

- Thèse présentée pour obtenir le grade de
 - Docteur de l'Université de Strasbourg
 -
 -
- Discipline :
SCIENCES ODONTOLOGIQUES

NANOSTRUCTURATIONS DE FILMS MULTICOUCHES DE POLYÉLECTROLYTES

Nadia LADHARI

Laboratoire de rattachement : UMR INSERM 977

Soutenue publiquement le 2 février 2009

JURY

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur V. BALL
Co-directeur de thèse : Monsieur le Docteur J. HEMMERLÉ
Rapporteur interne : Monsieur le Professeur G. DECHER
Rapporteur externe : Monsieur le Professeur M. DEGRANGE
Rapporteur externe : Monsieur le Professeur F. MEMBREY
Examineur : Monsieur le Professeur M. WINTERHALTER
Membre invité : Madame le Professeur C. TADDÉI

Remerciements

Mes travaux ont été effectués au sein de l'Unité 977 de l'INSERM (anciennement Unité 595) à Strasbourg spécialisée dans le domaine des biomatériaux et de l'ingénierie tissulaire. Je tiens avant tout à remercier très sincèrement Monsieur le Docteur Jean-Claude Voegel, Directeur du laboratoire, de m'avoir accueillie dans sa structure.

D'autre part, je tiens à témoigner toute ma gratitude à Monsieur le Professeur Youssef Haïkel, Doyen de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg, pour sa confiance et pour m'avoir accueillie dans ses locaux et m'avoir permis d'exercer en tant qu'Assistant-Hospitalo-Universitaire.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance au Professeur Vincent Ball, pour sa passion pour la science qu'il a la générosité de faire partager, pour sa patience, sa disponibilité, son accompagnement sans faille, sa sympathie et son humour !

Je remercie très vivement le Docteur Joseph Hemmerlé, Ingénieur de recherche à l'INSERM, pour son encadrement, ses compétences, nos discussions et sa gentillesse.

Je suis très sensible à l'honneur que me font les membres du Jury en acceptant de juger ma thèse. Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Monsieur Michel Degrange, Professeur à l'Université Paris Descartes (Paris V), à Monsieur Gero Decher, Professeur à l'Université Louis Pasteur (Strasbourg), et Monsieur François Membrey, Professeur à l'Université de Franche Comté, d'avoir accepté d'intervenir en tant que rapporteurs de ce travail.

J'adresse toute ma reconnaissance à Monsieur Mathias Winterhalter, Professeur de la Jacobs University Bremen (Allemagne), qui s'est joint à ce jury en tant qu'examineur.

J'aimerais témoigner ma sincère reconnaissance à Madame Corinne Taddéi, Professeur à l'Université Louis Pasteur (Strasbourg) qui m'a accueillie dans le Département de Prothèse Adjointe et qui me fait l'honneur de siéger dans ce jury de thèse.

Cette étude est l'aboutissement d'un travail d'équipe. Aussi, je souhaite remercier tous les membres de l'unité 977, intervenants directs ou indirects qui m'ont encouragée et soutenue durant la réalisation de ce travail, et avec lesquels j'ai partagé quelques moments de détente.

Je remercie tout particulièrement les chercheurs permanents pour leur apport scientifique et technique et leur sympathie : Philippe, Bernard, Nadia, Dominique, Joëlle.

J'aimerais également témoigner ma sympathie profonde pour mes compagnons de bureau, pour les thésards et techniciens, chercheurs de passage, anciens et nouveaux : Damien, Laurent, Greg, Sabine M., Hajare, Armelle, Cosette, Marion, Christian, François, Fouzia, Falk, Cédric, Thomas, Sandra, Leyla, Maria, Florence, Géraldine, Christine, Sabine K., Alae, Hervé, Eric, Riadh, Florian, Florent, Constant, Erell, Dimitri, Christiane, Yves, Jean-Jacques, Alexandrine, Adnan, Ludo...pour l'ambiance chaleureuse qu'ils ont contribué à apporter au laboratoire.

Bien-sûr je n'oublie pas mes amis de DEA : Marine, Vanessa, Julien, Emilie, Annabelle et leurs moitiés, pour les moments studieux et amicaux que nous partageons toujours.

Ces trois dernières années ont aussi été l'occasion pour moi d'enseigner à la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg. Aussi j'adresse mes remerciements aux personnes avec lesquelles j'ai partagé des moments tant amicaux que professionnels : Béatrice Walter, Pascal Herr, Philippe Doucet, Jean-Christophe Dahlet, Véronique Kaupp, Michelle Miss, Danièle, Aurore, Sophie, Kenza,...

Enfin je terminerai en remerciant mes proches : mes Parents, Titeuf, mes Sœurs, mes Beaux-frères, mes Neveux et Nièces, ma Tante, mon Oncle et sa femme ainsi que toute ma famille, pour leur aide et leur soutien.

Je pense aussi aux amis précieux qui m'ont encouragée : Pierre et Caro, Maud et Didier, Jacquy, Olivier et Danièle, Laurence, Nono.

Table des matières

<i>Remerciements</i>	03
<i>Table des matières</i>	05
<i>Introduction</i>	09

CHAPITRE 1:Revue Bibliographique

1.1 Les films multicouches de polyélectrolytes	14
1.1.1 Construction des films multicouches.....	14
1.1.2 Modes de croissance des films multicouches	17
1.1.3 Influence des paramètres physico-chimiques de la solution sur la croissance des films multicouches de polyélectrolytes.	19
1.2 Nanostructuration par impression de motifs	21
1.2.1 Principe du micro-usinage par lithographie (<i>hard lithography</i>).....	22
1.2.2 Principe de la lithographie douce (<i>soft lithography</i>)	23
1.2.3 La micro ou nano compression de films multicouches (<i>embossing</i>)	26
1.3 Incorporation de molécules dans les films multicouches	28
1.3.1 Insertion de molécules biologiques par simple dépôt.....	29
1.3.2 Insertion de molécules biologiques par greffage covalent	30
1.3.3 Chargement et libération de molécules par absorption dans le volume du film .	30
1.3.4 Une protéine d'intérêt : l'insuline.....	34

CHAPITRE 2 : Matériels et Méthodes

2.1 Matériels, construction des échantillons	40
2.1.1 Molécules et solutions utilisées	40
2.1.2 Construction des films multicouches de polyélectrolytes	46
2.1.3 Impression des films multicouches de polyélectrolytes	51
2.1.4 Chargement des films en insuline.....	59

2.2 Méthodes de caractérisation et d'analyse	60
2.2.1 La microscopie	60
2.2.2 L'ellipsométrie	68
2.2.3 Les techniques spectroscopiques	70
2.2.4 Mesures d'angle de contact	76

***CHAPITRE 3 : Microimpressions de canaux dans des films
multicouches de polyélectrolytes***

3.1 Résumé	78
3.2 Article 1	82

***CHAPITRE 4 : Fonctionnalisation des films multicouches par des
nanoparticules de TiO₂***

4.1 Fabrication de nanoparticules de TiO₂	92
4.1.1 Résumé	92
4.1.2 Article 2	94
4.2 Films compartimentés fonctionnalisés avec des nanoparticules de TiO₂.....	101
4.2.1 Résumé	101
4.2.2 Article 3	103
4.3 Résultats complémentaires	109

***CHAPITRE 5 : Incorporation d'insuline dans des films
multicouches de polyélectrolytes***

5. 1. Caractérisation des films (PDADMAC-PAA)_n.....	114
5.1.1 Suivi de la croissance du film par ellipsométrie.....	114
5.1.2 Observation de la morphologie des films par AFM	116
5.1.3 Observation de coupes en microscopie électronique à balayage.....	119

5.2 Cinétique de chargement et de libération d'insuline dans des films (PDADMAC-PAA)_n	120
5.2.1 Cinétique de chargement	120
5.2.2 Cinétique de libération	127
5.3 Etude de l'incorporation d'insuline dans d'autres systèmes de films multicouches de polyélectrolytes	133
5.3.1 Le système (PLL-HA) ₃₀	133
5.3.2 Le système (PDADMAC-PSS) ₃₀	135
<i>Conclusions et perspectives</i>	<i>139</i>
<i>Bibliographie</i>	<i>143</i>
<i>Liste des publications et communications</i>	<i>153</i>

Introduction Générale

Les méthodes de fonctionnalisation de surface sont d'une importance capitale dans tous les domaines de la technologie des matériaux. On peut citer, entre autres, les recouvrements de protection contre la corrosion, les adhésifs visant à améliorer l'adhésion entre deux matériaux de natures différentes, les revêtements décoratifs et la fonctionnalisation des biomatériaux. La recherche de méthodes de fonctionnalisation efficaces et robustes remonte au début de l'histoire de la technologie. Ces travaux, longtemps très empiriques, n'ont conduit à des résultats reproductibles qu'à partir du moment où les interactions entre la surface à fonctionnaliser et les molécules utilisées ont été comprises au niveau moléculaire. Cette étape très importante a été franchie au début du vingtième siècle avec les travaux de I. Langmuir. Les méthodes de recouvrement développées par son groupe ont consisté à utiliser des molécules amphiphiles et à les transférer d'une interface air/eau à une interface solide/liquide ou solide/gaz. Ces méthodes, ainsi que celles consistant à greffer d'une manière covalente des chaînes aliphatiques sur des surfaces d'oxydes ou de métaux nobles, nécessitent une instrumentation sophistiquée, de grandes précautions expérimentales, et ne permettent pas d'obtenir facilement des dépôts excédant celui d'une monocouche.

L'idée d'utiliser des interactions électrostatiques entre des molécules ou des colloïdes portant des densités de charges de signe opposé, a été une révolution car elle a permis de déposer des films d'épaisseur contrôlée, excédant celle de la monocouche, sur la plupart des substrats solides. En effet, la plupart des métaux et des oxydes possèdent une densité de charges électrostatiques en milieu aqueux. La validité du concept du dépôt de multicouches par adsorptions alternées d'espèces chargées a d'abord été démontrée par Iler avec des particules de silice. Mais l'absence de techniques de caractérisation permettant de vérifier l'homogénéité et la croissance contrôlée de films minces, explique que la découverte d'Iler soit passée inaperçue pendant plus de trente ans. Les premiers travaux de G. Decher, au début des années 1990, ont permis de démontrer que le concept du dépôt alterné d'espèces chargées pouvait être généralisé à des ions moléculaires et des polyélectrolytes. L'évolution des connaissances concernant les mécanismes mis en jeu, *a permis d'étendre le concept aux dépôts de molécules portant des fonctionnalités complémentaires*, par exemple des donneurs et des accepteurs de liaisons hydrogènes.

