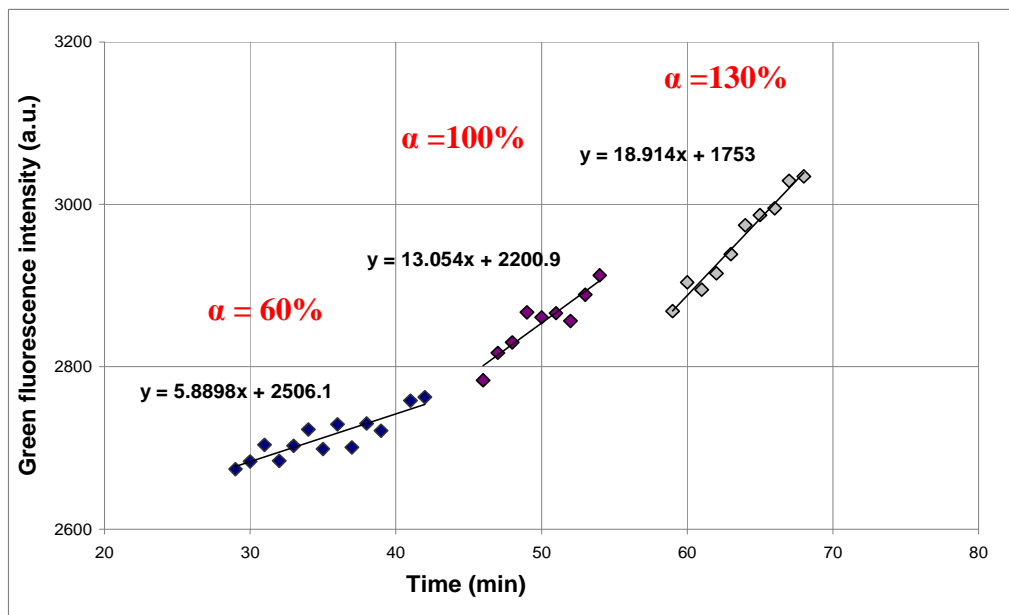


Figure 5. Fluorescence intensity measurements monitored with confocal microscope as a function of the time for a FDP solution brought in contact with an enzymatic reservoir/barrier system $(PLL/HA)_{15}/PLL/AP^{Rho}/(PLL/HA)_{15}/(PDADMA/PSS)_6$ for three stretching degrees above a critical stretching degree of 60%.

Reversibility of the unmasking process of cryptic sites is essential to modulate chemical reactions. We check reversibility by first stretching a $(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/(\text{PDADMA}/\text{PSS})_6$ film above the critical stretching degree (**Figure 6**). In contact with a FDP solution, one observes the production of fluorescein as just described. The FDP solution is then replaced by pure buffer and the substrate is turned back to its non stretched state for approximately half an hour. When this film is brought again in contact with a FDP solution, no production of fluorescein is monitored in the solution. The cryptic sites are thus masked again. When this substrate is stretched for a second time above the critical stretching degree, the hydrolysis of FDP into fluorescein takes place again immediately but only a slight burst of the fluorescence is now initially observed. Cryptic sites become thus again accessible and the system appears, at least partially reversible. The catalytic reaction can thus be switched on and off by simply stretching and non-stretching the substrate.

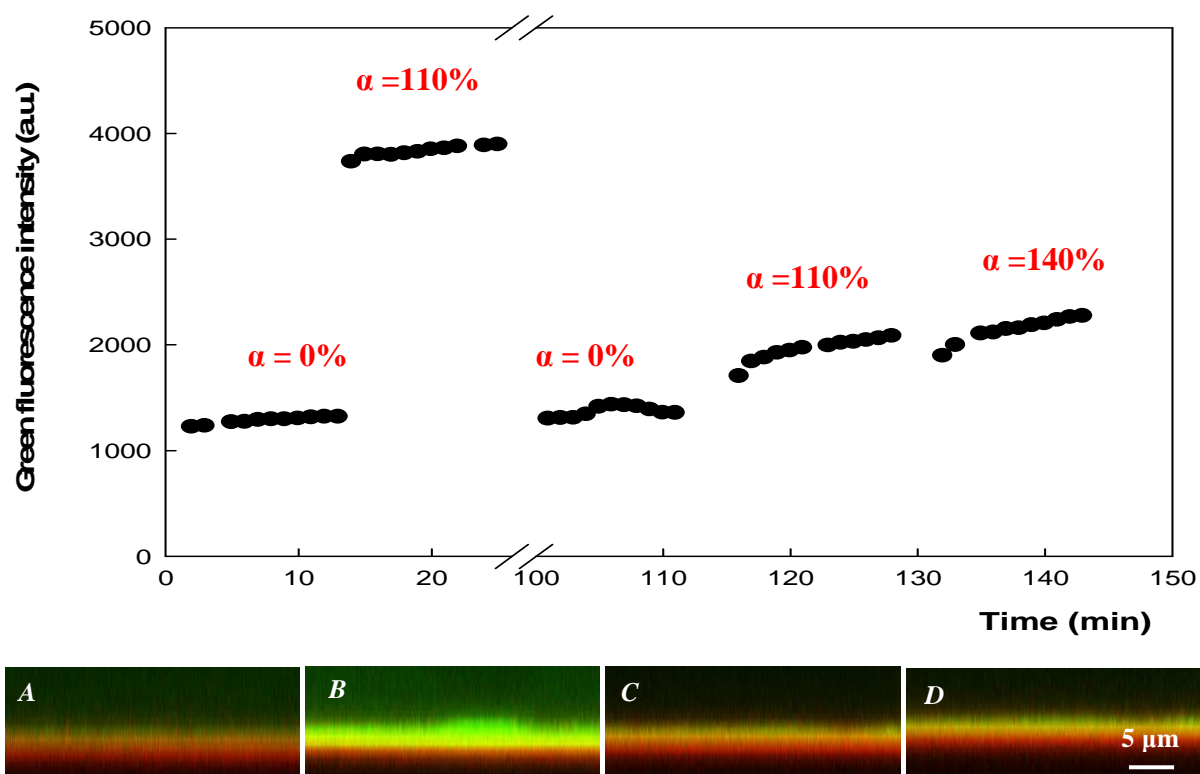


Figure 6. Evolution of the fluorescence intensity measured with CLSM as a function of the time of a FDP solution brought in contact with an enzymatic reservoir/barrier system $(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/(\text{PDADMA}/\text{PSS})_6$ during one elongation/retraction/elongation cycle. The CLSM section (x,z) images correspond to the different stretching degrees of the cycle : (A) 0% (B) 110% (C) return at the non-stretched state 0%, then (D) 110%.

We explored the reversibility of the reaction and in particular the switching off of the reaction when turning back to the unstretched state. Immediately after returning to the unstretched state, buckling is observed on top of the film (**Figure 7.A and 7.B**). This is due to the mechanical property differences of the reservoir and the barrier. Buckling disappears after approximately half an hour (**Fig 7.C**). This shows that the system evolves with time and needs of the order of one hour to mask the cryptic sites.

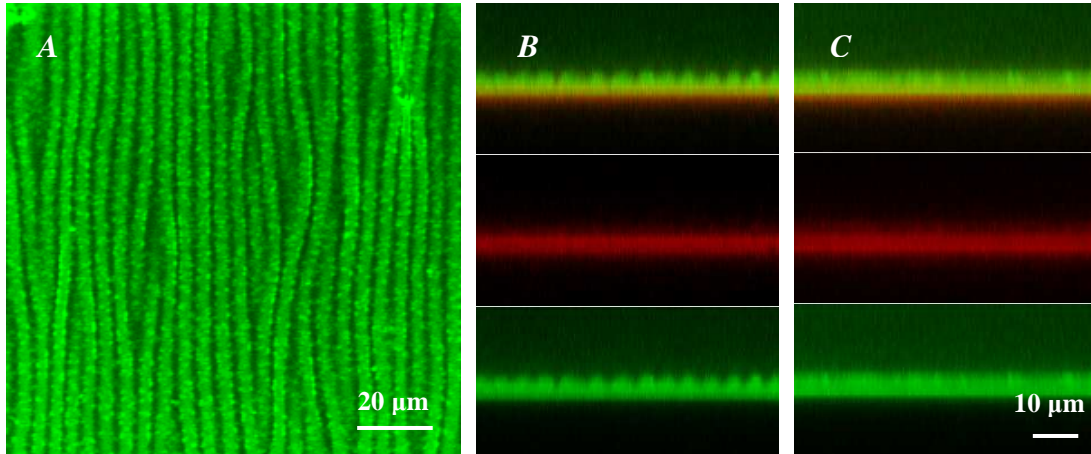


Figure 7. CLSM images of an enzymatic reservoir/barrier system $(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/(\text{PDADMA}/\text{PSS})_6$ returned at the non-stretched state after a stretching degree of 70%. (A and B) (x,y) image (A) and (x,z) cross section (B), 5 min. after being brought back to the non-stretched state. (C) (x,z) cross section, 30 min. after being brought back to the non-stretched state.

4.3 Résultats complémentaires

4.3.1 Détermination des conditions expérimentales optimales

Nous détaillons dans cette première partie complémentaire (4-3-1), la détermination de certaines conditions expérimentales, permettant la réalisation de barrières PDADMA/PSS homogènes utilisées précédemment (chapitres 4-1 et 4-2) dans les systèmes enzymatiques réservoir/barrière.

A. Choix des polyélectrolytes de "transition" entre le réservoir et la barrière

Lors de la construction d'une barrière PDADMA/PSS sur un réservoir PLL/HA fonctionnalisé par la phosphatase alcaline, nous avons étudié deux transitions possibles entre ces deux multicouches de polyélectrolytes respectant l'alternance de charges : soit une transition PLL/PSS (polycation du réservoir/polyanion de la barrière), soit une transition HA/PDADMA (polyanion du réservoir/polycation de la barrière). La **figure RC1.a** montre une image de l'interface réservoir/barrière inhomogène dans le cas d'une transition PLL/PSS, lorsque le PSS est ajouté sur le réservoir $(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}$. A l'opposé, la **figure RC1.b** montre une interface homogène obtenue dans le cas d'une transition HA/PDADMA, lorsque le PDADMA est ajouté sur un réservoir $(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_{15}$. Lorsque la construction de la barrière est poursuivie jusqu'à l'obtention du film $(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/(\text{PDADMA}/\text{PSS})_5$, l'interface reste homogène.

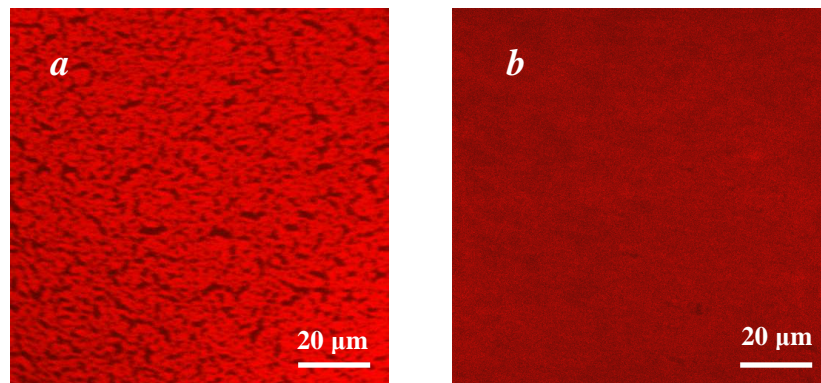


Figure RC1. Images de microscopie confocale présentant la structure de l'interface réservoir/barrière obtenue pour deux transitions possibles entre la barrière et le réservoir. (a) Interface inhomogène obtenue dans le cas d'une transition PLL/PSS lorsque du PSS est ajouté sur un réservoir $(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}$. (b) Interface homogène obtenue dans le cas d'une transition HA/PDADMA lorsque du PDADMA est ajouté sur un réservoir $(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}/\text{AP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_{15}$.

Les observations de microscopie confocale démontrent donc que le dépôt de PSS directement sur un réservoir enzymatique terminant par PLL entraîne la formation d'agrégats de tailles micrométriques probablement composés de complexes PLL/PSS et AP/PSS (**Figure RC1.a**). L'interface homogène obtenue lors d'une transition HA/PDADMA observée même quand des couches supplémentaires (PSS/PDADMA) sont ajoutées suggère que la transition HA/PDADMA bloque probablement la formation de ces gros agrégats PLL/PSS ou AP/PSS. Cette observation peut être due au fait que le dépôt de PSS fait suite à celui de PDADMA et que les chaînes de PSS sont alors fortement complexées au PDADMA et non plus à des éventuelles chaînes de PLL diffusant hors du réservoir.