L'état des connaissances dans ce domaine est tel que l'on prend conscience du potentiel de ces dépôts d'épaisseur contrôlée dans le domaine des nanotechnologies. Les films multicouches de polyélectrolytes peuvent être utilisés comme membranes de filtration perm-sélectives, comme supports de catalyseurs, comme milieux confinés permettant de stocker et de libérer des médicaments... Il est même possible de confiner des réactions chimiques au sein du volume des films multicouches de polyélectrolytes.

Les perspectives de ces matériaux sont donc énormes dans tous les domaines des nanotechnologies et en particulier dans celui de la fonctionnalisation des biomatériaux avec des « nano-objets ». Au sein de l'unité Inserm 595, de nombreux travaux précurseurs ont été effectués dans ce sens. Ces travaux ont montré la faisabilité de :

- (1) l'incorporation de molécules induisant une réponse cellulaire contrôlée au contact des films multicouches,
- (2) l'incorporation et la libération de médicaments,
- (3) l'incorporation de « nano-réacteurs » permettant de produire des phosphates de calcium
- (4) la compartimentation conférant une organisation du film dans la direction perpendiculaire au substrat sur la multicouche déposée.

Le problème d'une structuration à la fois dans la direction perpendiculaire et dans les directions parallèles au substrat n'a été que très peu abordé dans la littérature scientifique. L'objectif de mon travail de thèse a été de développer des méthodes simples permettant de conférer une organisation, à l'échelle microscopique ou nanoscopique, aux films multicouches de polyélectrolytes. Notre idée a été d'exploiter les propriétés mécaniques ainsi que la réponse des films multicouches à des variations de pressions osmotiques, pour créer respectivement une structuration en « x,y » et un dépôt ou une infiltration de nanoparticules (dioxyde de titane ou protéines) en « z ». Une des originalités de ce travail a consisté à produire des nanoparticules de dioxyde de titane par polycondensation à partir d'un précurseur hydrosoluble, lorsque celui-ci entre en interaction avec un polycation déjà adsorbé à l'interface solide/liquide.

La première partie de ce travail expose d'abord l'état des connaissances à la fois dans le domaine de la structuration de la surface des matériaux (allant de l'échelle du micromètre à

celle du nanomètre), et dans celui des phénomènes d'absorption de substances actives par des films multicouches.

La seconde partie décrit les méthodes et protocoles mis en œuvre au cours de cette recherche. Nous avons notamment mis au point un dispositif expérimental permettant l'impression de microstructures dans les films multicouches de polyélectrolytes.

Les chapitres 3, 4 et 5 résument l'ensemble des résultats obtenus et contiennent les différentes publications qui résultent de nos études.

Finalement nous ferons le point sur les conclusions et les perspectives laissées ouvertes par ce travail.

CHAPITRE 1:Revue Bibliographique

1.1 Les films multicouches de polyélectrolytes

1.1.1 Construction des films multicouches

1.1.2 Modes de croissance des films multicouches

1.1.3 L'essentiel des propriétés physico-chimiques

1.2 Nanostructuration par impression de motifs

1.2.1 Principe du micro-usinage par lithographie (*hard lithography*)

1.2.2 Principe de la lithographie molle (*soft lithography*)

1.2.3 Micro et nano compression de motifs dans des films multicouches (*embossing*)

1.3 Incorporation de molécules dans les films multicouches

1.3.1 Insertion de molécules biologiques par simple dépôt

1.3.2 Insertion de molécules biologiques par greffage covalent

1.3.3 Chargement et libération de molécules par « absorption » dans le volume du film

1.3.4 Une protéine d'intérêt : l'insuline

1.1 Les films multicouches de polyélectrolytes

1.1.1 Construction des films multicouches

Historique

Les premiers films minces nanostructurés ont été élaborés au début du siècle dernier selon la technique de « Langmuir » ou « Langmuir-Blodgett ». Cette méthode consiste à construire un film monocouche de molécules tensioactives ou amphiphiles à une interface air/eau par compression, puis à la transférer par adsorption sur un substrat solide (Blodgett **1934**; Blodgett **1937**) (**figure 1.1**).

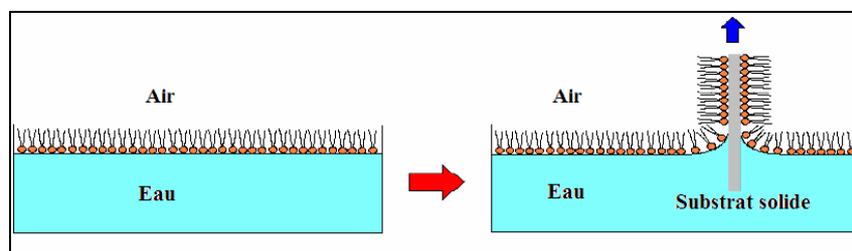


Figure 1.1 Principe du transfert d'une monocouche par la méthode de Langmuir.

La vitesse de transfert d'une monocouche influence beaucoup la qualité du dépôt, elle est contrôlée par la vitesse de déplacement du substrat monté sur une platine motorisée. Le film lipidique à l'interface solide/liquide doit être comprimé lors du transfert sur le substrat afin que les pertes de molécules à cette interface ne modifient pas l'état du film lipidique. Pour cela on utilise une barrière mobile (non représentée sur la figure 1.1) afin de maintenir la pression interfaciale, définie comme la différence entre les tensions superficielles des interfaces eau/air et lipide/air à une valeur constante. Cette pression interfaciale est mesurée à l'aide d'un tensiomètre, par exemple une balance de Wilhelmy.

La formation de ces films présente de nombreux inconvénients tels que leur instabilité, les restrictions de topographie liées au substrat qui doit nécessairement être plane, et la nécessité de travailler dans une atmosphère contrôlée. De plus il est difficile d'obtenir des dépôts consistant en des multicouches de molécules amphiphiles en raison de la faiblesse des interactions mises en jeu. C'est pour cette raison qu'a été développé le concept des monocouches autoassemblées, ou « Self assembled monolayers ». Cette méthode consiste à fixer *une molécule amphiphile de manière covalente* sur une surface solide (Maoz 1988). La

tête polaire de la molécule amphiphile doit posséder un groupement capable de former des liaisons covalentes avec des groupements chimiques du substrat. Cette contrainte constitue à la fois la force et la faiblesse de la méthode. En effet seuls un certain nombre de groupements sont capables de se fixer soit sur les sites réactifs d'un métal soit sur ceux d'un oxyde. De ce fait il n'est pas possible de fonctionnaliser n'importe quel type de matériau de cette manière.

En 1966, Iler a montré qu'il était possible de créer des films multicouches par adsorption successives de colloïdes anioniques et cationiques (Iler 1966). Ce travail a peu intéressé la communauté scientifique, 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) Nous allons décrire maintenant le principe de cette méthode d'adsorption séquentielle d'espèces portant des charges de signes opposés.

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. Les interactions de type liaison hydrogène et les interactions de type Van der Waals contribuent néanmoins de façon significative à la variation de l'énergie libre du système (constitué par le solvant, les polyélectrolytes et leurs contre-ions) (Kotov 1999). Les variations d'entropie contribuent également fortement à la variation de l'énergie libre du système (Laugel 2006).

Le principe de la mise en œuvre de la méthode LbL est décrit schématiquement dans la **figure 1.2**. Le substrat chargé positivement (ou négativement) est plongé pendant quelques minutes (5 ou 10) dans une solution de polyélectrolytes portant une densité de charge de signes opposés à celle du substrat (Advincula et al. 1996 ; Ramsden et al. 1995). Les polyélectrolytes présents dans la solution s'adsorbent à la surface du substrat. L'excédent de polyélectrolytes est éliminé par simple rinçage. La surcompensation des charges durant cette première adsorption entraîne une inversion du signe de la charge totale de la surface (Caruso et al. 1998; Ladam et al. 2000).

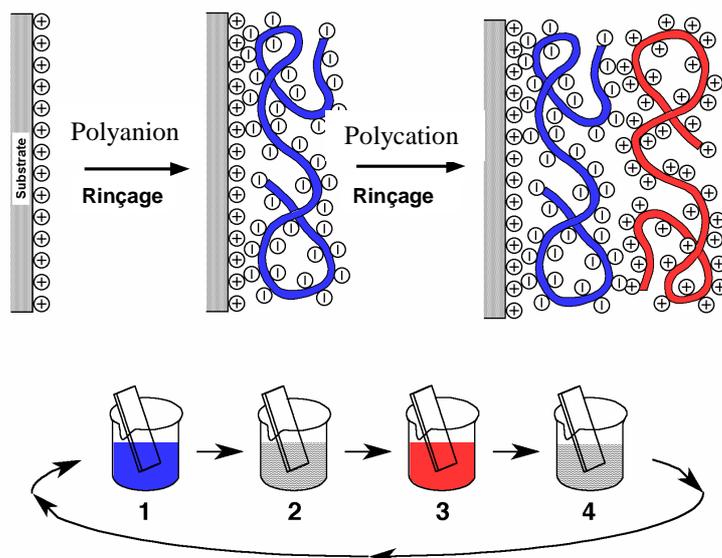


Figure 1.2 Principe de construction des films multicouches de polyélectrolytes. Dans le cas illustré ici, le substrat est chargé positivement en surface. Le premier dépôt consiste à plonger le substrat dans une solution de polyanions (représentés en bleu), puis un second dépôt consiste à le plonger dans une solution de polycations (représentés en rouge) (Decher 1997).

Différentes méthodes de dépôt

Il existe plusieurs techniques de dépôt pour construire des films multicouches. La méthode classique de dépôt est celle du procédé d'immersion en solution, ou « dip-coating » ou « dipping », qui consiste à tremper le substrat alternativement dans les solutions de polycations et de polyanions, chaque passage dans un bain de polyélectrolytes étant suivi d'une étape de rinçage avec le solvant. Cette méthode de dépôt peut être facilement automatisée par l'utilisation d'un bras automatisé portant l'échantillon à recouvrir par le film multicouche, mais elle est très lente à mettre en oeuvre. Le dépôt d'une paire de couches (constituée par le dépôt d'une paire polycation/polyanion) prend 20 à 40 minutes.

Une technique de dépôt a donc été développée en vue de former des films ayant des caractéristiques similaires mais plus rapidement. Il s'agit d'un procédé utilisant un nébuliseur. Les solutions de polycations et de polyanions sont alors nébulisées alternativement ainsi que la solution de rinçage entre chaque couche. Schlenoff et al. (2000) ont comparé la construction de films poly(diallyldiméthylammonium)/poly(styrène sulfonate) (PDADMA/PSS), en présence de solutions NaCl à 1M, réalisés soit par immersion soit par nébulisation. Ces chercheurs ont montré que les spectres infrarouges ainsi que la perméabilité aux ions étaient identiques pour les deux méthodes de dépôts. Ainsi, le temps de dépôt d'une

paire de couche peut être réduit en utilisant la méthode de nébulisation. Le dépôt d'une paire de couches prend alors moins de 1 minute. Des expériences effectuées par des équipes strasbourgeoises montrent cependant que les films obtenus par nébulisation sont moins épais que ceux obtenus par « dipping » (Izquierdo 2005, Porcel 2006).

Notons que le « dépôt à la tournette » permet également de réaliser des films multicouches de polyélectrolytes (Chiarelli 2001), dont la transparence est souvent bien meilleure que celle des films obtenus par dipping (Seo 2008).

Nature du substrat

La construction de multicouches par la méthode LbL peut être effectuée sur bon nombre de substrats. Les supports les plus souvent utilisés sont des surfaces planes ou des particules sphériques colloïdales, de nature minérale (verre, silice, oxyde d'indium), métallique (or, argent,..) ou organique (particules de polystyrène, de résine mélamine, de polymères,..). Des élastomères non chargés en surface, tels que le poly(diméthylsiloxane) (PDMS) permettent également le dépôt de films multicouches. Dans ce cas ce sont des interactions de type Van der Waals ou/et hydrophobes qui assurent l'adsorption de la première couche de polyélectrolytes sur ce support.

1.1.2 Modes de croissance des films multicouches

Depuis une dizaine d'années, l'étude de la cinétique de croissance des films multicouches de polyélectrolytes a permis d'identifier deux modes de croissance : 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 1.3**).

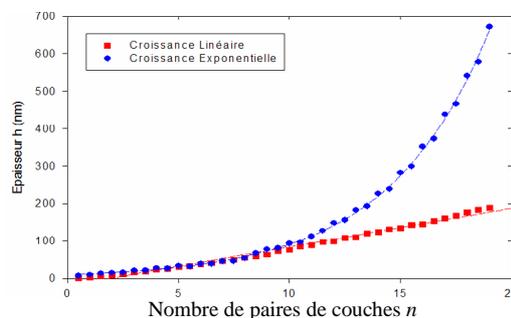


Figure 1.3 Modes de croissance des films multicouches. Croissance exponentielle d'un film (PLL/PSS) et croissance linéaire d'un film (PSS/PAH) suivies par microbalance à cristal de quartz (QCM-D). Les conditions expérimentales (pH, température, concentration saline de l'électrolyte support, temps de dépôt par couche) ont été les mêmes pour les deux expériences.

Les films à croissance linéaire

Les films multicouches à croissance linéaire sont caractérisés 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 par réflectivité des neutrons, réalisées sur des films construits avec des polyélectrolytes deutérés, ont mis en évidence l'existence d'une structure pseudo-stratifiée (Decher 1997; Lösche 1997) avec interpénétration des couches voisines. Cette interpénétration entre les couches adjacentes au niveau de l'interface, permet à chaque strate d'être solidaire de ses voisines. Ce désordre local a été 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 et Rubner 2000) ou encore poly(diallyldiméthylammonium)/poly(styrène sulfonate) (PDADMA/PSS), (Dubas et Schlenoff 1999). Cependant dans le cas où l'un des polyélectrolytes présente une densité de charges dépendant du pH, la croissance du film est fortement dépendante de ce paramètre. L'épaisseur du film atteint alors une valeur maximale lorsque le « polyélectrolyte faible » présente une densité de charge très faible : il faut en adsorber beaucoup pour permettre au signe de la densité de charge de s'inverser.

Les films à croissance exponentielle

Les premiers films étudiés présentaient une croissance linéaire de la masse et de l'épaisseur en fonction du nombre de dépôts. En augmentant le taux de sel dans les solutions de polyélectrolytes certains auteurs ont obtenu une croissance de films plus rapide que la croissance linéaire et l'ont appelée croissance « supra linéaire ». Ils ont attribué ce type de croissance à l'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. Par la suite, des films à croissance exponentielle ont été mis en évidence. En effet, des films construits à partir de deux polypeptides comme le système (poly(L-lysine)/poly(acide-L-glutamique)) (PLL/PGA) ou avec un polypeptide et un polyélectrolyte naturel, comme la poly(L-lysine) et l'acide hyaluronique (PLL/HA), peuvent atteindre des épaisseurs de un à plusieurs micromètres après le dépôt d'une vingtaine de paires de couches (Picart et al. 2001; Lavallo et al. 2002; Picart et al. 2002; Boulmedais 2004). De telles épaisseurs permettent d'utiliser la microscopie confocale à balayage laser associée à un marquage fluorescent pour suivre la construction du

film et comprendre le mécanisme de construction. Ces études ont pu expliquer la croissance exponentielle par un phénomène de diffusion dans tout le film d'au moins un des polyélectrolytes, constituant un réservoir de charges en excès capable d'augmenter le nombre de complexations à chaque dépôt du polyélectrolyte de charge opposée.

1.1.3 Influence des paramètres physico-chimiques de la solution sur la croissance des films multicouches de polyélectrolytes.

La méthode de dépôt LbL est basée essentiellement sur les interactions électrostatiques qui existent entre des espèces anioniques et cationiques. Hormis les interactions électrostatiques, des forces secondaires à courte distance ont également une influence sur l'épaisseur et la morphologie finale (Kotov 1999). Des études ont permis d'approfondir la compréhension du rôle des interactions électrostatiques et de leurs combinaisons avec d'autres types d'interaction, comme les interactions hydrogènes et hydrophobes (Sukhishvili et Granick 1998 ; Wang et al. 2000). D'autres travaux ont mis en évidence l'influence de paramètres tels que la nature du solvant, le pH, la force ionique ou la température sur les propriétés physicochimiques et morphologiques des films multicouches.

Notons à titre d'exemple, l'influence de la force ionique et de la température des solutions lors de la construction des films poly(diallyldiméthylammonium)/poly(styrène sulfonate) (PDADMA/PSS). Mc Aloney et al. (2001) (**figure 1.4**) ont montré que lorsque le taux de sel est augmenté, la croissance de tels films passe d'une croissance linéaire, à une croissance qualifiée de *supra linéaire* jusqu'à atteindre une croissance réellement exponentielle.

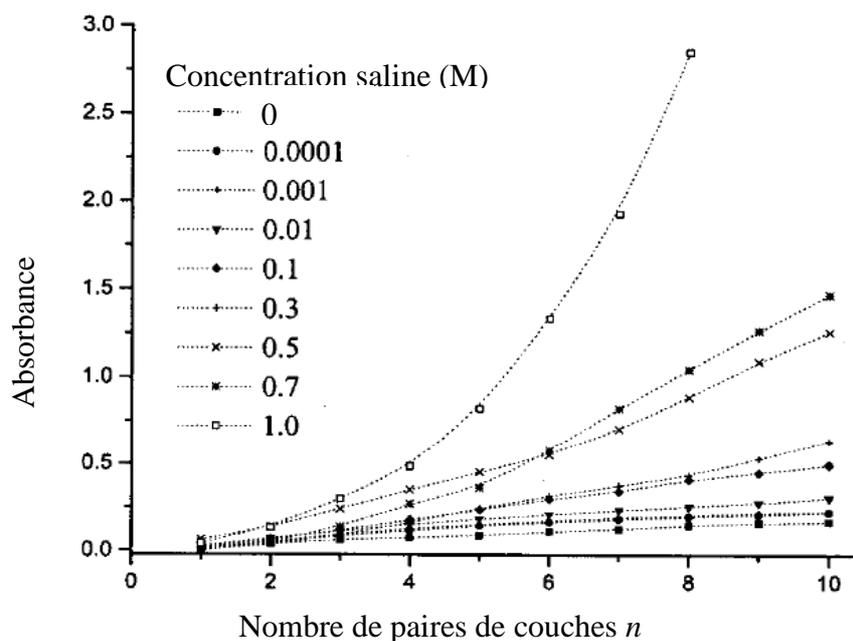


Figure 1.4 : Evolutions de l'absorbance à $\lambda = 217$ nm (position du maximum dans le spectre d'absorption du PSS) par spectrophotométrie UV/visible lors de la construction d'un film (PDADAMA/PSS) $_n$ pour différentes concentrations molaires en NaCl (McAloney et al. 2001).

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 abaissée à 25 °C, le régime de dépôt devient linéaire avec le nombre de paires de couches. Si la température repasse à 45 °C, on retrouve un régime exponentiel (figure 1.5).

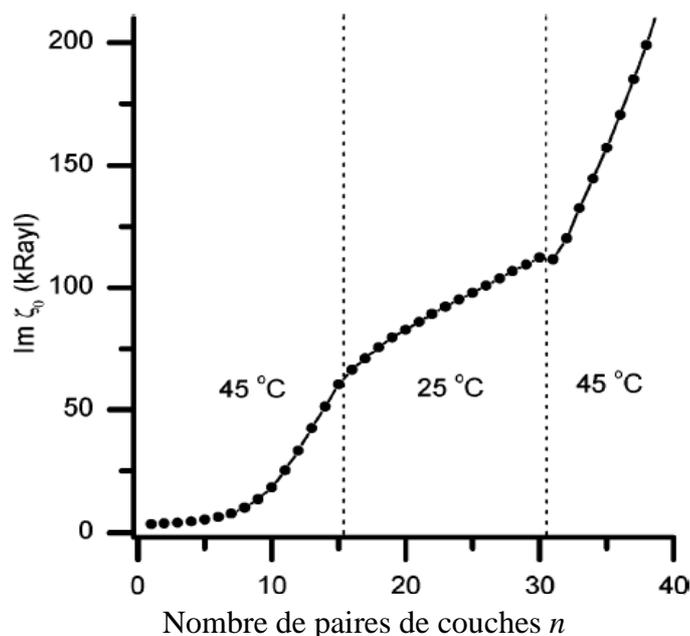


Figure 1.5 : Evolution de la croissance d'un film (PDADMA/PSS)_n suivie par microbalance à cristal de quartz en fonction de la température des solutions de polyélectrolytes. Le graphique représente l'évolution de la partie imaginaire de l'onde acoustique, représentative de l'incrément de masse de polyélectrolytes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

Ces études, ainsi que d'autres effectuées dans notre laboratoire (Laugel 2006), suggèrent que toute combinaison polyanion-polycation peut donner lieu soit à un régime de croissance linéaire soit à un régime de croissance exponentiel en fonction des paramètres physicochimiques utilisés lors de la construction. La croissance linéaire serait associée à des interactions fortes entre le polycation et le polyanion tandis que la croissance exponentielle correspondrait à des interactions plus faibles.