B. Choix du niveau de dépôt de l'enzyme dans le réservoir

Initialement, nous avons construit des barrières PDADMA/PSS sur des réservoirs enzymatiques PLL/HA où l'enzyme marquée à la fluorescéine isothiocyanate (AP^{FITC}) était déposée sur le film $(PLL/HA)_{30}/PLL$ pour donner la structure suivante: $(PLL/HA)_{30}/PLL/AP^{FITC}/(PLL/HA)/(PDADMA/PSS)_5$. Dans ce type de construction, nous avons observé la présence de petits agrégats verts fluorescents à l'interface réservoir/barrière avec une rugosité significative (**Figure RC2.a**). Ces agrégats peuvent être probablement attribués à des complexes formés entre l'enzyme et les chaînes de PSS, compte tenu des observations issues du paragraphe précédent. D'autre part, une étude menée en annexe (Annexe 3) met en évidence l'existence de cette forte complexation entre ces deux macromolécules pourtant chargées négativement. On attribue cette affinité à de fortes interactions de Van der Waals.

Dans le but de minimiser les phénomènes de complexations à l'interface, nous avons cherché à diminuer la concentration en enzyme dans le film en la déposant à la 15^{ème} couche de l'assemblage pour former le film suivant: $(PLL/HA)_{15}/PLL/AP^{FITC}/(PLL/HA)_{15}/(PDADMA/PSS)_5$. Ainsi l'enzyme est insérée à un certain niveau de la construction (N=15) et 15 couches supplémentaires de PLL/HA sont déposées pour la « diluer » dans l'assemblage. Il aurait également été possible de diminuer directement la concentration de la solution de dépôt d' AP^{FITC} ou encore de diminuer le temps d'adsorption de cette enzyme. Lorsqu'une barrière $(PDADMA/PSS)_5$ est déposée sur le réservoir enzymatique construit ainsi, l'interface réservoir/barrière apparaît beaucoup plus homogène que celle du système précédent (enzyme sur $(PLL/HA)_{30}/PLL$) (**Figure RC2.b**).

La concentration en AP^{FITC} contenue dans chacun des deux réservoirs a été évaluée en mesurant l'intensité de fluorescence moyenne de chaque réservoir. Une droite d'étalonnage représentant l'intensité de fluorescence (I_f) en fonction de la concentration en AP^{FITC} a été établie à l'aide de solutions d' AP^{FITC} ayant des concentrations différentes (**Figure RC2.c**), ceci dans les mêmes conditions d'acquisition que les images des films. Cette méthode de dosage a permis, par extrapolation de la droite d'étalonnage, de déterminer un ordre de grandeur de la concentration en AP^{FITC} d'environ 4 mg/mL et 8 mg/mL pour les films $(PLL/HA)_{15}/PLL/AP^{FITC}/(PLL/HA)_{15}/(PDADMA/PSS)_5$ (N=15) et $(PLL/HA)_{30}/PLL/AP^{FITC}/PLL/HA/(PDADMA/PSS)_5$ (N=30) respectivement. Précisons que la solution d' AP^{FITC} utilisée pour le dépôt de l'enzyme dans le réservoir a une concentration égale à 0.5 mg/mL. Ceci nous indique que l'enzyme se concentre fortement à l'intérieur du film PLL/HA avec un facteur proche de 10 pour N=15 et un facteur proche de 20 pour N=30 ce qui confirme le rôle de réservoir joué par les films multicouches PLL/HA (Vodouhé et al. 2006).

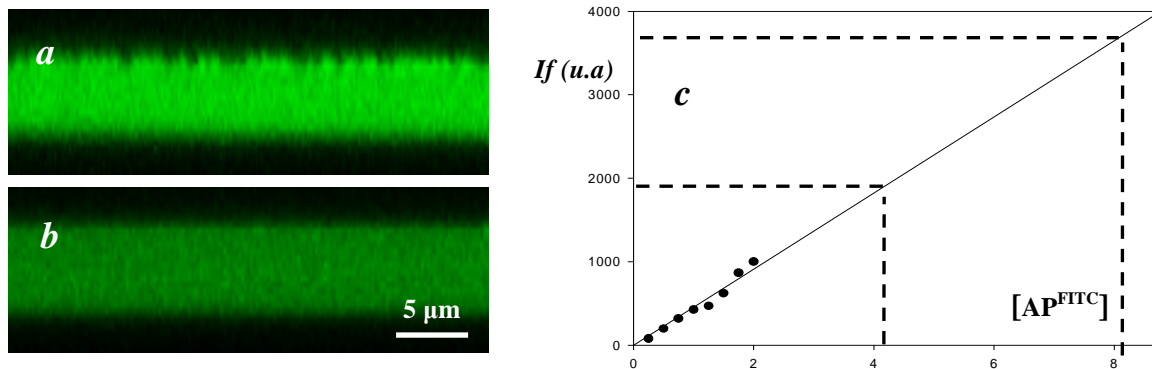


Figure RC2. (a) et (b) Sections (x,z) de microscopie confocale représentant deux systèmes réservoir/barrière enzymatiques avec un niveau de dépôt différent de AP^{FITC} dans le film (a) $(PLL/HA)_{30}/PLL/AP^{FITC}/PLL/HA/(PDADMA/PSS)_5$ (N=30), (b) $(PLL/HA)_{15}/PLL/AP^{FITC}/(PLL/HA)_{15}/(PDADMA/PSS)_5$ (N=15). (c) Droite d'étalonnage Intensité de fluorescence - Concentration en AP^{FITC} . Les valeurs des intensités de fluorescence dans les réservoirs (a) et (b) sont reportées sur la droite pour évaluer la concentration en AP^{FITC} dans les deux types de réservoirs. Les images et la courbe d'étalonnage ont été réalisées avec les mêmes réglages (gain du détecteur et puissance du laser du microscope confocal)

Nous avons ainsi déterminé les conditions expérimentales permettant la construction de barrières PDADMA/PSS homogènes sur des réservoirs enzymatiques PLL/HA. Le système enzymatique $(PLL/HA)_{15}/PLL/AP/(PLL/HA)_{15}/(PDADMA/PSS)_n$ ($n \geq 5$) sera choisi pour toute notre étude dans les parties 4-1 et 4-2.

4.3.2 Systèmes à réservoirs de molécules substrats pour la détection enzymatique

Résumé du travail

Dans cette deuxième partie complémentaire (4-3-2), nous développons une stratégie *inverse* de celle qui a été présentée dans les parties précédentes (chapitres 4-1 et 4-2) en fonctionnalisant le réservoir PLL/HA par le substrat de l'enzyme, la fluorescéine di-phosphate (FDP) au lieu de la phosphatase alcaline. L'objectif de ce travail concerne la réalisation d'un système de détection enzymatique. Dans le domaine biomédical, le dosage de la phosphatase alcaline permet notamment de détecter la présence de tumeurs osseuses et de cancers hépatiques (<http://www.analis.be/files/VprodFiles/1760/BC-OSTASE-FR.pdf>, Clinical News N°6 - 03/03).

Nous montrons qu'il est possible d'insérer des molécules de FDP en grande concentration dans un film multicouche PLL/HA. Une barrière PDADMA/PSS est déposée sur ce réservoir de molécules substrats pour former le système $(PLL/HA)_{30}/FDP/(PDADMA/PSS)_6$. Cette barrière empêche tout contact initial entre les molécules de FDP enfouies dans le réservoir et la phosphatase alcaline ajoutée en solution sur le film. Nous avons alors appliqué un étirement mécanique longitudinal sur ce système mis au contact de l'enzyme et nous avons observé l'apparition d'un fort signal de fluorescence au niveau du réservoir PLL/HA. Cette augmentation de fluorescence correspond à la conversion enzymatique de molécules de FDP non fluorescentes en molécules de fluorescéine fortement fluorescentes suite à la diffusion d'enzymes à travers la barrière lors du stimulus mécanique.

Résultats et Discussion :

Dans un premier temps, nous avons étudié par microscopie confocale l'insertion et le stockage des molécules de FDP à l'intérieur d'un réservoir PLL/HA. Un film $(PLL/HA)_{30}/PLL^{Rho}/HA$ (film PLL/HA marqué avec la PLL^{Rho}) a tout d'abord été construit sur une feuille de silicone. Les observations ont montré que les chaînes de PLL^{Rho} diffusaient librement dans tout le film PLL/HA conformément à ce qui a été décrit précédemment (Mertz et al. 2007). Le film se termine par une couche de HA dans le but d'anticiper par la suite, la construction d'une barrière homogène PDADMA/PSS (compte tenu des études précédentes, partie 4-3-1). La solution de FDP a été mise au contact du film PLL/HA puis rincée quelques minutes. Les observations ont montré la formation d'une bande verte faiblement fluorescente, superposée sur le réservoir marqué en rouge fluorescent par la PLL^{Rho} . Cette fluorescence est attribuée à

la présence de fluorescéine mono-phosphate (FMP) faiblement fluorescente et de fluorescéine présentes en faible concentration dans la solution commerciale de FDP.

Ensuite, six paires de couches (PDADMA/PSS) ont été déposées sur ce réservoir pour constituer le système réservoir/barrière $(PLL/HA)_{30}/PLL^{Rho}/HA/FDP/(PDADMA/PSS)_6$. Les observations montrent que ce système possède une structure homogène (**Figure RC3**).

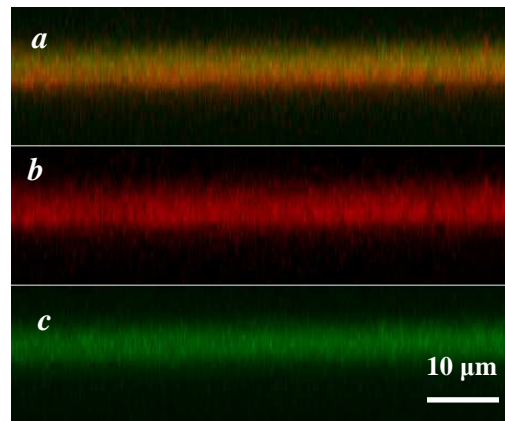


Figure RC3. Sections (x,z) de microscopie confocale présentant un système réservoir/barrière $(PLL/HA)_{30}/PLL^{Rho}/HA/FDP/(PDADMA/PSS)_6$. (a) Observation du film dans les deux canaux vert et rouge simultanément. Les canaux rouge (b) et vert (c) ont été découplés pour visualiser la contribution des deux marqueurs fluorescents : PLL^{Rho} et FDP (fluorescence de FMP et fluorescéine).

Des systèmes réservoir/barrière chargés en molécules de FDP et non marqués avec la PLL^{Rho} ont alors été construits, puis l' AP^{Rho} (phosphatase alcaline marqué par de la rhodamine) a été ajoutée en solution. A l'état non-étiré, nous avons tout d'abord vérifié l'absence de pulse de fluorescence indiquant que la réaction enzymatique ne se produit pas ou éventuellement faiblement (**Figure RC4.a**). Dès l'application d'un taux d'étirement mécanique longitudinal de l'ordre de 70% sur ce système, une forte augmentation de fluorescence est apparue dans le réservoir correspondant à la formation d'une grande quantité de fluorescéine par conversion enzymatique de FDP (**Figure RC4.b**). La fluorescéine est distribuée de façon homogène dans tout le réservoir et présente une concentration beaucoup plus importante dans ce réservoir que dans la solution. Cette observation confirme que les réservoirs PLL/HA ont une grande capacité à stocker la fluorescéine. La réaction s'est poursuivie avec une intensité de fluorescence continuellement croissante sur une dizaine de minutes pour se stabiliser à un haut niveau de fluorescence (**Figure RC4.c**).

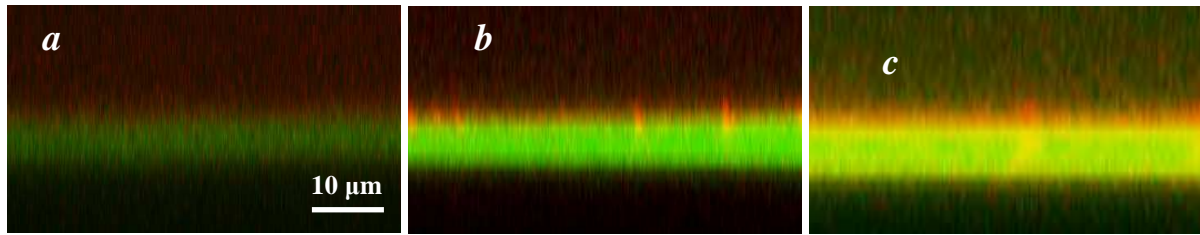


Figure RC4. Sections (x,z) de microscopie confocale dans les canaux vert et rouge simultanément, présentant un système réservoir/barrière $(PLL/HA)_{30}/PLL/HA/FDP/(PDADMA/PSS)_6$ mis au contact d'une solution d' AP^{Rho} . (a) A l'état non-étiré, (b et c) sous un étirement de 70% (b) après 5 minutes (c) après 15 minutes.

Les intensités de fluorescence dans le réservoir PLL/HA et en solution ont été mesurées à l'aide du microscope confocal utilisé comme fluorimètre. Initialement sans étirement, le suivi de l'intensité de fluorescence sur une période de 15 minutes nous a indiqué une légère augmentation de la quantité de fluorescéine produite dans le réservoir et dans la solution (**Figure RC5.a et b**). Ces observations permettent de supposer un effet barrière pour les films PDADMA/PSS, même s'il est probable qu'une faible quantité d'enzymes se soit infiltrée à l'intérieur du réservoir probablement en raison de petits défauts sur des zones du film.