1.2 Nanostructuration par impression de motifs

La préparation de surfaces structurées à l'échelle micrométrique ou nanométrique est d'un intérêt majeur dans le développement de nouveaux outils dans le domaine des nanosciences (Hammond 2004). Les techniques pour produire des micro structures topographiques, ou chimiques, ont connu un essor considérable depuis plusieurs années et dans une grande variété de domaines allant des systèmes microélectroniques, mécanique-microélectroniques, micro-optiques, à la biologie, ainsi que pour les bio-capteurs ou la réalisation de canaux microfluidiques (Chen 2004 ; Khademhosseini et al. 2005). Cette nouvelle discipline vise à

mettre au point une technologie de miniaturisation pour créer des microlaboratoires sur puce, capables d'accomplir des tâches sophistiquées telles que du tri cellulaire, l'extraction ou encore la purification de molécules d'ADN. Récemment le développement rapide d'outils pour la nanotechnologie a ouvert la voie pour produire des structures possédant des caractéristiques de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres (Huh et al. 2007 ; Niemeyer et Mirkin 2004, cité par Vörös et al. 2005).

Il existe différentes techniques de production de micro ou nanostructurations : la lithographie dure (*hard lithography*), la lithographie douce (*soft lithography*), ou l'impression par compression (l'*embossing*).

1.2.1 Principe du micro-usinage par lithographie (*hard lithography*)

Le micro-usinage, issu de l'industrie de la microélectronique, est la méthode la plus ancienne et repose essentiellement sur la photolithographie (Chen 2004). Dans cette technique, une fine couche de résine photosensible est déposée sur un substrat (silicium, verre ou autres) puis exposée localement à des rayonnements ultra-violetts à travers un masque optique. Les rayons passant au travers du masque détruisent (ou polymérisent, en fonction du polymère utilisé) la couche de résine. On obtient alors une duplication des motifs du masque (en négatif ou en positif selon le type de résine). Cette couche de résine résiduelle est à son tour utilisée comme masque pour le micro-usinage *via* une attaque chimique acide ou une attaque ionique dite « mordantage par ion réactif » (*deep reactive ion etching*) encore appelé plasma couplé par induction (*inductively coupled plasma* ou *ICP*). Après l'enlèvement de la résine on obtient des microstructures à la surface du substrat (**figure 1.6**).

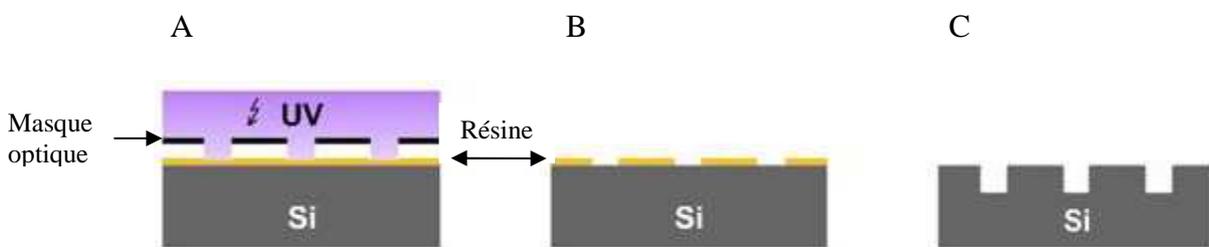


Figure 1.6 : Schéma du procédé de photolithographie et de mordantage pour la microstructuration des moules en silicium. A : la résine « photorésistante » (PR) (en gris clair) est illuminée par une lumière UV à travers un masque (en noir). B : développement de motifs en résine PR qui servent de couche protectrice lors du mordantage par ICP. C : silicium microstructuré après mordantage et élimination du PR (d'après Dusseiller 2005).

Cette technique de photolithographie présente toutefois l'inconvénient de réaliser des impressions dont la taille est limitée par la diffraction optique. La taille des motifs dépend donc de la longueur d'onde utilisée, (Xia et Whitesides 1998). C'est pourquoi, pour remplacer la photolithographie optique conventionnelle dans la fabrication de circuits intégrés, de nouvelles technologies sont en cours de développement et visent à utiliser des rayons lumineux correspondant à l'ultraviolet extrême (EUV) ou encore les rayons X (Wautelet et al. 2003; Vörös et al. 2005), pour arriver à des résolutions inférieures à 100 nm. Le but ultime de ces travaux est de pouvoir créer des structurations à une échelle de l'ordre de 25 à 30 nm. Un faisceau de particules, composé d'électrons, peut également être utilisé pour exposer une couche de résine sensible à ce type de rayonnement. Cette technologie est appelée lithographie par faisceau d'électrons (LFE, ou *electron beam lithography EBL*).

Ces techniques requièrent des technologies complexes et coûteuses et s'appliquent principalement à des surfaces planes. C'est pourquoi des méthodes alternatives, et complémentaires, dites de lithographie douce, ont été développées.

1.2.2 Principe de la lithographie douce (*soft lithography*)

La lithographie douce est une méthode de microfabrication à très faible coût et très facile à mettre en œuvre (Xia et Whitesides 1998). Elle utilise un moule réalisé par d'autres méthodes (comme par exemple un moule en silicium réalisé par lithographie classique) pour réaliser des répliques en négatif des formes imprimées, grâce à un matériau peu coûteux et aisé à manipuler comme le poly(diméthylsiloxane) (PDMS), qui est un élastomère quasiment inerte du point de vue chimique. Le PDMS, préparé sous la forme d'un mélange visqueux, est coulé sur le moule en silicium, puis polymérisé pendant plusieurs heures dans une étuve à 70°C en présence d'un amorceur de polymérisation. Une fois solidifié l'élastomère est détaché du moule. Pour faciliter cette séparation, la surface du moule peut être préalablement modifiée par un traitement anti-adhésif. Cette technique permettant d'accéder facilement à des structures en trois dimensions, a donné naissance à de nouvelles méthodes appelées de *soft lithography*. Dans ces méthodes on se sert de ces répliques en polymère comme substrat, ou encore comme tampon permettant de déposer de façon sélective des groupements chimiques à la surface d'un substrat.

Ces répliques en PDMS peuvent à leur tour servir de moules pour obtenir des répliques en PDMS ou en différents matériaux, comme d'autres élastomères tels que des polyuréthanes, les polyimides (Xia et Whitesides 1998), ou le polystyrène sulfonate par compression à chaud (Dusseiller et al. 2005), ou encore en « NOA 63 », prépolymère de type mercapto-ester photo-polymérisable (Lu et al. 2007).

Impression par micro-contact (*microcontact printing*)

L'impression par micro-contact est une technique de lithographie douce qui permet la reproduction de motifs à partir d'un tampon en PDMS, par exemple, par simple transfert de monocouches auto-assemblées (le plus souvent), à la surface d'un substrat. Les monocouches auto-assemblées ou SAMs (*self-assembled monolayers*) sont constituées de molécules ou d'objets capables de s'organiser spontanément en une structure très ordonnée, bien définie et stable grâce à des interactions non covalentes (**figure 1.7**).

Dans la nature, des processus tels que le repliement des protéines, ou la double hélice d'ADN, sont des illustrations biologiques du potentiel de microfabrication d'auto-assemblages. De nombreuses stratégies ont été développées et employées pour fabriquer des systèmes d'auto-assemblages à deux ou trois dimensions. Les SAMs les mieux caractérisés sont les alkanethiolates $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{SH}$ qui s'organisent spontanément en se fixant d'une manière quasi covalente sur une surface d'or (**figure 1.7**). Ces molécules comportent de longues chaînes organiques qui s'associent par des interactions de type Van der Waals : c'est cet auto assemblage des chaînes hydrocarbonées qui confère son organisation à la monocouche. Les chaînes alkylées peuvent être terminées par différentes fonctions chimiques, permettant de moduler les propriétés de surface des monocouches auto assemblées.

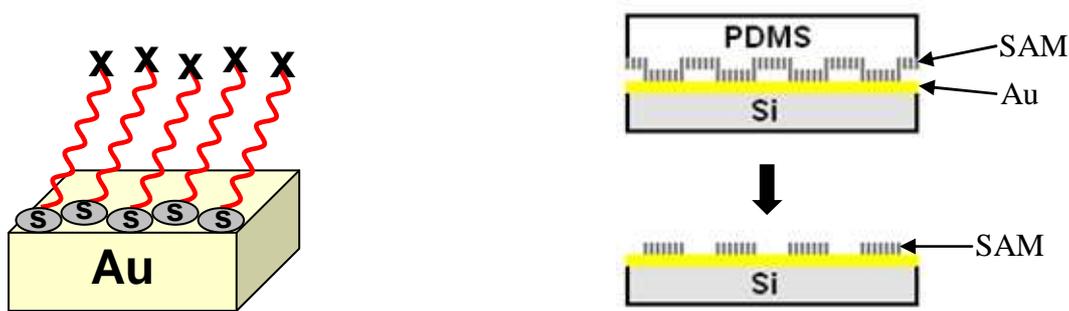


Figure 1.7 : A gauche, représentation d'une monocouche auto assemblée d'alkanethiolates formées sur une surface d'or. Les atomes de soufre au contact de l'or permettent de former une monocouche dont l'épaisseur dépend du nombre de groupements méthylènes (n) dans la chaîne d'alkyle(\sim). Les propriétés de surface de la monocouche peuvent être facilement modifiées en changeant la nature du groupe terminal X. Les chaînes alkyles ($-\text{CH}_2-$) sont inclinées approximativement de 30° par rapport à la normale à la surface pour maximiser les interactions de Van der Waals entre les groupes méthylènes adjacents (d'après Xia et Whitesides 1998). A droite, schéma de la procédure d'impression de SAM par microcontact sur une surface d'or. La monocouche est déposée de façon sélective sur les parties exposées du moule en PDMS.

Kumar et Whitesides ont déposé sur des surfaces d'or ou d'argent, des d'alkanethiolates bien définis à l'aide de tampons structurés (Kumar et Whitesides 1994, Kumar et al. 1994). Les surfaces d'or résiduelles, c'est-à-dire non couvertes, pouvaient par la suite être modifiées, par adsorption d'alkanethiols terminés par des oligo-(éthylène glycol) rendant ces régions résistantes à l'adsorption de protéines ou de polyélectrolytes. Les régions modifiées par adsorption des alkanethiols étaient à leur tour recouvertes de manière sélective avec des films multicouches de polyélectrolytes (PEMs), (alors que les domaines protégés par les oligo-(éthylène glycol) restaient non couverts) (Kumar et al. 1994 ; Denis et al. 2005). Les dépôts de PEM ont alors permis de convertir une structuration purement chimique en une structuration chimique et topographique (Hammond et Whitesides 1995).

Par la suite de nombreuses adaptations de l'impression par micro contact ont permis de déposer différentes monocouches ou multicouches par estampage de polyélectrolytes, de copolymères greffés ou en blocs sur des surfaces déjà recouvertes de multicouches de polyélectrolytes. Cette méthode d'estampage de polymère-sur-polymère a été baptisée « POPS » (pour *polymer-on-polymer stamping*) par Hammond (2004). Elle offre la possibilité de déposer des motifs sur des surfaces de polymère sans l'utilisation de chimie de couplage de thiol ou de silane communément employée pour les surfaces métalliques ou d'oxyde métallique.

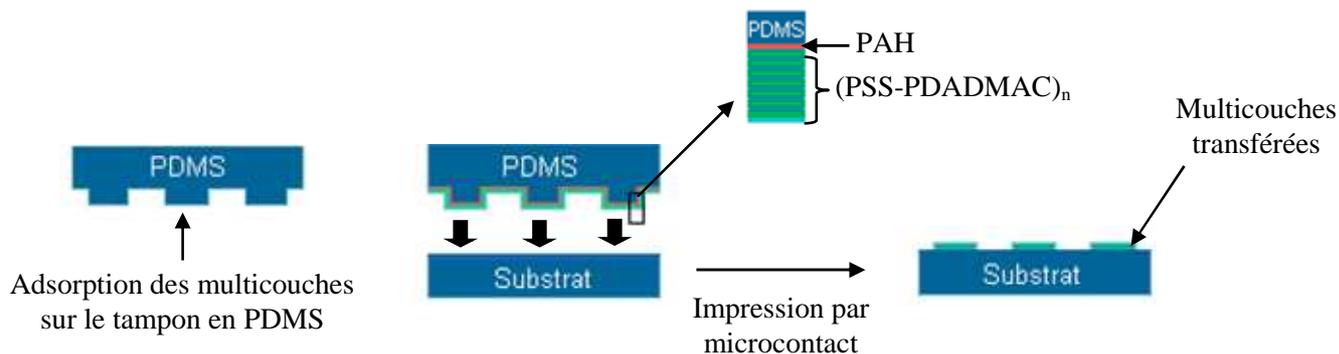


Figure 1.8 : Représentation du procédé de transfert de multicouches. Dans cet exemple : l'assemblage des multicouches sur le tampon en PDMS commence par l'adsorption d'une première couche de PAH, grâce aux interactions hydrophobes, puis par n paires de couche de (PSS-PDADMAC). Le transfert de ces multicouches peut se faire soit directement sur le substrat, soit sur des surfaces traitées par plasma (d'après Hammond 2004).

Le transfert de polyélectrolytes (PDADMAC-PSS) sur une surface de silicium par impression par micro-contact a permis l'adsorption sélective de capsules creuses recouvertes de polyélectrolytes sur les motifs préimprimés sur le substrat (Nolte et Fery 2004). Des films multicouches ou des protéines ont été transférées dans le but soit de permettre l'adhésion cellulaire sur une surface hydrophobe comme le PDMS, soit d'empêcher sélectivement l'adhésion cellulaire (dans ce cas c'est la poly-L-lysine modifiée par des chaînes de poly(ethylene glycol) qui a été imprimée) (Dusseiller et al. 2006 ; Biancardo et Larsen 2008; Falconnet et al. 2004; Glawe et al. 2005; Lam et al. 2006).

Ces méthodes de lithographies (*hard* et *soft*) permettent de développer un grand nombre de systèmes jouant sur la combinaison des techniques et l'association des différentes molécules. La structuration du substrat peut donc se faire tant du point de vue chimique que du point de vue topographique. On a pu ainsi démontrer la possibilité de confiner et de guider la croissance cellulaire dans des espaces géométriques choisis, définis par la taille et la géométrie des régions modifiées par micro impression (Aizenberg 2000; Bessueille et al. 2005; Walboomers et Jansen 2001; Falconnet et al. 2006; Dusseiller et al. 2005).

1.2.3 La micro ou nano compression de films multicouches (*embossing*)

Une autre méthode permettant d'obtenir des motifs en trois dimensions à la surface d'un matériau est l'*embossing*, qui consiste à imprimer par compression des micro ou nano

structures dans des matériaux. Cette technique était jusqu'à présent réservée aux microimpressions industrielles dans des matériaux thermoplastiques (citons typiquement l'industrie du Compact Disk basée sur l'impression dans du polycarbonate avec des moules en nickel). Une nouvelle opportunité intéressante est apparue récemment, montrant que la technique de « l'embossing » offrait la possibilité de déformer irréversiblement certains types de films multicouches avec des tampons en PDMS (Gao et al. 2004) ou avec des tampons à base de polymère photo-polymérisable (Lu et al. 2007). Cette découverte, qui combine l'impression de micro structures et la lithographie douce appliquées aux films multicouches, est très intéressante parce qu'elle permet d'envisager de produire des structures par compression sur tout substrat sur lequel un film peut être déposé. Gao et al. ont montré qu'il était possible d'imprimer des motifs dans des films multicouches de polyélectrolytes préparés avec deux combinaisons de polycations et de polyanions: le polystyrene-4-sulfonate (PSS)/poly(diallyldiméthylammonium chloride) (PDADMAC) et le système polyacrylate de sodium (PAA)/(PDADMAC). Ces films ont été construits en dissolvant les polyélectrolytes dans des solutions de NaCl de concentration variable (de 0.1 à 1M). La contrainte appliquée était comprise entre 0.105 et 0.200 MPa et était exercée pendant 15 min. En revanche l'impression s'est révélée impossible dans les films PSS/poly(allyamine hydrochloride) (PAH), même lorsque la contrainte appliquée était de 0.5 MPa (Gao et al. 2004). Il est possible que l'impossibilité de transférer la forme du moule dans le film (PAH-PSS)_n soit liée au mode et à la force des interactions entre les chaînes de polymères dans ces types de films. La validité de cette hypothèse semble corroborée par le fait que le module élastique des films construits à partir de PSS et de PAH était 5 fois supérieur à celui des films construits à partir de PSS et de PDADMAC (Gao et al. 2001, cités par Gao et al. 2004). Lu et al. ont montré qu'il est possible d'imprimer des films (PAH-PAA)_n en utilisant un polymère photopolymérisable de module élastique supérieur à celui du PDMS. Ils utilisent le Norland Optical Adhesives (NOA 63) qui est un prépolymère photo-polymérisable de type mercapto-ester, obtenu par réplique d'un moule en PDMS (Lu et al. 2007).

Il ressort de ces études que certains paramètres doivent être respectés pour imprimer avec succès dans des films multicouches de polyélectrolytes :

- La quantité d'eau dans le film : le transfert de la forme des motifs dans les films (PDADMAC-PSS)_n était possible dans une atmosphère à 70% d'humidité relative et échouait dans une atmosphère à 40%. De plus, les films séchés pendant 1 min sous un flux d'azote n'ont pas pu être imprimés. Donc la déformabilité du film était directement affectée par les

processus de séchage accompagnant la réduction du taux d'humidité relative. Le taux d'hydratation interne d'un film multicouches de polyélectrolytes dépend évidemment beaucoup de sa composition.

- L'intensité et la durée d'application de la charge permettant la compression.

- La concentration en sel utilisée pour construire les films multicouches PSS/PDADMAC. Pour une force appliquée constante, la profondeur des motifs imprimés augmente avec la concentration en NaCl (de 0.1 à 1M).

Ces points soulèvent alors la question de la stabilité des formes imprimées. Il devient ainsi important d'étudier le comportement de ces films imprimés, dans le temps, qu'ils soient conservés à sec ou mis en solution aqueuse dans des conditions salines mimant les conditions physiologiques.

D'un point de vue économique, la possibilité de stocker ces films imprimés à sec, pendant une longue durée (jusqu'à plusieurs mois), éviterait de nouvelles préparations avant chaque expérience ou chaque utilisation.

Par ailleurs, dans l'optique d'une application biologique de ces films, il devient primordial d'étudier leur comportement dans une solution mimant la salinité du sérum physiologique.

Ce sont précisément ces points qui seront abordés dans le chapitre 2.

1.3 Incorporation de molécules dans les films multicouches

Les films multicouches présentent de nombreuses applications potentielles dans le domaine des biomatériaux. Par exemple, le dépôt de tels revêtements à base de polyélectrolytes biocompatibles à la surface d'un implant peut conduire à une meilleure intégration dans les tissus environnants. Constituant des réservoirs de molécules, ils sont susceptibles de délivrer des médicaments au niveau du site de l'implantation. L'objectif sera alors de s'orienter vers la conception de revêtements bioactifs (c'est à dire avec une activité biologique). 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.

De nombreuses études ont montré qu'il était possible de fonctionnaliser les films multicouches soit par simple insertion de molécules biologiques (telles que des protéines, de l'ADN, de l'ARN, des agents thérapeutiques) à un certain niveau de la construction, soit par greffage covalent du facteur biologique sur une chaîne de polyélectrolyte (**figure 1.9**).