Dès l'application de l'étirement mécanique, il apparaît que l'intensité de fluorescence mesurée dans le réservoir augmente très fortement pour atteindre un palier de saturation correspondant à une intensité constante après une période de 10 minutes (**Figure RC5.a**). Par ailleurs, le suivi de l'intensité de fluorescence en solution, indique également une forte augmentation dès l'application de l'étirement mécanique (**Figure RC5.b**) mais contrairement au réservoir, l'évolution de la fluorescence est constamment croissante avec le temps sur cette période. Ceci indique qu'une partie de la fluorescéine produite diffuse hors du film dès le début de la réaction. De plus, le palier de fluorescence observé dans le réservoir résulte probablement d'un phénomène de saturation du film en molécules de fluorescéine. En effet, au bout d'un certain temps de l'ordre de 10 minutes, le film a atteint la quantité maximale de molécules de fluorescéine qu'il peut stocker et reste à un niveau constant de fluorescence. La fluorescéine produite ne s'accumule alors qu'en solution expliquant l'évolution croissante dans ce milieu.

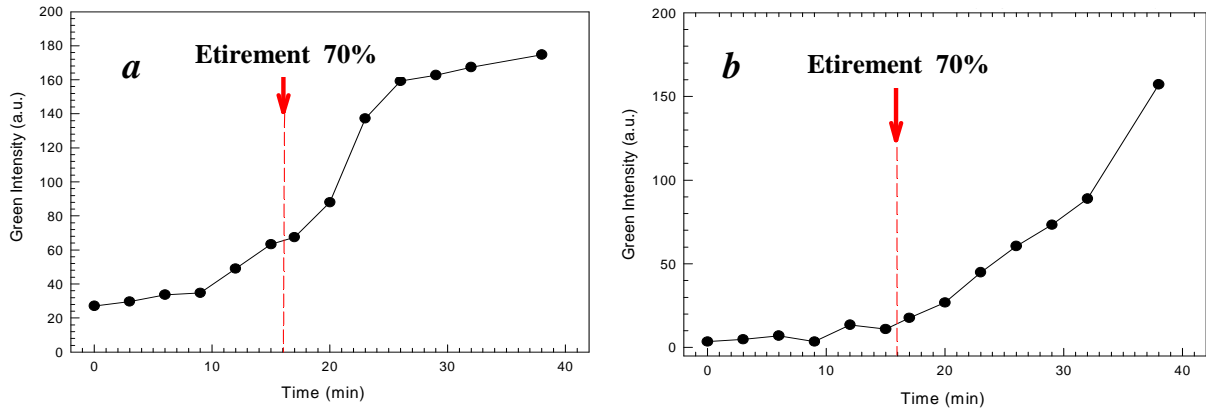


Figure RC5. Evolutions temporelles de l'intensité de fluorescence mesurée à l'aide du microscope confocale lors de l'application d'un étirement de 70% sur un système réservoir/barrière $(\text{PLL/HA})_{30}/\text{PLL/HA/FDP}/(\text{PDADMA/PSS})_6$ mis au contact d'une solution d' AP^{Rho} (a) à l'intérieur du réservoir PLL/HA, (b) en solution.

Nous avons finalement réalisé dans cette partie un système réservoir/barrière à base de multicouches de polyélectrolytes, chargé en molécules de FDP. Ce système répond sous l'action d'un étirement mécanique en émettant un pulse de lumière fluorescente par réaction enzymatique lorsque de la phosphatase alcaline est présente dans le milieu. Ce type de système ouvre des perspectives dans le développement des détecteurs enzymatiques utilisant une reconnaissance moléculaire spécifique enzyme-susstrat qui peut être détecté par émission de signaux fluorescents sous l'action de stimuli mécaniques. Plus globalement, ce travail s'inscrit dans le domaine des détecteurs de biomolécules qui répondent par la variation d'une grandeur physique suite à l'action de stimuli extérieurs.

Conclusions et Perspectives

Ce travail de thèse a consisté à étudier la réponse, sous l'action de stimuli mécaniques, de différents assemblages supramoléculaires constitués de films multicouches de polyélectrolytes. Nous avons ainsi mis au point des systèmes multicouches fonctionnels qui peuvent être appliqués pour deux objectifs différents : i) la libération de molécules contrôlée par des forces mécaniques et ii) la conversion d'un signal mécanique en un signal biochimique de catalyse enzymatique.

Dans la première partie de l'étude (**Chapitre 3**), nous avons commencé par étudier l'effet d'un étirement mécanique longitudinal appliqué sur plusieurs films multicouches de polyélectrolytes. Des films PLL/HA, PAH/PSS et PDADMA/PSS, initialement déposés sur des feuilles élastomères en silicone (substrats de dépôt), ont présenté des réponses viscoélastiques très différentes d'un film à l'autre. Par la suite, les films PAH/PSS et PDADMA/PSS de nature vitreuse et jouant le rôle de barrières vis-à-vis de la diffusion des chaînes de polyélectrolytes, ont été assemblés sur les films PLL/HA de nature gel/liquide et jouant le rôle de réservoirs de chaînes de polyélectrolytes. Dans ces systèmes multi-strates, les couches barrières PAH/PSS et PDADMA/PSS, empêchent notamment le passage de chaînes de PLL^{FITC} présentes en solution, à l'intérieur des réservoirs PLL/HA. Sous l'application d'une contrainte mécanique, les barrières PAH/PSS s'ouvrent en formant des fissures micrométriques, tandis que les barrières PDADMA/PSS s'ouvrent par formation de nanopores sur toute la surface du film. Ces nanopores se referment lors du retour à l'état non-étiré, indiquant le caractère réversible de ces systèmes. Ces travaux ont ainsi montré que les barrières PDADMA/PSS (déposées sur les réservoirs PLL/HA) fonctionnaient comme des nano-valves polymériques à commande mécanique permettant la libération contrôlée de biomolécules.

Dans la deuxième partie de l'étude (**Chapitre 4**), nous avons élaboré des systèmes enzymatiques réservoir/barrière (PLL/HA-PDADMA/PSS) en fonctionnalisant les réservoirs PLL/HA avec une enzyme, la phosphatase alcaline. Nous avons montré qu'en jouant sur les conditions expérimentales, il était possible de diminuer la perméabilité des couches (PDADMA/PSS) déposées sur les réservoirs enzymatiques, vis-à-vis du substrat FDP. Nous avons ainsi élaboré des barrières imperméables PDADMA/PSS de différentes natures, soit en augmentant le nombre de couches PDADMA et PSS constituant la barrière, soit en diminuant le temps de dépôts de ces polyélectrolytes. Selon la nature de la barrière (à nombre important

de couches ou bien à temps de dépôts courts des polyélectrolytes PDADMA et PSS), l'application de l'étirement mécanique sur ces systèmes a permis de déclencher une réaction enzymatique, soit à l'intérieur du réservoir par ouverture de la barrière (réaction intraréservoir), soit à l'interface réservoir/barrière (réaction interfaciale).

Nous nous sommes focalisés par la suite, sur ces films à réaction interfaciale, dans le but de développer des systèmes enzymatiques à biocatalyse modulable par l'application de forces mécaniques. Nous avons mis en évidence que l'application progressive d'un étirement mécanique, déclenchait à partir d'un certain taux critique d'étirement, la réaction enzymatique avec une intense activité se traduisant par un fort pulse de fluorescence. Après cet étirement critique, nous avons observé que la vitesse de réaction augmentait graduellement avec le taux d'étirement mécanique, indiquant la possibilité de moduler la catalyse. Le retour à l'état non-étiré permet de retrouver une activité enzymatique très faible, voire quasi-nulle. Lorsqu'un nouvel étirement mécanique est appliqué, l'activité catalytique augmente à nouveau mais plus faiblement qu'auparavant. Finalement, nous avons conçu un système à biocatalyse contrôlée avec le taux d'étirement et présentant des propriétés réversibles. Un mécanisme de type « sites cryptiques » est envisageable pour interpréter ce comportement. En effet, sous l'action d'une force mécanique d'étirement, l'assemblage réservoir enzymatique/barrière répond probablement en exposant les sites enzymatiques vers l'interface barrière/solution (activation catalytique de la surface) et les ré-enfouit lors du retour à l'état initial non étiré (désactivation catalytique de la surface).

Enfin, nous avons également développé dans ce chapitre une stratégie inverse de celle qui a été présentée dans les parties 4-1 et 4-2 en fonctionnalisant le réservoir PLL/HA par le substrat enzymatique, la FDP, au lieu de la phosphatase alcaline (partie 4-3). Nous avons montré que ce système répondait sous l'action d'un étirement mécanique en émettant un pulse de lumière fluorescente lorsque de la phosphatase alcaline est présente dans le milieu. Ceci constitue une première étape vers la réalisation de détecteurs enzymatiques.

Ces travaux nécessitent encore des études approfondies de caractérisation pour mieux comprendre la structure de ces assemblages fonctionnels à base de réservoirs, de barrières et d'enzymes, particulièrement au niveau des interfaces formant les nanovalves ou permettant la biocatalyse. La spectroscopie confocale Raman serait notamment très utile pour avoir accès à la composition moléculaire et à la structuration de ces interfaces. De plus, des études de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) permettraient de mieux comprendre les

phénomènes de diffusion à travers les barrières et d'avoir des informations sur la densité des chaînes polyélectrolytes sous étirement.

Les perspectives de ce travail sont centrées sur la biologie et les applications biomédicales. Des études sont actuellement en cours au Laboratoire de Biomatériaux (INSERM U595 Strasbourg) pour utiliser une stratégie similaire à celle décrite dans ce travail de thèse, notamment dans le but de moduler l'adhérence cellulaire avec le taux d'étirement du substrat. Par ailleurs, l'utilisation des systèmes réservoir/barrière est également envisagée pour confiner des plasmides dans les réservoirs avec l'objectif de contrôler mécaniquement la transfection de cellulesensemencées en surface des films. D'autre part, de nombreux biomatériaux sont réalisés en silicone et sont soumis à de nombreuses contraintes mécaniques dans le corps humain. Ces matériaux pourraient donc être facilement fonctionnalisés par des revêtements polymériques fonctionnels tels que les multicouches de polyélectrolytes. Aussi, ces revêtements permettraient du fait de l'existence de ces contraintes biomécaniques, une libération de principes actifs ou encore l'induction d'une réaction biochimique d'intérêt thérapeutique au voisinage du biomatériau.

Annexes

Annexe 1 : Influence de l'étirement sur la mobilité des polyélectrolytes

Annexe 2 : Libération d'albumine enfouie dans un film PLL/HA

Annexe 3 : Insertion de phosphatase alcaline dans les films PDADMA/PSS

Annexe 4 : Films multicouches à base de fibres de cellulose

Annexe 1 : Influence de l'étirement sur la mobilité des polyélectrolytes

Description de l'étude

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'influence de l'étirement mécanique sur la vitesse de diffusion des chaînes de PLL dans un film $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}$ marqué à PLL^{FITC} . Nous avons utilisé la technique de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP), pour quantifier la mobilité des chaînes de PLL^{FITC} (Picart et al. 2005) ; (Thèse de Laurent Jourdainne 2007). Cette expérience consiste à photoblanchir un cylindre de $50 \mu\text{m}$ de diamètre au sein de la section du film marqué fluorescent et à suivre le recouvrement de fluorescence induit par la diffusion des chaînes de PLL^{FITC} sur cette zone en fonction du temps. Un exemple de procédure est montré dans la **Figure A1** représentant le recouvrement de fluorescence sur 21 minutes pour deux étirements mécaniques différents : 0 et 80%. A un étirement donné, nous traçons le profil de fluorescence le long d'un diamètre du disque blanchi et nous suivons son évolution au cours du temps.

Expériences de FRAP

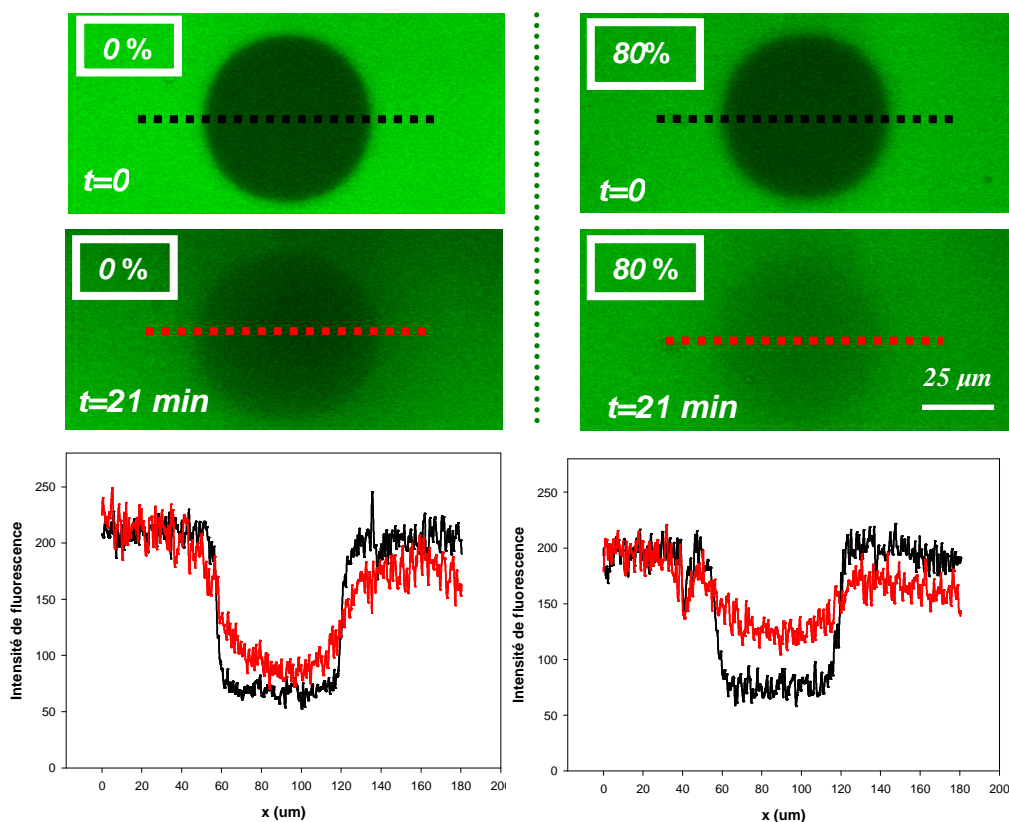


Figure A1 Images (x,y) CLSM montrant le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) pour deux étirements différents sur une durée de 21 minutes. A gauche : état non étiré, à droite : état étiré à 80%. Les profils de fluorescence, réalisés suivant la ligne pointillée à $t=0$ (noir) et à $t=21 \text{ min}$ (rouge), sont représentés en dessous des images.

Résultats et discussion

Nous avons commencé par étudier l'effet du taux d'étirement sur la cinétique de recouvrement de fluorescence dans le disque blanchi. Pour différents taux d'étirements, nous avons mesuré au cours du temps, l'intensité de fluorescence moyenne dans le disque photoblanchi notée $I_f(t)$. Ces valeurs ont été normalisées selon le taux de recouvrement $R(t) = (I_f(t) - I_{f0}) / (I_{f\infty} - I_{f0})$ où I_{f0} et $I_{f\infty}$ correspondent respectivement aux intensités de fluorescence moyennes initiale (à $t = 0$) et finale (correspondant à l'équilibre de recouvrement) mesurées dans le disque. En pratique, on utilise la mesure de l'intensité de fluorescence moyenne à l'extérieur du disque pour évaluer $I_{f\infty}$, en raison du photoblanchiment en lecture dans le disque. La **Figure A2.a** représente l'évolution de ces différentes cinétiques en fonction du taux d'étirement appliqué. Cette étude a mis en évidence une augmentation graduelle du recouvrement de fluorescence avec le taux d'étirement. Nous avons également étudié le recouvrement de fluorescence lors d'un retour à 0%, après un étirement de 80%. Nous avons observé que la courbe de recouvrement au retour se superposait à la courbe initiale de l'état non-étiré, indiquant donc une réversibilité du recouvrement de fluorescence (**Figure A2.b**).

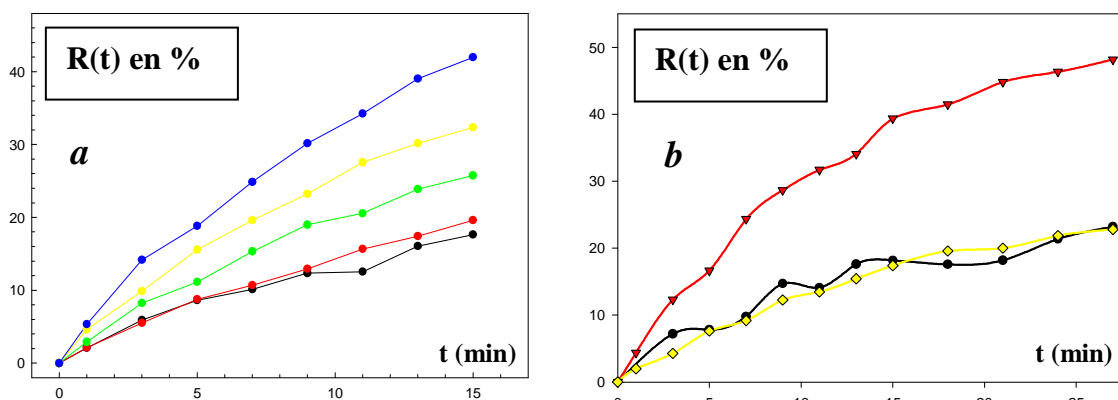


Figure A2. (a) Courbes de recouvrement de fluorescence en fonction du temps, $R(t)$ lors du photoblanchiment d'un disque de $50 \mu\text{m}$ de diamètre dans un film $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}^{\text{FITC}}$ pour les étirements suivants : 0% (en noir), 20% (en rouge), 40% (en vert), 60% (en jaune), 80% (en bleu). (b) Courbes de recouvrement à l'état non étiré (en noir), à l'état étiré 80% (en rouge) et au retour à l'état non-étiré (en jaune).

Ces expériences suggèrent que l'application d'un étirement mécanique permet de contrôler réversiblement la vitesse de diffusion des chaînes de PLL dans un film PLL/HA. Il est possible que cette force macroscopique se transmette à travers l'ensemble du film visqueux (cent fois plus que l'eau) par diffusion de quantité de mouvement le long des

couches visqueuses, de façon similaire à un écoulement de type couette plan. Une autre interprétation consisterait à voir le film comme un réseau de chaînes polymères desserré sous l'action de l'étirement mécanique, permettant alors une plus grande mobilité des chaînes de polyélectrolytes à travers les mailles de ce réseau.

Cependant, d'autres expériences réalisées par la suite ont présentés des résultats non reproductibles et il est possible que la nature fluide versatile des films PLL/HA soit à l'origine de ces différences de comportement. La suite de ce travail consisterait alors à déterminer des conditions expérimentales permettant d'augmenter le caractère visqueux ou élastique du film PLL/HA pour confirmer ces résultats. Ceci peut se faire notamment en diminuant la force ionique du milieu (et des solutions de polyélectrolytes) ou encore par réticulation entre les chaînes de PLL et HA via l'utilisation d'un agent de réticulation chimique.

Annexe 2 : Libération d'albumine enfouie dans un film PLL/HA

Description de l'étude

Dans ce travail, nous avons étudié, à l'aide de la microscopie confocale, l'enfouissement d'une protéine, l'albumine, dans un film PLL/HA. Nous nous sommes également intéressés à la libération spontanée de cette protéine, du film vers le milieu liquide par simple ajout de « tampon frais » (Tris 10mM/NaCl 0.15M). L'utilisation de la fluorimétrie nous a permis d'évaluer la quantité d'albumine libérée en solution pour plusieurs injections de tampons frais. Enfin nous avons construit une barrière PDADMA/PSS sur ce film bio-fonctionnalisé dans le but de pouvoir confiner la protéine et de la libérer de façon contrôlée par rupture de la barrière sous l'action d'un stimulus extérieur comme l'étirement mécanique.

Résultats et discussion

Insertion d'albumine dans un film PLL/HA (CLSM)

Nous avons utilisé de l'albumine marquée à la FITC (Alb^{FITC} , 66 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Sigma-Aldrich) pour visualiser le dépôt de cette protéine dans un film PLL/HA. L'albumine a été déposée à $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pendant 30 minutes puis le film a été rincé durant 15 minutes avec de la solution tampon (Tris 10 mM/NaCl 0.15M). La **Figure A3** démontre la diffusion de façon homogène de la protéine fluorescente dans l'ensemble du film.

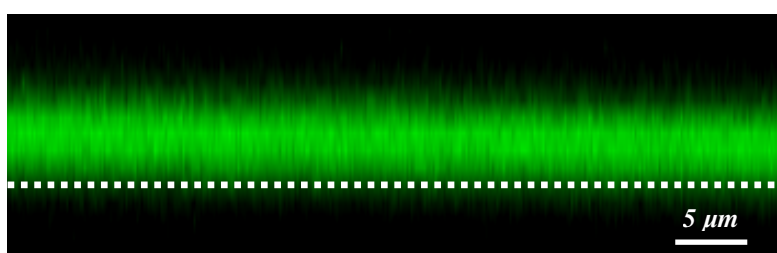


Figure A3. Section CLSM verticale (x,z) d'un film (PLL/HA)₃₀/PLL/Alb^{FITC}. La ligne en pointillés correspond à l'interface entre la lame de verre (substrat) et le film.

Mesure de la libération d'albumine en solution (Fluorimétrie)

Nous avons remarqué une faible fluorescence dans le milieu liquide (surnageant) au contact du film, correspondant à la présence de molécules d'Alb^{FITC}. Cette fluorescence résulte probablement de la diffusion, du film vers le milieu liquide, de molécules d'Alb^{FITC} « libres », c'est-à-dire non liées au film multicouche. La fluorimétrie a été utilisée pour détecter l'albumine-FITC libérée en faible quantité. L'intensité de fluorescence due à la protéine libérée en solution a été mesurée pour plusieurs cycles d'injection/rinçage de 250 μL

de tampon frais et de durées identiques égales à 20 minutes (**Figure A4.a**) et la somme totale des intensités de fluorescence de l'albumine-FITC libérée depuis la première injection a été reportée sur la **Figure A4.b**.

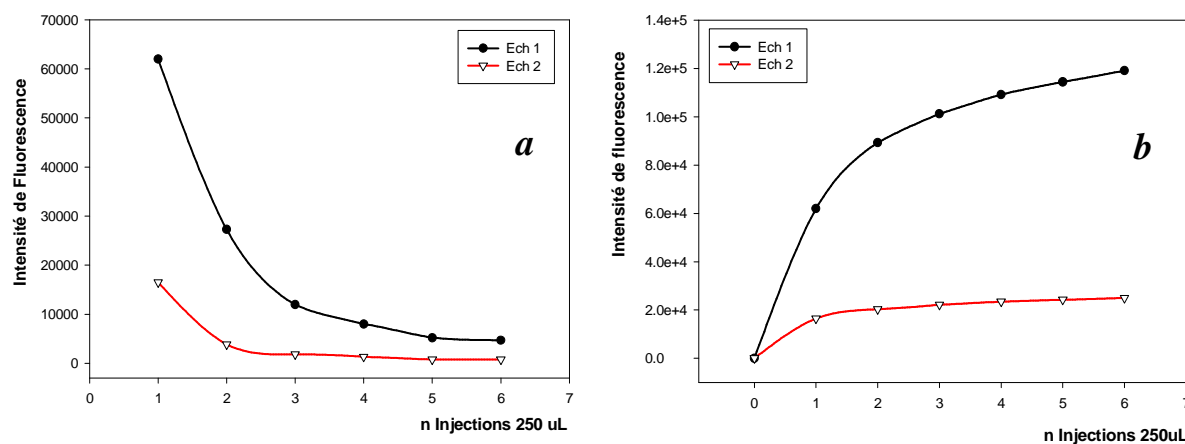


Figure A4. Mesure par fluorimétrie de l'intensité de fluorescence de l'Alb^{FITC} libérée en solution à partir d'un film (PLL/HA)₃₀/PLL/Alb^{FITC}. Les deux courbes représentées (en noir et en rouge) correspondent à deux échantillons de structure identique mais construits de façon indépendante. A gauche (a), mesure à chaque injection de l'intensité de fluorescence du milieu tampon. A droite (b), somme des intensités de fluorescence depuis la première injection de milieu tampon.

Compte tenu des courbes d'intensité de fluorescence (**Figure A4**), il apparaît qu'à la première injection de milieu tampon, il y a une quantité significative d'Alb^{FITC} libérée en solution. Puis, cette quantité libérée diminue progressivement au cours des cycles d'injection/rinçage suivants pour devenir négligeable. Au sein du film, l'albumine est probablement présente avec au moins deux modes d'association : de l'albumine fortement liée au réseau des chaînes de polyélectrolytes, enfouie en grande quantité et de l'albumine diffusant librement en faible quantité. Il semble donc que le film PLL/HA constitue un réservoir d'albumine « libre » qui s'appauvrit avec les cycles d'injection/rinçage.

Dépôt d'une barrière PDADMA/PSS

Dans le but de confiner cette quantité libre d'Alb^{FITC} à l'intérieur d'un film PLL/HA, nous avons construit une barrière PDADMA/PSS sur le film fonctionnalisé avec la protéine. Nous avons étudié cette construction, couche par couche, par microscopie confocale afin de vérifier que l'interaction de l'albumine avec les polyélectrolytes de la barrière (PSS en particulier) n'entraînait pas une détérioration de la barrière ou du film. Des images de microscopie confocale sont acquises avant et après la construction de cette barrière et

montrent que les structures demeurent similaires et homogènes indiquant ainsi la possibilité de construire une barrière PDADMA/PSS sur ce système (**Figure A5**).