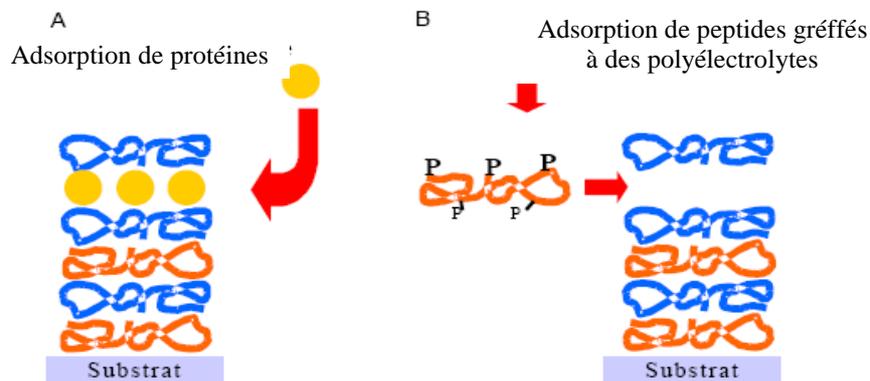


Figure 1.9 : Schémas illustrant la fonctionnalisation de films multicouches de polyélectrolytes (A) soit par intégration directe dans le film de macromolécules biologiques (protéines) au cours de la séquence de dépôt (Lvov et al. 1996), (B) soit par enfouissement d'un principe actif greffé sur une chaîne de polyélectrolytes (Chluba et al. 2001).

1.3.1 Insertion de molécules biologiques par simple dépôt

Les films multicouches peuvent être fonctionnalisés par adsorption de protéines au sommet d'un film ou par insertion d'une ou plusieurs protéines à différents niveaux dans leur architecture (Lvov et al. 1995). Cependant ces protéines doivent conserver une structure tridimensionnelle proche de celle de leur forme native (structure secondaire et/ou tertiaire) afin de préserver leurs activités biologiques. Schwinté et al. (2001) ont montré (par des analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier) que la structure secondaire de protéines (telles que le fibrinogène, l'albumine ou le lysozyme) insérées dans les architectures de polyélectrolytes, était conservée. Onda et al. (1996) ont inséré des enzymes, comme la glucose oxydase ou encore la glucoamylase dans des films $(PEI/PSS)_n$, et ont montré qu'elles conservaient leur activité enzymatique.

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).

1.3.2 Insertion de molécules biologiques par greffage covalent

Une autre voie de bio-fonctionnalisation consiste à inclure dans l'architecture multicouche, un polyélectrolyte modifié par couplage covalent avec une molécule d'intérêt biologique. Par exemple, l' α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), capable de stimuler la mélanogénèse par les mélanocytes, a été couplée de façon covalente à la poly(L-lysine) puis incorporée à différents niveaux dans des films multicouches (PLL/PGA)_n. Les premiers travaux dans ce domaine ont permis de montrer que cette hormone conservait son activité lorsqu'elle était couplée à la PLL et ont pu évaluer la réponse de mélanocytes mis au contact des films (PLL/PGA)_n dans lesquels plusieurs couches de PLL ont été substituées par de la (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. D'autres études ont utilisé des polyélectrolytes modifiés par des médicaments et insérés dans les films multicouches. On peut citer l'exemple de l'acide hyaluronique portant des molécules de paclitaxel. La liaison covalente médicament-polysaccharide était une liaison ester hydrolysable, permettant ainsi la libération progressive de la substance active dans le milieu en contact avec le film multicouche (Thierry 2005).

1.3.3 Chargement et libération de molécules par absorption dans le volume du film

Jusqu'à présent, la plupart des films LbL ont été chargés avec des molécules actives uniquement pendant la construction des films. Des études très récentes ont montré que certaines combinaisons de polyélectrolytes permettaient un chargement irréversible de protéines ou de nanoparticules à partir de solutions mises en contact avec le film après sa construction. Le paclitaxel (ou Taxol), molécule utilisée en chimiothérapie pour son activité anti-proliférative dans le traitement du cancer du sein et des ovaires, a été incorporée dans des films (PLL-acide hyaluronique (HA)) (PLL/HA)_n (avec n=30 et n=60) après leur construction (Vodouhé et al. 2006). Les films multicouches ont été chargés en taxol par incubation de la solution de médicament avec le film pendant toute une nuit avant recouvrement du film par une barrière constituée de paires de couches de PSS et de PAH.. Des observations en microscopie confocale à balayage laser ont alors révélé que le paclitaxel pouvait se concentrer de manière homogène et que l'intensité de fluorescence dans le film restait constante après quatre jours de conservation dans du NaCl 0.15M à température ambiante. Cette substance active a permis de réduire la viabilité de cellules cancéreuses mises au contact de ce film.

Depuis peu commence à émerger le concept réversible d'incorporation/libération de particules dans les films LbL. Cette nouvelle stratégie consiste à incorporer des molécules à partir de solutions et passe en général par deux étapes : (1) la construction des films LbL sur un substrat et (2) l'immersion de ces films dans des solutions de particules ou protéines pour « absorber » ou charger ces composés à l'intérieur du film, avant d'étudier sa libération en variant les propriétés physico chimiques (pH, force ionique, température) de la solution environnante.

Incorporation de particules

Le chargement et la libération de petites molécules hydrophiles a été étudié dans des films multicouches de PAH/HA (Burke et Barrett 2004). Ces petites molécules, essentiellement des colorants présentant un chromophore facilement détectable par spectroscopie d'absorption, ont été le chromotrope 2R et l'« *Indoine Blue* ». Ce travail a permis de montrer qu'il est possible de piéger ces petites molécules dans le film, lorsqu'elles sont incorporées dans une solution à un pH donné, et de les libérer simplement en changeant le pH de la solution environnante. Cette capacité à piéger de petites molécules a été attribuée à des interactions électrostatiques faibles et à la formation d'agrégats de colorants dans le film.

D'autres auteurs (Guyomard et al. 2006) ont étudié le chargement et la libération de petites molécules hydrophobes dans des films multicouches à base de polysaccharides amphiphiles. Cette fois, les films multicouches ont été élaborés avec du PEI comme polycation et un polysaccharide anionique (le carboxyméthylpullulan ou CMP). Le CMP a été modifié par greffage de chaînes carbonées, connues pour développer des associations hydrophobes en solution aqueuse, devenant ainsi un dérivé amphiphile. Celui-ci peut alors créer des nanodomains hydrophobes, pouvant servir de nanoréservoirs pour les molécules hydrophobes. Ces films ont été immergés dans une solution contenant le « *Nile Red* », un colorant hydrophobe. Après chargement, les films ont été plongés dans des solutions de pH différents. Aucune libération dans l'eau, même après plusieurs heures, ni à un pH neutre de 7.4 n'a été observée. Par contre lorsque le pH de la solution devient proche du pKa du dérivé du CMP (à pH 5), la spectroscopie UV-visible révèle que 30 % de la quantité de colorant incorporée ressort du film. Si on augmente le taux de greffage de chaînes carbonées sur le CMP utilisé pour la construction des films et que l'on répète l'expérience, le pourcentage de libération diminue. Les auteurs émettent l'hypothèse qu'une partie des molécules piégées dans le complexe de polyelectrolytes, le serait en dehors des nanodomains hydrophobes. Ces

molécules seraient faiblement liées aux constituants du film, et pourraient être libérées lors d'une variation de pH. En revanche, il semble qu'une grande partie des molécules de colorant, piégée dans des agrégats hydrophobes, serait certainement peu affectée par la variation de pH. Le comportement des films chargés a ensuite été étudié en fonction de la nature du sel de la solution environnante. Ainsi lorsque des films chargés en colorant sont plongés dans une solution de NaCl 0.5 M, sel connu pour renforcer les interactions hydrophobes, il y a peu de désorption du Nile Red (un maximum de 10%). Inversement, lorsque ces films sont immergés dans une solution de thiocyanate de potassium à 0.5 M, sel qui rompt les liaisons hydrogènes empêchant ainsi les interactions hydrophobes, 65 % des molécules de colorant sortent du film, ce qui corrobore l'explication avancée précédemment. Cette approche de nanoréservoirs à libération modulable apparaît intéressante pour préparer des revêtements capables de piéger et de libérer des médicaments hydrophobes.

L'étude de Srivastava et al. (2008) s'est intéressée à l'incorporation et à la libération de nanoparticules (NP) de charges différentes, dans des films PDADMAC/PAA, à croissance exponentielle, système encore peu étudié. Lorsque ce film est immergé pendant 7 heures dans une suspension de nanoparticules de tellure de cadmium chargées négativement, le film gonfle et incorpore ces nanoparticules. Après immersion pendant 24h dans de l'eau pure à pH 9, il y a libération de 60 à 70% de la fraction massique des NP1 contenues dans le film (**figure 1.11**). En revanche, en recouvrant des films chargés en nanoparticules par un film (PSS-PDADMAC)₁₀, à croissance linéaire, le film libère deux fois moins de NP. Des nanoparticules de charge électrique positive peuvent aussi être incorporées et libérées d'un film PDADMAC-PAA, mais dans des proportions moindres (environ trois fois moins). Ainsi il a été montré que l'on pouvait charger et décharger de façon réversible des nanoparticules dans un film multicouche à croissance exponentielle, par simple diffusion des nanoparticules dans un film déjà construit. Le signe de la charge de surface des nanoparticules, peut modifier l'incorporation des particules, et l'adjonction d'un film à croissance linéaire, ou le pH de la solution environnante, peuvent être utilisés pour contrôler libération des nanoparticules.

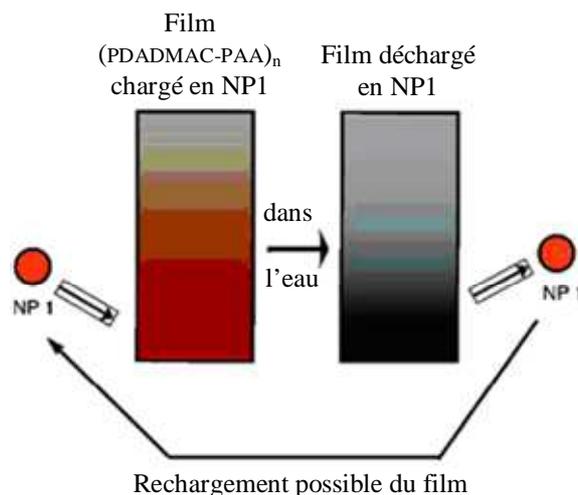


Figure 1.10 : Schéma illustrant le chargement/déchargement réversibles de nanoparticules (Srivastava et al. 2008)

Il apparaît donc que des facteurs tels que le pH, la force ionique, la charge de la molécule et son caractère hydrophile/hydrophobe sont autant d'outils permettant de moduler le chargement ou la libération réversibles par diffusion de particules dans un film multicouche de polyélectrolytes. Des études effectuées dans notre laboratoire, non encore publiées, montrent qu'il est possible d'incorporer des particules colloïdales de plusieurs centaines de nm de diamètre dans certains types de films multicouches. Ceci offre des perspectives intéressantes pour l'élaboration de films à propriétés optiques particulières tels que la réflexion sélective de certaines longueurs d'onde du spectre UV-visible.

Incorporation de protéines

Les modalités d'adsorption ou d'« absorption » de protéines dans des films multicouches de polyélectrolytes ont été décrites par Salloum et Schlenoff (Salloum et Schlenoff 2004). Ces auteurs ont utilisé différents films (comme entre autres des films $(PDADMAC-PSS)_n$, ou $(PAH-PAA)_n$ combinés avec différentes protéines (albumine, fibrinogène et lysozyme). Ils montrent que, même si toutes les protéines sont plus ou moins capables de s'adsorber via des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogènes ou des interactions hydrophobes, les conditions les plus favorables se produisent lorsque la charge de surface du substrat est de signe opposé à la charge globale de la protéine. Quand ce sont ces forces électrostatiques qui prédominent, l'augmentation de la force ionique environnante diminue l'adsorption des

protéines. Lorsque la charge de surface des multicouches est de signe opposé à la charge globale de la protéine, l'épaisseur du film multicouche joue alors un rôle important. En effet, il a été montré que le film peut se comporter comme une « éponge » ou comme une matrice capable de se charger en protéines. Par contre, si la surface et la protéine sont de même signe, la protéine peut s'adsorber sur le film sous forme d'agrégats mais ne pénètre pas dans le film. Par ailleurs, Wang et al. montrent, par des mesures de l'activité électrochimique et catalytique, qu'il est possible d'incorporer de la myoglobine (Mb) par immersion dans différents films multicouches à base de PDADMAC et de ZrO₂ ou de PDADMAC /PSS. Les spectroscopies UV-visible et infrarouge à transformée de Fourier montrent que cette protéine conserve sa forme native (Wang G. et al. 2007).

Comparée à la méthode de dépôt des protéines lors de l'élaboration du film, cette nouvelle approche d'incorporation par « postdiffusion » permettra certainement d'augmenter la capacité du film en protéines tout en conservant leur structure tridimensionnelle et dans le cas des enzymes, une partie au moins de leur activité biologique. L'immobilisation d'enzymes et de protéines sur des surfaces solides, sans altérer leur structure native et leur bioactivité suscite un intérêt considérable, notamment pour les applications potentielles dans les domaines biologiques, tels que les biocapteurs, bioréacteurs, dispositifs bioélectroniques ou biooptiques.

1.3.4 Une protéine d'intérêt : l'insuline

Le diabète et l'insuline

En 2005, le ministère de la santé a relevé que deux millions de Français souffrent d'une pathologie liée au diabète, cela qui signifie que 3,5% de la population française est touchée. On décompte 10 000 décès par an liés directement au diabète et deux décès sur trois interviennent au-delà de l'âge de 75 ans. Les études épidémiologiques prédisent une augmentation de 35% de la prévalence entre 1995 et 2025 au niveau de l'ensemble de la planète avec une prévalence de 330 millions de personnes touchées. Le traitement du diabète est donc un enjeu majeur de santé publique.

Le diabète est une affection chronique caractérisée par une insuffisance absolue ou relative de la sécrétion d'insuline, responsable d'un défaut d'utilisation du glucose par les cellules de

l'organisme, dont l'une des conséquences est l'hyperglycémie. Chez le patient diabétique, on relève une glycémie à jeun supérieure à 1,26 gramme par litre de sang (selon l'*American Diabetes Association* en 1998 et l'Organisation Mondiale de la Santé).

Il existe deux formes de diabète : le diabète de type I et le diabète de type II (Hennen G. 2001).

- *Le diabète de type I* est dit insulino-dépendant. Il traduit un état de carence en insuline, due à la destruction sélective des cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques par un mécanisme auto-immun, survenu chez l'enfant ou le jeune adulte.
- *Le diabète de type II* est dit non insulino-dépendant et concerne 90% des diabétiques français. Chez ces patients, il y a une anomalie de la sensibilité de l'insuline (insulo-résistance) sur les tissus cibles et une diminution du captage du glucose par les muscles, ce qui augmente la production de glucose par le foie. Cette carence en insuline s'installe au fil des années pour arriver à une perturbation de la sécrétion quantitativement et qualitativement.

L'insuline a plusieurs effets sur l'organisme : (1) elle est à l'origine de la captation tissulaire du glucose et sa pénétration dans les tissus comme le foie, les muscles ou le tissu adipeux ; (2) une fois arrivée dans la cellule, l'insuline stimule la glycolyse, la glycogénogénèse (pour mettre en réserve le glucose) et la lipogénèse hépatique, mais elle inhibe la lipolyse.

Une carence en insuline entraîne une diminution de la captation tissulaire du glucose, donc une accumulation du glucose dans le sang, ce qui aboutit à une hyperglycémie et une glycosurie. Il y a alors captation accrue par d'autres tissus, ce qui entraînera des complications vasculaires, et ainsi qu'au niveau des reins, des nerfs et de la rétine. En plus des risques de coma hyperglycémique dit acido-cétosique, ce sont les conséquences à long terme du diabète qui en font sa gravité.

Les traitements actuels

Les traitements utilisés actuellement consistent principalement en l'administration par voie injectable d'insuline dite « rapide » et/ou « lente » : l'insuline « rapide » est employée pour réduire de façon rapide les pics plasmatiques de glucose à un instant précis, alors que

l'insuline « lente » est destinée à contrôler le taux de glucose circulant sur des durées plus importantes au long de la journée.

- Le diabète de type I nécessite 2 à 3 injections par jour pouvant aller jusqu'à 6.
- Le diabète de type II se traite dans sa phase initiale de façon médicamenteuse orale mais le traitement pourra évoluer vers les injections comme indiquées dans le type I. Cette administration continue joue un rôle critique dans l'appréhension des traitements.

Face aux difficultés liées à l'acceptation, l'administration et à l'observance d'un traitement à vie du diabète par le patient (injections par piqûres, pompes à insuline et autres systèmes similaires), de nombreuses recherches ont pour objectif de rendre la substance plus efficace, plus tolérable ou plus facile à utiliser. La mise au point de nouvelles stratégies d'administration d'insuline constitue un sujet de recherche en plein essor.

Développement de systèmes de libération de l'insuline

L'ingénierie moléculaire vise à développer des analogues de l'insuline native (insuline recombinante) pour adapter la pharmacocinétique aux besoins de l'individu. L'ingénierie de formulation travaille sur la mise en forme de la molécule en vue de développer de nouveaux modes d'administration afin d'éviter la voie parentérale classique.

Parmi les systèmes de libération, citons l'étude de gels comme réservoirs d'insuline à partir de particule de 2 à 3 mm (Anderson et al. 1997) jusqu'à plus récemment sous forme de nanoparticules d'alginate-chitosan (Sarmiento et al. 2007), la nanoparticule servant d'enveloppe de protection pour contourner les contraintes imposées par le tractus digestif dont la plus importante est le passage par le milieu acide de l'estomac pour les formulations orales, ou encore sous forme de microparticules (Agarwal et al. 2008). De nombreuses études sont en cours pour favoriser le passage aux travers des membranes, donc pour améliorer l'absorption à différents niveaux. Citons par exemple les sprays buccaux, les formulations intra nasales, les formes inhalées ou les patchs transdermiques, (Sadrzadeh et al. 2007).

Dans le but de développer de nouveaux films minces chargés en insuline, avec la possibilité de libérer l'insuline de façon progressive, nous avons utilisé dans le chapitre 5 des films multicouches de polyélectrolytes, comme supports et réservoirs d'insuline.

CHAPITRE 2 : Matériels et Méthodes

2.1 Matériels, construction des films multicouches

2.1.1 Molécules et solutions utilisées

2.1.2 Construction des films multicouches de polyélectrolytes

2.1.3 Impression des films multicouches de polyélectrolytes

2.1.4 Chargement des films en insuline

2.2 Méthodes de caractérisation et d'analyse

2.2.1 La microscopie

2.2.2 L'ellipsométrie

2.2.3 La spectroscopie

2.2.4 Mesures d'angle de contact

2.1 Matériels, construction des échantillons

2.1.1 Molécules et solutions utilisées

Les solutions de polyélectrolytes

Les polyélectrolytes

Les polyélectrolytes utilisés pour construire les films multicouches sont dissous soit dans de l'eau ultra-pure (de résistivité 18.2 MΩ.cm, système Milli-Q-plus, Millipore), soit dans cette eau Milli Q à des concentrations variables de chlorure de sodium (NaCl) et/ou tamponnée par du tris-(hydroxyméthyl) aminométhane (tampon Tris).

Les polycations et polyanions utilisés sont présentés dans les tableaux 2.1 et 2.2.