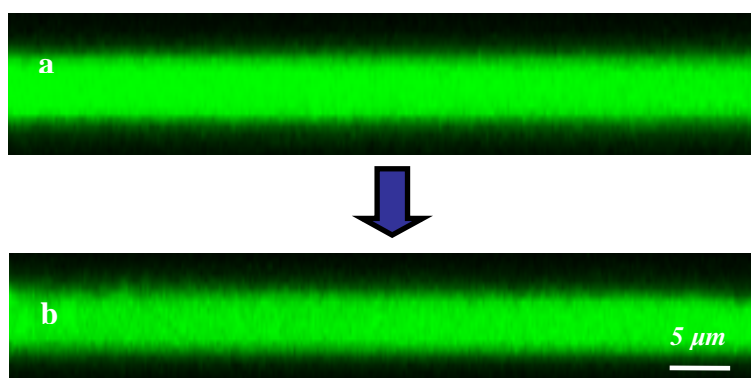


Figure A5. Images de microscopie confocale présentant la construction d'une strate $(\text{PSS/PDADMA})_2$ sur un film $(\text{PLL/HA})_{30}/\text{PLL}/\text{Alb}^{\text{FITC}}/\text{PLL}$. (a) Avant la construction de la barrière, (b) après la construction de la barrière.

Pour des raisons de temps, nous n'avons pas pu poursuivre ce travail. La suite nécessiterait de vérifier par des mesures de fluorimétrie l'effet barrière empêchant la libération spontanée d'albumine et ensuite de tester le déclenchement de sa libération par un stimulus extérieur tel que l'étirement mécanique.

Annexe 3 : Insertion de phosphatase alcaline dans les films PDADMA/PSS

Description de l'étude

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'insertion de l'enzyme phosphatase alcaline (AP) à l'intérieur d'un film multicouche PDADMA/PSS qui est connu pour avoir une structure relativement stratifiée. Nous avons utilisé la microbalance à cristal de quartz (QCM) ainsi que la spectroscopie infra-rouge en mode ATR (attenuated total reflection) pour étudier le dépôt de l'enzyme dans ce film multicouches. Nous montrons que, même s'il n'a pas été possible d'enfouir l'enzyme entre plusieurs bicouches (PDADMA/PSS)_n, nous avons tout de même pu l'immobiliser sur la surface du film et l'enfouir sous une couche de PDADMA. Nous avons également vérifié à l'aide de la spectrophotométrie UV/visible que l'AP maintenait ses propriétés biocatalytiques au contact des couches (PDADMA/PSS), ce qui démontre que les interactions entre les polyélectrolytes (constituant le film) et l'enzyme adsorbée ne désactivent pas le site catalytique de l'enzyme.

Résultats et Discussion

Construction de films enzymatiques PDADMA/PSS (QCM et IR-ATR)

La construction des films multicouches PDADMA/PSS suivi de l'insertion de l'enzyme dans ces films ont été suivies *in situ* par QCM (**Figure A6**). La phosphatase alcaline (AP), chargée négativement à pH = 7.4, a été déposée sur un film [(PDADMA/PSS)₅/PDADMA, donc ayant pour couche terminale PDADMA, chargé positivement. Le suivi de la variation de fréquence de résonance normalisée $-\Delta f/v$ (Δf est la variation de fréquence de résonance du système (cristal de quartz + film), v représente l'indice de l'harmonique) en fonction du nombre de couches déposées confirme tout d'abord une légère croissance exponentielle pour le film PDADMA/PSS comme cela a été décrit précédemment (Schlenoff and Dubas 2001; Mertz et al. 2007).

Lors de l'ajout de l'AP sur PDADMA, la cinétique d'adsorption (**Figure A6.b**) indique clairement qu'une quantité significative d'enzyme a été déposée sur ce film. La variation de fréquence, $-\Delta f/v$, est d'environ 100 Hz correspondant à une concentration surfacique d'environ 1770 ng.cm⁻² en appliquant la relation de Sauerbrey (Sauerbrey 1959). Le dépôt de la couche suivante de PDADMA indique une augmentation régulière de $-\Delta f/v$ montrant que le film continue à croître et que l'enzyme peut probablement être enfouie entre deux couches de PDADMA. Cependant, quand la couche suivante PSS a été déposée, une

importante chute de $-\Delta f/v$ s'est produite et pourrait correspondre à une désorption de matière constituant le film. Après cela, la construction des couches (PDADMA/PSS) s'est poursuivie en décrivant une augmentation de $-\Delta f/v$ régulière.

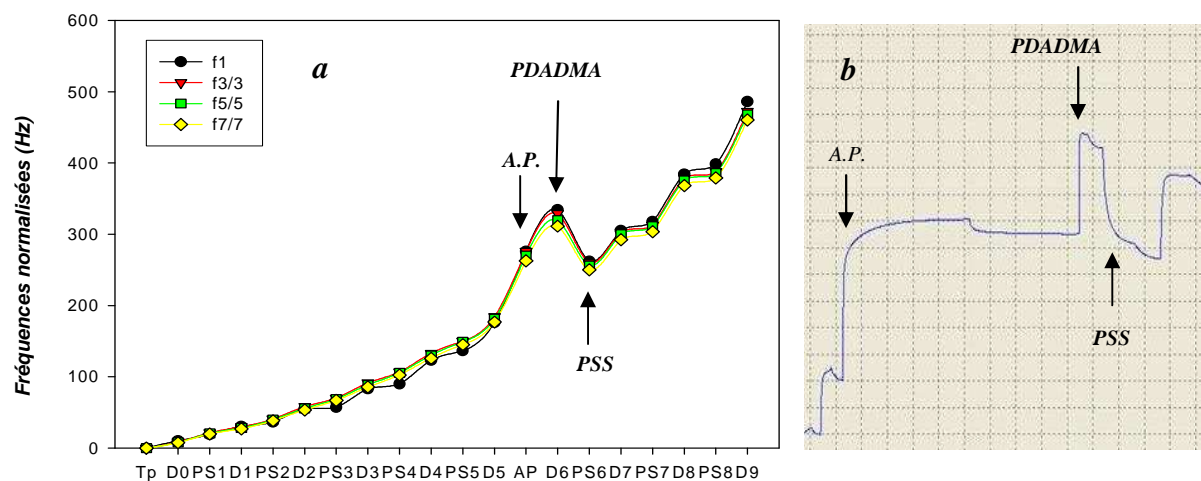


Figure A6. (a) Expérience de QCM représentant la variation de fréquence normalisée $-\Delta f/v$ (suivie à 5, 15, 25, 35 MHz) au cours de la construction du film multicouche (PDADMA/PSS)₅/PDADMA suivie de l'adsorption de la phosphatase alcaline (AP) puis de plusieurs couches (PDADMA/PSS). (b) Evolution temporelle de $-\Delta f/v$ (suivie à 15 MHz) représentant la cinétique de dépôt de l'AP sur le film (PDADMA/PSS)₅/PDADMA.

Dans le but de comprendre la signification de cette désorption de matière, nous avons suivi le processus de construction du film PDADMA/PSS et le dépôt de l'enzyme par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) en mode ATR (attenuated total reflection). Les expériences d'IR-ATR ont été réalisées dans un tampon deutérié Tris 10 mM/NaCl 0.15M. D₂O a été utilisé comme solvant au lieu de l'eau car la bande amide I de l'enzyme (vers 1650 cm⁻¹) est fortement parasitée par la bande d'absorption de l'eau vers 1650 cm⁻¹ (O-H bending), alors que cette vibration avec D₂O se situe vers 1200 cm⁻¹.

Les spectres IR-ATR ont été réalisés à l'I.C.S. (Institut Charles Sadron, CNRS, Strasbourg) avec un spectrophotomètre Equinox 55 FTIR (Brucker, Germany) en utilisant un détecteur MCT (Mercure Cadmium Telluride) refroidi à l'azote liquide. Les films multicouche PDADMA/PSS ont été construits sur un cristal de ZnSe dans la cellule de mesure ATR, par dépôt alterné des solutions de polyanions et polycations pendant 10 minutes suivi d'une étape de rinçage avec la solution tampon (8 minutes). La phosphatase alcaline a été déposée pendant 30 minutes puis rincée durant 10 minutes avec la solution

tampon. L'analyse des spectres IR a été réalisée en utilisant comme ligne de base, soit le spectre du tampon D₂O pour le film (PDADMA/PSS)₅/PDADMA (**Figure A7**), soit le spectre de ce dernier film pour étudier le dépôt de l'enzyme et des couches suivantes (**Figure A8**).

Tout d'abord, le spectre IR-ATR du film multicouche (PDADMA/PSS)₅/PDADMA a été acquis et traité en utilisant comme ligne de base le spectre du tampon D₂O (**Figure A7**). Ce spectre confirme la présence des différentes bandes d'absorptions de PSS à 1005, 1035 et 1155 cm⁻¹ et de PDADMA à 1465, 2100 et 2900 cm⁻¹ (les 2 dernières bandes ne sont pas représentées sur le spectre en raison de l'échelle d'abscisse choisie) ainsi que celle de D₂O vers 1200 cm⁻¹.

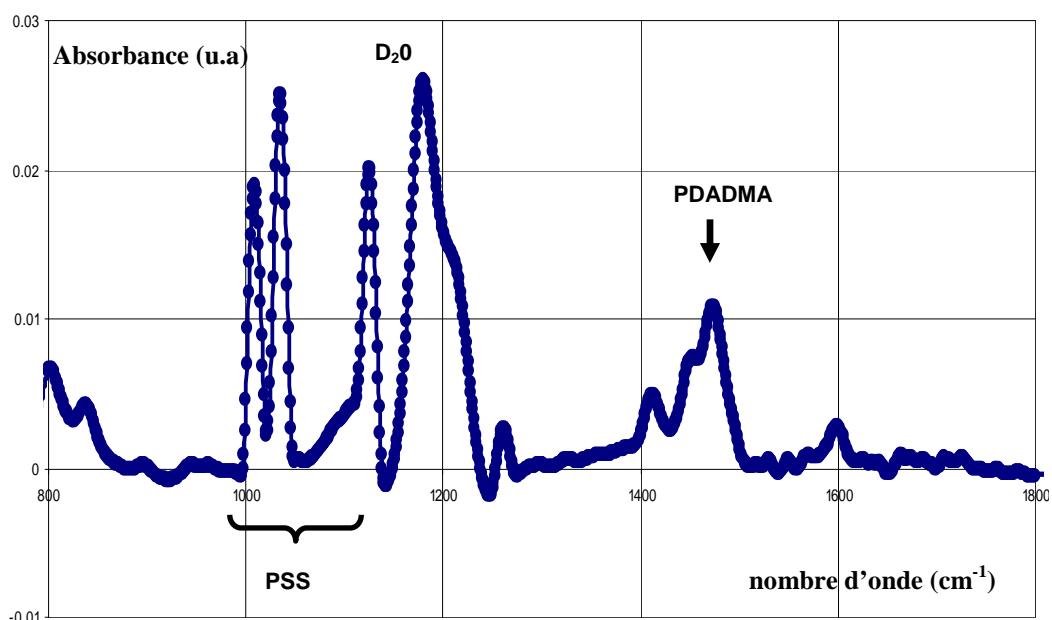


Figure A7. Spectre d'absorption IR en mode ATR d'un film multicouche (PDADMA/PSS)₅/PDADMA réalisé dans un tampon deutérié (Tris /NaCl) sur une gamme de nombre d'onde [800-1800] cm⁻¹.

Pour la suite de la construction, nous avons utilisé comme ligne de base le spectre de ce film (PDADMA/PSS)₅/PDADMA. La phosphatase alcaline (AP) a été déposée sur ce film et un signal d'absorption significatif correspondant à la bande amide I de l'AP est apparu vers 1635 cm⁻¹ (**Figure A8.a**). Le dépôt de la couche suivante de PDADMA montre une très légère diminution du signal de l'A.P. ainsi que l'apparition des bandes d'absorptions caractéristiques de PDADMA (1465, 2100 et 2900 cm⁻¹). Ceci indique le dépôt effectif d'une couche de PDADMA sur la surface comme cela a été montré dans les expériences de QCM. Lorsque la couche suivante PSS a été déposée, une diminution importante du signal de l'AP, divisé par un facteur proche de 3 a été observée (**Figure A8.b**). Notons que les bandes d'absorption de

PDADMA (1465, 2100 et 2900 cm^{-1}) n'ont pas diminué et que les bandes d'absorption de PSS sont apparues (1005, 1035 et 1155 cm^{-1}). Ceci montre clairement qu'une grande partie de l'AP déposée initialement sur le film (PDADMA/PSS)₅/PDADMA a été désorbée par l'ajout d'une couche (PDADMA/PSS), remplacée probablement par des chaînes de PSS. La déposition d'une seconde couche (PDADMA/PSS) a été étudiée et le signal d'AP a quasiment disparu lors de l'ajout de PSS indiquant la désorption presque totale de l'enzyme du film (**Figure A8.c**).

Le dépôt de chaînes de PSS directement sur le film (PDADMA/PSS)₅/PDADMA/AP a été réalisé et a montré une désorption quasi-totale de l'enzyme du film. Ces résultats suggèrent que l'AP présente une forte affinité pour les chaînes de PSS, bien que cette enzyme et ce polyelectrolyte soient tous deux chargés négativement. Ces interactions résultent probablement de forces attractives de Van der Waals susceptibles de s'établir entre ces deux macromolécules. En effet, l'existence de nombreux moments dipolaires (dus aux fonctions amides notamment) dans la chaîne polypeptidique de l'enzyme et du PSS (dus aux fonctions sulfonates) ainsi que la présence de cycles aromatiques (groupements styrènes) dans le PSS donnent vraisemblablement lieu à des attractions favorables dipôles-dipôles (effet d'orientation de Keesom) ou encore dipôles-nuages π polarisables (effet d'induction de Debye). La contribution de London entre dipôles instantanés n'est pas exclue non plus.

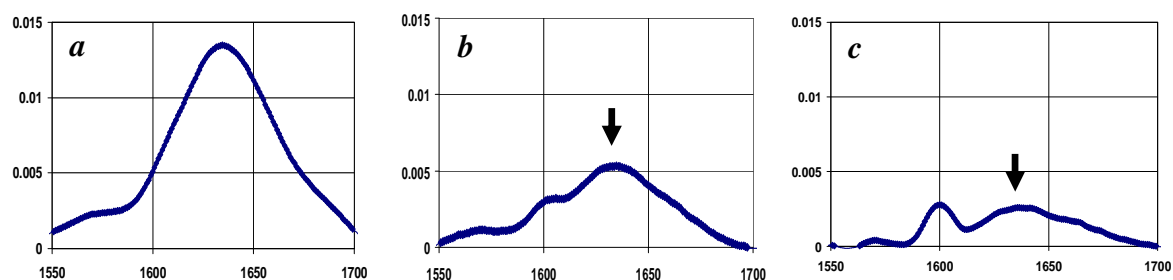


Figure A8. Spectres IR en mode ATR représentant l'évolution du signal de l'AP à 1635 cm^{-1} au cours de son insertion dans un film PDADMA/PSS. (a) AP adsorbée (suivi du rinçage) sur le film multicouche (PDADMA/PSS)₅/PDADMA, (b) ajout de la première couche (PDADMA/PSS) puis (c) ajout de la deuxième couche (PDADMA/PSS) sur la surface enzymatique en (a).

Activité Enzymatique

L'activité biocatalytique d'une telle surface (PDADMA/PSS)₅/PDADMA/AP construite à base de films multicouches et d'enzyme, a été mesurée en solution en suivant la conversion enzymatique d'une molécule substrat de la phosphatase : le para-nitrophényl phosphate (PNP) en para-nitrophénol (PN). Les solutions de PNP ont été mises au contact du

film enzymatique et la formation de PN a été détectée par spectrophotométrie UV/Vis à $\lambda = 405$ nm correspondant au maximum d'absorbance du PN. L'absorbance du surnageant a été mesurée en fonction du temps et le graphique résultant $A = f(t)$ montre une augmentation linéaire de l'absorbance avec le temps. Ces résultats indiquent que l'enzyme reste active au contact des couches (PDADMA/PSS) du film avec une activité constante proche de 0.1 u.A./h (correspondant à la pente de la droite) sur une période d'au moins 24 heures comme indiqué par le profil linéaire sur la **Figure A9**. Les mêmes expériences sans enzyme ont été réalisées et de très faibles valeurs de l'absorbance ont été mesurées à $\lambda = 405$ nm démontrant l'absence de PN dans le surnageant et confirmant donc que le film PDADMA/PSS n'a pas d'activité catalytique parasite.

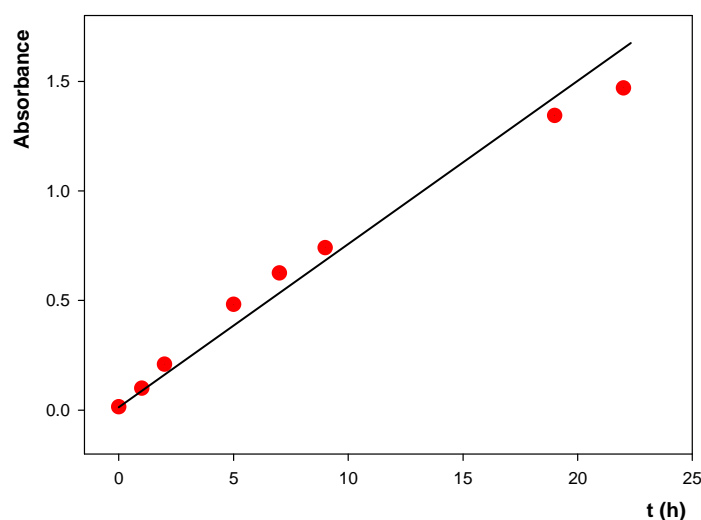


Figure A9. Expérience de spectrophotométrie UV/Vis représentant l'évolution de l'absorbance en fonction du temps, mesurée à $\lambda = 405$ nm, d'une solution de PNP mise au contact avec la multicouche enzymatique (PDADMA/PSS)₅/PDADMA/AP.

Nous pouvons donc conclure qu'il n'a pas été possible d'enfouir de la phosphatase alcaline dans un film multicouche de polyélectrolytes PDADMA/PSS en raison d'un phénomène de désorption de l'enzyme lorsque le PSS est ajouté au cours de la construction. Cependant, l'immobilisation de cette enzyme sur la surface d'un film (PDADMA/PSS)_n/PDADMA et même l'enfouissement sous une couche PDADMA ont pu être réalisés pour donner des surfaces enzymatiques à base de multicouches de polyélectrolytes avec une activité catalytique relativement constante sur une période d'au moins 24h. Ceci souligne également tout l'intérêt d'utiliser le réservoir de PLL/HA pour enfouir la phosphatase alcaline à forte concentration et préserver son activité enzymatique (cf chapitre 4).

Annexe 4 : Films multicouches à base de fibres de cellulose

Description de l'étude

Au cours de ce travail, nous avons étudié la construction de films multicouches à base de poly(L-Lysine) (PLL) et de fibres de cellulose possédant des groupements carboxylates (KTH Solid Mechanics, Stockholm, Suède) dans le but de construire des membranes ayant des propriétés de biocompatibilité et/ou de biomimétisme. Nous avons utilisé différentes techniques de caractérisation pour suivre le dépôt couche par couche et déterminer des propriétés de structure comme l'état de surface et l'épaisseur (QCM-D, AFM, Ellipsométrie).

Résultats et discussion

Construction (QCM-D et AFM)

Tout d'abord, nous avons suivi par QCM-D, la construction couche par couche d'un assemblage constitué de 3 paires de couches (PLL/Cellulose). La **Figure A10** présente une augmentation régulière de la fréquence de résonance du cristal de quartz au cours des dépôts pour les trois harmoniques 15, 25 et 35 MHz. Ces résultats ont mis en évidence l'augmentation régulière de la quantité de matière déposée sur la surface après chaque injection.

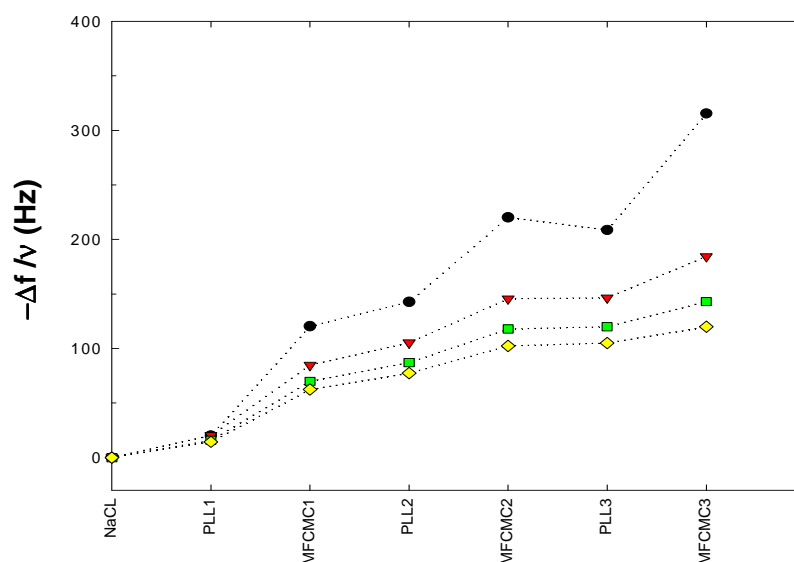
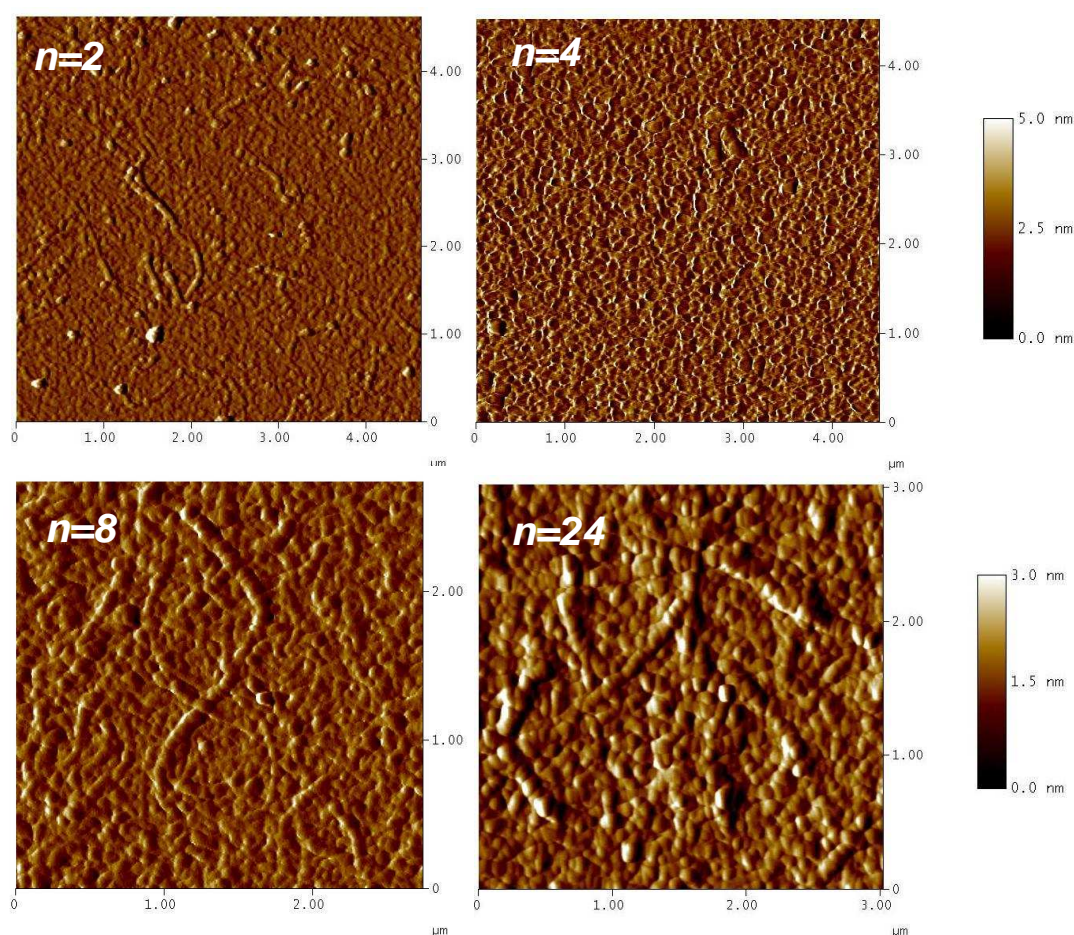


Figure A10. Expérience de QCM-D illustrant la construction d'un film (PLL/Cellulose)₃ pour la fréquence fondamentale (5 MHz) et les trois fréquences harmoniques (15, 25 et 35 MHz) de résonances du cristal de quartz.

Nous avons ensuite imagé par AFM la surface de plusieurs assemblages (PLL/Cellulose)_n ayant de 2 à 24 paires de couches. Ces images montrent qu'au cours de la construction, la surface se couvre de plus en plus de fibres de cellulose (**Figure A11**). Les polyélectrolytes s'adsorbent probablement sur ces fibres dont la taille peut atteindre quelques micromètres de longueurs pour quelques nanomètres d'épaisseurs.



Figures A11. Images AFM illustrant l'évolution de l'état de surface d'un film (PLL/cellulose) en fonction du nombre de couches déposées.

Mesures de l'épaisseur (Ellipsométrie et AFM)

Enfin, nous avons mesuré par ellipsométrie l'épaisseur des films (PLL/Cellulose) en fonction du nombre n de couches (**Figure A12.a**) et nous avons observé une croissance linéaire en fonction de n . Ces mesures ont également été réalisées par AFM (en raclant une partie du film au niveau de la zone imagée et en mesurant le profil entre la zone retirée et la zone intacte du film) et les résultats obtenus sont très reproductibles (**Figure A12.b**).

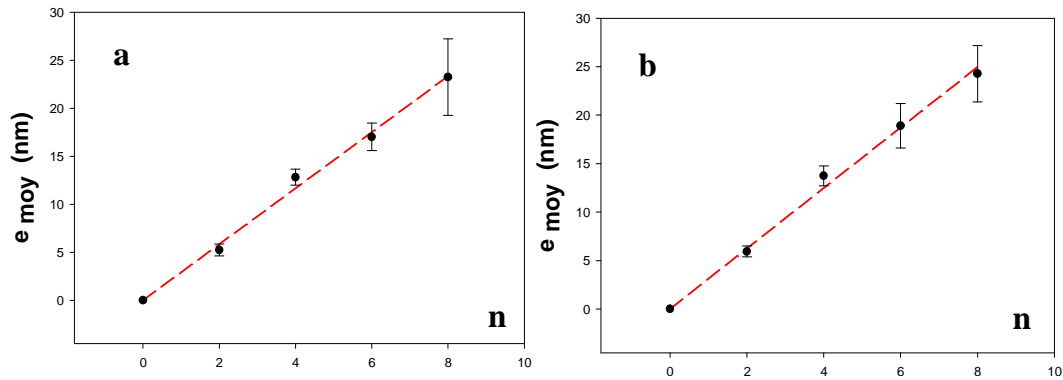


Figure A12. Evolution de l'épaisseur d'un film (PLL/Cellulose) en fonction du nombre de couches n déposées (a) par Ellipsométrie, (b) par AFM (via scratch de la surface).

Dans ce travail, nous avons montré qu'il était possible d'associer des fibres de cellulose avec des polyélectrolytes pour fabriquer des nano-assemblages fins de quelques dizaines de nm. La suite de ce travail consisterait notamment à déterminer les conditions expérimentales permettant le détachement de cette matrice de son substrat de dépôt sous la forme d'une membrane auto-supportée. D'autres fibres naturelles comme le collagène ou bien de l'élastine pourraient être également de bons candidats pour construire de tels assemblages en apportant de nouvelles propriétés mécaniques, chimiques ou biologiques.

Références bibliographiques

- Angelatos, A. S., B. Radt and F. Caruso (2005). "Light-responsive polyelectrolyte/gold nanoparticle microcapsules." Journal of Physical Chemistry B **109**(7): 3071-3076.
- Antipov, A. A., G. B. Sukhorukov, S. Leporatti, I. L. Radtchenko, E. Donath and H. Möhwald (2002). "Polyelectrolyte multilayer capsule permeability control." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **198**: 535-541.
- Arm, D. M. and A. F. Tencer (1997). "Effects of cyclical mechanical stress on the controlled release of proteins from a biodegradable polymer implant." Journal of Biomedical Materials Research **35**: 433-441.
- Caruso, F., E. Donath and H. Möhwald (1998). "Influence of polyelectrolyte multilayer coatings on Förster Resonance Energy Transfer between 6-carboxyfluorescein and rhodamine B-Labeled particles in aqueous solution." Journal of Physical Chemistry B **102**(11): 2011-2016.
- Caruso, F., K. Niikura, D. N. Furlong and Y. Okahata (1997). "2. Assembly of Alternating Polyelectrolyte and Protein Multilayer Films for Immunosensing." Langmuir **13**(13): 3427-3433.
- Chluba, J., D. L. de Souza, B. Frisch and F. Schuber (2001). "Enhancement of gene delivery by an analogue of alpha-MSH in a receptor-independent fashion." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1510**(1-2): 198-208.
- Collin, D., P. Lavalle, J. M. Garza, J.-C. Voegel, P. Schaaf and P. Martinoty (2004). "Mechanical properties of cross-linked hyaluronic acid/poly-(L-lysine) multilayer films." Macromolecules **37**(26): 10195-10198.
- Cortez, C., E. Tomaskovic-Crook, J. A. P. R., B. Radt, S. H. Cody, A. M. Scott, E. C. Nice, J. K. Heath and F. Caruso (2006). "Targeting and Uptake of Multilayered Particles to Colorectal Cancer Cells." Advanced Materials **18**(15): 1998-2003.
- Dahne, L., S. Leporatti, E. Donath and H. Möhwald (2001). "Fabrication of micro reaction cages with tailored properties." Journal of the American Chemical Society **123**(23): 5431-5436.
- Decher, G. (1997). "Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites." Science **277**(5330): 1232-1237.
- Decher, G., 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.

- Derbal, L., H. Lesot, J.-C. Voegel and V. Ball (2003). "Incorporation of alkaline phosphatase into layer-by-layer polyelectrolyte films on the surface of Affi-gel heparin beads: Physicochemical characterization and evaluation of the enzyme stability." Biomacromolecules **4**(5): 1255-1263.
- Dubas, S. T. and J. B. Schlenoff (1999). "Factors controlling the growth of polyelectrolyte multilayers." Macromolecules **32**: 8153-8160.
- Dubas, S. T. and J. B. Schlenoff (2001). "Polyelectrolyte Multilayers Containing a Weak Polyacid: Construction and Deconstruction." Macromolecules **34**(11): 3736.
- Eckle, M. and G. Decher (2001). "Tuning the Performance of Layer-by-Layer Assembled Organic Light Emitting Diodes by Controlling the Position of Isolating Clay Barrier Sheets." Nano Letters **1**(1): 45-49.
- Gao, C., E. Donath, S. Moya, V. Dudnik and H. Mohwald (2001). "Elasticity of hollow polyelectrolyte capsules prepared by the layer-by-layer technique." European Physical Journal E **5**(1): 21-27.
- Gao, C. Y., S. Leporatti, S. Moya, E. Donath and H. Mohwald (2001). "Stability and mechanical properties of polyelectrolyte capsules obtained by stepwise assembly of poly(styrenesulfonate sodium salt) and poly(diallyldimethyl ammonium) chloride onto melamine resin particles." Langmuir **17**(11): 3491-3495.
- Garza, J. M., N. Jessel, G. Ladam, V. Dupray, S. Muller, J.-F. Stoltz, P. Schaaf, J.-C. Voegel and P. Lavallo (2005). "Polyelectrolyte multilayers and degradable polymer layers as multicompartement films." Langmuir **21**(26): 12372-12377.
- Garza, J. M., P. Schaaf, S. Muller, V. Ball, J.-F. Stoltz, J.-C. Voegel and P. Lavallo (2004). "Multicompartement films made of alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth." Langmuir **20**(17): 7298-7302.
- Genzer, J. and K. Efimenko (2000). "Creating long-lived superhydrophobic polymer surfaces through mechanically assembled monolayers." Science **290**(5499): 2130-2133.
- Genzer, J., D. A. Fisher and K. Efimenko (2003). "Fabricating two-dimensional molecular gradients via asymmetric deformation of uniformly-coated elastomer sheets." Advanced Materials **15**: 1545.
- Glinel, K., 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**(12): 4898-4902.
- Green, A. E. S. and S. M. Sadrameli (2004). "Analytical representations of experimental polyethylene pyrolysis yields." Journal of Analytical and Applied Pyrolysis **72**(2): 329-335.

- Hemmerle, J., 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**(23): 10328-10331.
- Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate techniques. G. T. Hermanson. San Diego, Academic Press: 169-176.
- Hiller, J., J. D. Mendelsohn and M. F. Rubner (2002). "Reversibly erasable nanoporous anti-reflection coatings from polyelectrolyte multilayers." Nature Materials **1**(1): 59-63.
- Hoogeveen, N. G., M. A. Cohen Stuart, G. J. Fleer and M. R. Bohmer (1996). "Formation and Stability of Multilayers of Polyelectrolytes." Langmuir **12**(15): 3675 -3681.
- Iler, R. (1966). Journal of Colloid and Interface Science **21**: 569.
- Jaber, J. A. and J. B. Schlenoff (2005). "Polyelectrolyte multilayers with reversible thermal responsivity." Macromolecules **38**(4): 1300-1306.
- Jaber, J. A. and J. B. Schlenoff (2006). "Mechanical properties of reversibly cross-linked ultrathin polyelectrolyte complexes." Journal of the American Chemical Society **128**(9): 2940-2947.
- Jessel, N., F. Atalar, P. Lavalle, 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." Advanced Materials **15**(9): 692-695.
- Jomaa, H. W. and J. B. Schlenoff (2005). "Salt-induced polyelectrolyte interdiffusion in multilayered films: a neutron reflectivity study." Macromolecules **38**(20): 8473-8480.
- Köhler, K. and H. Möhwald (2006). "Thermal behavior of polyelectrolyte multilayer microcapsules: 2. Insight into molecular mechanisms for the PDADMAC/PSS System" Journal of Physical Chemistry B **110**: 24002-24010.
- Kotov, N. A., S. Magonov and E. Tropscha (1998). "Layer-by-layer self-assembly of aluminosilicate-polyelectrolyte composites: Mechanism of deposition, crack resistance, and perspectives for novel membrane materials." Chemistry of Materials **10**(3): 886-895.
- Kulcsar, A., J. C. Voegel, P. Schaaf and P. Kekicheff (2005). "Glassy state of polystyrene sulfonate/polyallylamine polyelectrolyte multilayers revealed by the surface force apparatus." Langmuir **21**(4): 1166-1170.
- Ladam, G., P. Schaad, J.-C. Voegel, P. Schaaf, G. Decher and F. Cuisinier (2000). "In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers." Langmuir **16**(3): 1249-1255.
- Laugel, N., C. Betscha, M. Winterhalter, J.-C. Voegel, P. Schaaf and V. Ball (2006). "Relationship between the growth of polyelectrolyte multilayers and the polyanion/polycation complexation enthalpy." Journal of Physical Chemistry B **110**: 19443-19449.

- Lavalle, P., F. Boulmedais, V. Ball, J. Mutterer, P. Schaaf and J.-C. Voegel (2005). "Free standing membranes made of biocompatible polyelectrolytes using the layer by layer method." Journal of Membrane Science **253**: 49-56.
- Lavalle, P., C. Gergely, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, J.-C. Voegel and C. Picart (2002). "Comparison of the structure of polyelectrolytes multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime : An in situ atomic force microscopy study." Macromolecules **35**: 4458-4465.
- Lavalle, P., C. Picart, J. Mutterer, C. Gergely, H. Reiss, J.-C. Voegel, B. Senger and P. Schaaf (2004). "Modeling the build-up of polyelectrolyte multilayer films having exponential growth." Journal of Physical Chemistry B **108**(2): 636-648.
- Liu, X. Y. and M. L. Bruening (2004). "Size-selective transport of uncharged solutes through multilayer polyelectrolyte membranes." Chemistry of Materials **16**(2): 351-357.
- Lösche, M. (1997). "Protein monolayers at interfaces." Current Opinion in Solid State and Materials Science **2**(5): 546-556.
- Lvov, Y., K. Ariga, M. Onda, I. Ichinose and T. Kunitake (1997). "Alternate assembly of ordered multilayers of SiO₂ and other nanoparticles and polyions." Langmuir **13**(23): 6195-6203.
- Lvov, Y. and F. Caruso (2001). "Biocolloids with ordered urease multilayer shells as enzymatic reactors." Analytical Chemistry **73**(17): 4212-7.
- Mamedov, A. A., N. A. Kotov, M. Prato, D. M. Guldi, J. P. Wicksted and A. Hirsch (2002). "Molecular design of strong single-wall carbon nanotube/polyelectrolyte multilayer composites." Nature Materials **1**(3): 190-194.
- McAloney, R. A., M. Sinyor, V. Dudnik and M. C. Goh (2001). "Atomic force microscopy studies of salt effects on polyelectrolyte multilayer film morphology." Langmuir **17**(21): 6655-6663.
- Mendelsohn, J. D., C. J. Barrett, V. V. Chan, A. J. Pal, A. M. Mayes and M. F. Rubner (2000). "Fabrication of Microporous Thin Films from Polyelectrolyte Multilayers." Langmuir **16**(11): 5017-5023.
- Mermut, O., J. Lefebvre, D. G. Gray and C. J. Barrett (2003). "Structural and mechanical properties of polyelectrolyte multilayer films studied by AFM." Macromolecules **36**(23): 8819-8824.
- Mertz, D., J. Hemmerle, F. Boulmedais, J. C. Voegel, P. Lavalle and P. Schaaf (2007). "Polyelectrolyte multilayer films under mechanical stretch." Soft Matter **3**: 1413-1420.
- Miller, M. D. and M. L. Bruening (2004). "Controlling the nanofiltration properties of multilayer polyelectrolyte membranes through variation of film composition." Langmuir **20**(26): 11545-11551.

- Mueller, R., K. Kohler, R. Weinkamer, G. Sukhorukov and A. Fery (2005). "Melting of PDADMAC/PSS capsules investigated with AFM force spectroscopy." Macromolecules **38**(23): 9766-9771.
- Muller, M., J. Vörös, G. Csucs, E. Walter, G. Danuser, H. P. Merkle, N. D. Spencer and M. Textor (2003). "Surface modification of PLGA microspheres." Journal of Biomedical Materials Research Part A **66A**(1): 55-61.
- Narvaez, A., G. Suarez, I. C. Popescu, I. Katakis and E. Dominguez (2000). "Reagentless biosensors based on self-deposited redox polyelectrolyte-oxidoreductases architectures." Biosensors & Bioelectronics **15**(1-2): 43-52.
- Onda, M., Y. Lvov, K. Ariga and T. Kunitake (1996). "Sequential reaction and product separation on molecular films of glucoamylase and glucose oxidase assembled on an ultrafilter." Journal of Fermentation and Bioengineering **82**(5): 502-506.
- Park, M. K., S. X. Deng and R. C. Advincula (2004). "pH-sensitive bipolar ion-permselective ultrathin films." Journal of the American Chemical Society **126**(42): 13723-13731.
- Picart, C., 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.
- Picart, C., 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." Microscopy Research and Technique **66**(1): 43-57.
- Picart, C., 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." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(20): 12531-12535.
- Richert, L., A. J. Engler, D. E. Discher and C. Picart (2004). "Elasticity of native and cross-linked polyelectrolyte multilayer films." Biomacromolecules **5**(5): 1908-1916.
- Ruths, J., F. Essler, G. Decher and H. Riegler (2000). "Polyelectrolytes I: Polyanion/Polycation Multilayers at the Air/Monolayer/Water Interface as Elements for Quantitative Polymer Adsorption Studies and Preparation of Hetero-superlattices on Solid Surfaces." Langmuir **16**(23): 8871-8878.
- Salomäki, M., I. A. Vinokurov and J. Kankare (2005). "Effect of temperature on the buildup of polyelectrolyte multilayers." Langmuir **21**(24): 11232-11240.
- Sauerbrey, G. (1959). "Verwendung von Schwingquartzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung." Z. Phys. **155**: 206-222.
- Schlenoff, J. B. and S. T. Dubas (2001). "Mechanism of Polyelectrolyte Multilayer Growth: Charge Overcompensation and Distribution." Macromolecules **34**(3): 592-598.

- Schlenoff, J. B., S. T. Dubas, T. W. Graul and H. Ly (2000). "Surface- and bulk-charge distribution in the control of polyelectrolyte multilayer buildup." Abstracts of Papers of the American Chemical Society **219**: U511-U511.
- Schneider, A., G. Francius, R. Obeid, P. Schwinte, J. Hemmerle, B. Frisch, P. Schaaf, J. C. Voegel, B. Senger and C. Picart (2006). "Polyelectrolyte multilayers with a tunable Young's modulus: Influence of film stiffness on cell adhesion." Langmuir **22**(3): 1193-1200.
- Schneider, G. and G. Decher (2004). "From functional core/shell nanoparticles prepared via layer-by-layer deposition to empty nanospheres." Nano Letters **4**(10): 1833-1839.
- Schwinté, P., 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." Journal of Physical Chemistry B **105**(47): 11906-11916.
- Serpe, M. J., K. A. Yarmey, C. M. Nolan and L. A. Lyon (2005). "Doxorubicin uptake and release from microgel thin films." Biomacromolecules **6**(1): 408-413.
- Shi, F. X., L. Wasungu, A. Nomden, M. C. A. Stuart, E. Polushkin, J. B. F. N. Engberts and D. Hoekstra (2002). "Interference of poly(ethylene glycol)-lipid analogues with cationic-lipid-mediated delivery of oligonucleotides; role of lipid exchangeability and non-lamellar transitions." Biochemical Journal **366**: 333-341.
- Shiratori, S. S. and M. F. Rubner (2000). "pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes." Macromolecules **33**(11): 4213-4219.
- Skirtach, A. G., A. A. Antipov, D. G. Shchukin and G. B. Sukhorukov (2004). "Remote activation of capsules containing Ag nanoparticles and IR dye by laser light." Langmuir **20**(17): 6988-6992.
- Sukhishvili, S. A. and S. Granick (2000). "Layered, erasable, ultrathin polymer films." Journal of the American Chemical Society **122**(39): 9550-9551.
- Sukhishvili, S. A. and S. Granick (2002). "Layered, erasable polymer multilayers formed by hydrogen-bonded sequential self-assembly." Macromolecules **35**: 301-310.
- Sukhorukov, G. B., A. Fery, M. Brumen and H. Mohwald (2004). "Physical chemistry of encapsulation and release." Physical Chemistry Chemical Physics **6**(16): 4078-4089.
- Sukhorukov, G. B., H. Möhwald, 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.
- Tang, Z. Y., N. A. Kotov, S. Magonov and B. Ozturk (2003). "Nanostructured artificial nacre." Nature Materials **2**(6): 413-418.

- Tao, N. J., G. P. Gao, M. Parr, J. Johnston, T. Baradet, J. M. Wilson, J. Barsoum and S. E. Fawell (2001). "Sequestration of adenoviral vector by Kupffer cells leads to a nonlinear dose response of transduction in liver." Molecular Therapy **3**(1): 28-35.
- Vautier, D., J. Hemmerle, C. Vodouhe, G. Koenig, L. Richert, C. Picart, J.-C. Voegel, C. Debry, J. Chluba and J. Ogier (2003). "3-D surface charges modulate protrusive and contractile contacts of chondrosarcoma cells." Cell Motility and the Cytoskeleton **56**(3): 147-158.
- Vazquez, E., D. M. Dewitt, P. T. Hammond and D. M. Lynn (2002). "Construction of hydrolytically-degradable thin films via layer-by-layer deposition of degradable polyelectrolytes." Journal of the American Chemical Society **124**(47): 13992-13993.
- Vodouhé, C., 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**(22): 4149-4156.
- Voinova, M. V., M. Rodahl, M. Jonson and B. Kasemo (1999). "Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces : continuum mechanics approach." Physica Scripta **59**: 391-396.
- Wood, K. C., H. F. Chuang, R. D. Batten, D. M. Lynn and P. T. Hammond (2006). "Controlling interlayer diffusion to achieve sustained, multiagent delivery from layer-by-layer thin films." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(27): 10207-10212.
- Zhang, J. T., L. S. Chua and D. M. Lynn (2004). "Multilayered thin films that sustain the release of functional DNA under physiological conditions." Langmuir **20**(19): 8015-8021.
- Zhu, H. G. and M. J. McShane (2005). "Macromolecule encapsulation in diazoresin-based hollow polyelectrolyte microcapsules." Langmuir **21**(1): 424-430.

LISTE des PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

D. Mertz, J. Hemmerlé, J. Mutterer, S. Ollivier, J.-C. Voegel, P. Schaaf, P. Lavalley, “*Mechanically Responding Nanovalves Based on Polyelectrolyte Multilayers*”, **Nano Letters**, 2007, 7, 657.

D. Mertz, J. Hemmerlé, F. Boulmedais, J.-C. Voegel, P. Lavalley, P. Schaaf, “*Polyelectrolyte Multilayer Films under Mechanical Stretch*”, **Soft Matter**, 2007, 3, 1413.

A. Reisch, J. Hemmerlé, J.-C. Voegel, E. Gonthier, G. Decher, N. Benkirane-Jessel, A. Chassepot, **D. Mertz**, P. Lavalley, P. Mésini, P. Schaaf, “*Polyelectrolyte Multilayer Coatings that Resist Protein Adsorption at Rest and under Stretching*”, **Journal of Materials Chemistry**, 2008, in press.

D. Mertz, J. Hemmerlé, J.-C. Voegel, P. Schaaf, P. Lavalley, “*Tuneable Permeability of Enzymatic Reservoir/Barrier Systems Made of Polyelectrolyte Multilayers*”, **in preparation**.

D. Mertz, C. Vogt, J. Hemmerlé, J.-C. Voegel, P. Lavalley, P. Schaaf, “*Cryptic Site Surfaces Inspired by Mechanotransduction Proteins for Biocatalysis Modulation*”, **in preparation**.

BREVET

Patent EU n°07290126.7 (2007): « *Mechanically Responsive Supported Polyelectrolyte Multilayer Films* »,

P. Lavalley, **D. Mertz**, J. Hemmerlé, J.-C. Voegel, P. Schaaf.

Extension aux Etats-Unis et à l’International en cours.

COMMUNICATIONS

- Workshop with the Laboratory of Biosensors and Bioelectronics ETH Zurich, Switzerland, “Liposomes, Polyelectrolytes and Surface Treatment”, Albé, France, Mai 2007. “*Polyelectrolyte Multilayer Films under Mechanical Stretch*” (Présentation orale).

D. Mertz, J. Hemmerlé, J.-C. Voegel, P. Schaaf, P. Lavallo.

- NanoBio-Europe 2007 congress, Muenster, Germany, June 2007, “*Mechanically Responding Nanovalves Based on Polyelectrolyte Multilayers*” (Présentation orale).

D. Mertz, J. Hemmerlé, J.-C. Voegel, P. Schaaf, P. Lavallo.

- Trends in Nanotechnology 2007 congress, San Sebastian, Spain, September 2007, “*Mechanically Responding Polymeric Assemblies*”, (Poster).

D. Mertz, J. Hemmerlé, J.-C. Voegel, P. Schaaf, P. Lavallo.

- 6th Forum of the Japanese Society for the Promotion of Science: “Chemical and Physical Nanobiology for Medecine”, ISIS Strasbourg, France, November 2007 “*Mechanically Responding Polymeric Assemblies*”, (Poster).

D. Mertz, J. Hemmerlé, J.-C. Voegel, P. Schaaf, P. Lavallo.

- 4th Meeting on Bioengineering and Biotherapies, Nancy, France, September 2007, “*Mechanically Responding Polymeric Assemblies*” (Poster).

D. Mertz, J. Hemmerlé, J.-C. Voegel, P. Schaaf, P. Lavallo.

Le dépôt alterné de polyanions et de polycations sur des surfaces solides, mène à la formation de films minces appelés *multicouches de polyélectrolytes*. De tels films sont envisagés pour constituer une nouvelle génération de revêtements actifs appelés *surfaces adaptatives*, c'est-à-dire qui répondent de façon spécifique à des stimuli extérieurs (tels que le pH, la température ou la lumière). Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié le comportement sous contrainte mécanique, de films multicouches de polyélectrolytes déposés sur des feuilles élastomères en silicone. L'objectif a été le développement de systèmes à réponse biologique ou chimique sous l'action de forces mécaniques.

L'étude s'est déroulée en deux parties :

i) Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à ouvrir la barrière de films à multi-compartiments (systèmes composés de strates alternées réservoir/barrière), par application de contraintes d'étirement. Nous avons montré que des barrières à base de multicouches pouvaient agir comme des nanovalves à commande mécanique, permettant ainsi la libération contrôlée de molécules d'un réservoir à l'autre.

ii) Dans un second temps, nous avons élaboré des assemblages réservoir/barrière contenant une enzyme, la phosphatase alcaline. Le but a été le développement de surfaces biocatalytiques dont l'activité enzymatique est modulée par des forces mécaniques imposées. L'activité catalytique a pu être masquée par l'utilisation d'une barrière imperméable, bloquant l'accès du substrat enzymatique initialement en solution vers l'enzyme enfouie dans le film. L'application d'un étirement mécanique a permis finalement de déclencher et également de moduler la biocatalyse.

Mots Clés : Multicouches de polyélectrolytes ; Nano-assemblages ; Mécanotransduction ; Nanovalves ; Biocatalyse contrôlée ; Biosurfaces fonctionnelles.

The alternate deposition of polyanions and polycations on charged surfaces leads to the formation of nanostructured films called *polyelectrolyte multilayers (PEM)*. Such films may constitute a new generation of active coatings leading to *adaptive surfaces*, aimed to induce a specific response to external stimuli (such as pH, temperature or light). In this work, we investigated the behavior under mechanical stimuli, of functional PEM films deposited on elastomeric silicone sheets. The aim was to design chemically or biologically active films responding to mechanical forces.

The study was divided in two parts :

i) First, we studied the barrier opening of multi-compartment films (systems composed of reservoir/barrier strata) induced by mechanical stretching. We demonstrated that multilayer barriers could act as nanovalves, reversibly controlled by stretching, allowing thus the controlled release of molecules from a reservoir to another.

ii) Then in a second step, we designed reservoir/barrier systems containing an enzyme, alkaline phosphatase, in order to develop surfaces with biocatalytic activities tuned by mechanical forces. The enzymatic activity could be switched off by the use of an impermeable barrier blocking the diffusion of the enzymatic substrates initially in solution to the embedded enzyme. Finally, by applying a mechanical stretching on these systems, the biocatalysis could be to triggered and even modulated.

Keywords : Polyelectrolyte multilayers ; Nano-assemblies ; Mechanotransduction ; Nanovalves ; Biocatalysis control ; Functional biosurfaces.