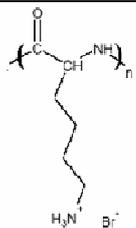
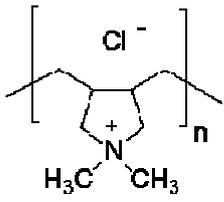
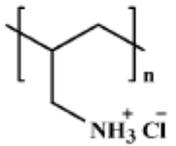
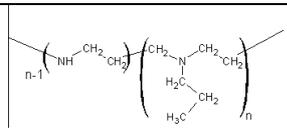
Nature du polyélectrolyte / Notation	Structure moléculaire	Masse molaire M_w (g/mol)	pKa	Fournisseur
Poly(L-lysine) PLL <i>Polypeptide synthétique biodégradable</i>		45 000 (masse molaire viscosimétrique)	10.5	Sigma-Aldrich
Poly(diallyldiméthylammonium chloride) PDADMAC <i>Polycation synthétique non biodégradable</i>		100 000 – 200 000	/	Sigma-Aldrich
Poly(allylamine hydrochloride) PAH <i>Polycation synthétique non biodégradable</i>		70 000	9.0	Sigma-Aldrich
Poly(éthylèneimine) PEI <i>Synthétique non dégradable</i>		750 000	6 à 10	Sigma-Aldrich

Tableau 2.1. Polycations utilisés

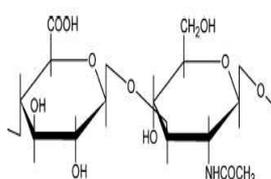
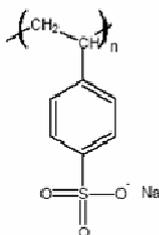
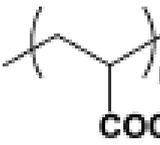
Nature du polyélectrolyte /Notation	Structure moléculaire	M _w (g/mol)	pKa	Fournisseur
Acide Hyaluronique HA <i>Polysaccharide naturel biodégradable</i>		420 000	2.9	Lifecore Biomedical
Poly(sodium 4-styrene sulfonate) PSS <i>Polyanion synthétique non biodégradable</i>		70 000	<1	Sigma- Aldrich
Acide polyacrylique PAA <i>Polyanion synthétique non dégradable</i>		30 000	4.5	Sigma

Tableau 2.2. Polyanions utilisés

Les solutions de polyélectrolytes

Pour construire les films multicouches ayant servis aux expériences d'impression nous avons utilisés le PDADMAC comme polycation et le PSS comme polyanion. Etant donné que ces deux polyélectrolytes ont une densité de charge indépendante du pH de la solution (qu'il varie de 1 à 14), il n'est pas nécessaire d'ajuster le pH de nos solutions. Le PSS et le PDADMAC sont dissous à une concentration de $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, donc respectivement à 4.5 et 6.2 mM, en unités monomères dans une solution de NaCl à 1M. Cette force ionique est choisie en accord avec les données de la littérature qui définissent ainsi les conditions optimales pour une impression efficace (Gao et al. 2004). Avant de débiter la construction du film (PDADMAC-PSS)₂₀, une première couche de PEI (à 1 mg/mL dans l'eau) est adsorbée à la surface de la plaquette de silicium, puis rincée dans le NaCl 1M. Cette couche sert à augmenter l'ancrage du film à la surface du silicium.

Les mêmes conditions ont été utilisées pour le compartiment (PDADMAC-PSS)₃₀ dans les expériences de films stratifiés.

Concernant les films multicouches destinés à servir de réservoirs à insuline, les constructions sont du type : PAH-Rho-PSS-PDADMAC-PSS-(PDADMAC-PSS)₃₀ , ou PAH-Rho-PSS-PDADMAC-PSS-(PDADMAC-PAA)₃₀, ou encore PAH-Rho-PSS-PDADMAC-PSS-(PLL-HA)₃₀. PAH-Rho désigne la poly(allyl amine) marquée avec des groupements fluorescents, ici la rhodamine B.

Dans tous les cas les premières couches PAH-Rho-PSS-PDADMAC-PSS sont réalisées en immersions manuelles et les 30 paires de couches suivantes sont réalisées de façon automatisée (avec 8 min d'immersion dans les polyélectrolytes et 2 fois 5 min de rinçage entre chaque couche).

La première couche de PAH-Rho (à 2.3 mg/mL dans l'eau) est mise en contact pendant 30 min avec la lamelle de verre, afin de réaliser l'adsorption du polycation. Cette première étape de la construction a pour but de permettre la localisation de l'interface verre/film (en rouge) lors des expériences de microscopie confocale. Les solutions de PSS et de PADAMAC utilisées pour le dépôt des trois couches PSS-PDADMAC-PSS sont solubilisées à 1 mg/mL dans du NaCl 0.15M. Le but de ce film est de constituer une barrière pour limiter l'éventuelle diffusion de PAH-Rho à travers le film.

Pour la construction des 30 paires de couches suivantes, nous avons repris les mêmes conditions de constructions que celles utilisées par le groupe du professeur N. Kotov (Srivastava et al. 2008) ayant permis l'incorporation de nanoparticules de tellure de cadmium dans les films (PADAMAC-PAA)_n. Le PDADMAC est ainsi dilué à 10 mg/mL dans de l'eau, sans ajustement de pH, et le PAA est utilisé à la concentration de 5 mg/mL dans de l'eau à pH= 3. Notons qu'étant donné que le pKa moyen du PAA est de 4.5, à pH 3 la fraction de groupements carboxylates déprotonés est de l'ordre de 3.2% (calcul effectué en utilisant la définition du pKa d'un acide faible et en supposant que tous les groupements acides du PAA sont indépendants). L'incrément d'épaisseur par paires de couche est alors élevé et les films sont fortement hydratés. Il a été démontré dans la littérature que ces conditions sont favorables à l'incorporation de solutés de forte masse moléculaire (Yoo et al. 1998 ; Shiratori et Rubner 2000).

Polyélectrolytes fluorescents

Pour les expériences de microscopie confocale à balayage laser, un polyélectrolyte fluorescent, le PAH-Rhodamine a été employé. Le PAH a été marqué au laboratoire par couplage covalent avec la rhodamine succinimidyl ester, sonde fluorescente rouge (Rho, longueur d'onde au maximum d'absorption $\lambda_{\text{abs}} = 570 \text{ nm}$ / longueur d'onde au maximum d'émission $\lambda_{\text{ém}} = 595 \text{ nm}$) (**figure 2.1**).

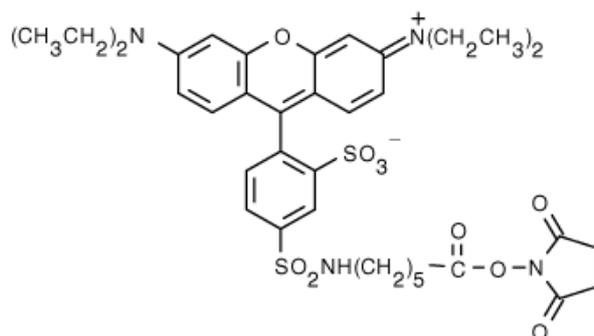


Figure 2.1. Structure moléculaire la rhodamine succinimidyl ester (Rho), sonde fluorescente greffée de façon covalente sur le PAH.

Le couplage de cette sonde fluorescente avec la poly(allylamine) (PAH) est obtenu par l'attaque nucléophile de cette polyamine sur le carbone électrophile du groupe ester de la rhodamine succinimidyl ester, il en résulte la formation d'une liaison covalente reliant la sonde fluorescente et le polyélectrolyte. Pour cela, une quantité appropriée de PAH est dissoute dans une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (0.1 M, pH = 8.5) à la concentration de 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 PAH (stoechiométrie Rho/PAH $\sim 1/1$) à température ambiante durant 2 heures sous agitation douce. Le polyélectrolyte marqué PAH-Rho est finalement purifié par dialyse (Cut off 12000-16000 g/mol, Membra-CelTM, 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 (UV-mc2, Safas, Monaco) (Hermanson 1996).

Les solutions de composées organiques/inorganiques

Le précurseur des nanoparticules de TiO₂

La molécule utilisée pour la construction du compartiment supérieur dans les expériences de films stratifiés est un précurseur du TiO₂, soluble dans l'eau. Il s'agit du dihydroxyde de titane (IV) bis (ammonium lactate) (TiBisLac), fourni par Aldrich (Mw 294.12 g/mol-1, 50% w/w, ref. 388165).

Les solutions

Pour la réalisation du compartiment (PDADMAC-TiO₂)_n, le PDADMAC est dissout à 0.5 mg/mL et le TisBisLac à 5mM, dans une solution tampon de Tris (Mw 121.1 g/mol, Gibco BRL) à 10 ou 50 mM dont le pH est fixé à 7.5 avec de l'acide chlorhydrique concentré.

Les solutions de TisBisLac sont préparées juste avant le début de chaque expérience de dépôts réactifs dans le but d'éviter une éventuelle polycondensation spontanée. En effet, celle-ci peut apparaître au bout de quelques heures et entraîne alors une turbidité visible de la solution. Nous n'en avons cependant jamais observé à une longueur d'onde de 500nm pour des concentrations inférieures à 50 mM et pour des durées plus courtes que 4h.

Les solutions peptidiques

L'insuline

L'insuline que nous avons utilisée est une insuline de pancreas bovin, conditionnée sous la forme d'une poudre blanche par Sigma, de masse moléculaire 5733.5 g/mol. Son point isoélectrique est à 5.3 pour la protéine native.

Elle présente deux chaînes d'acides aminés nommées A et B. Les ponts disulfures interchaînes sont localisés entre les cystéines aux positions A7 et B7 et entre les positions A20 et B19 (**figure 2.2**). Un pont disulfure intrachaîne se situe entre les cystéines A16 et A11. L'insuline bovine diffère de l'insuline humaine aux positions suivantes : alanine pour thréonine à A8, valine pour isoleucine à A10, et alanine pour thréonine au carboxyle terminal de la chaîne B.

Chaîne A:

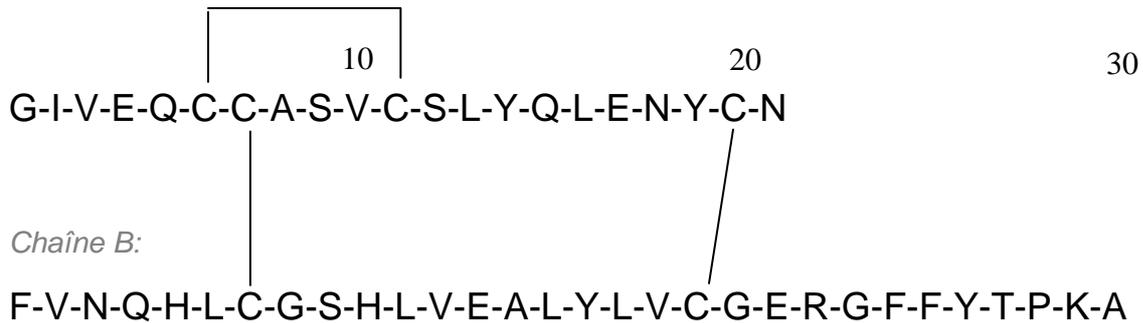


Figure 2.2: Représentation schématique de l'insuline de pancreas bovin (fournie par le fabricant, Sigma). Les lettres représentent les acides aminés.

L'insuline utilisée dans les expériences de chargement de films multicouches de polyélectrolytes a été utilisée à la concentration de 1 mg/mL dans de l'eau. L'insuline est difficilement soluble dans l'eau, car son point isoélectrique est de 5.4 alors que le pH spontané de la solution aqueuse est de 5.6-5.8. Ainsi, lorsqu'elle est diluée dans de l'eau, la solution est turbide. Pour obtenir une solution à pH = 4.3 qui soit transparente, il faut d'abord abaisser le pH de la solution (avec de l'acide chlorhydrique concentré) jusqu'à 2.6 (pH où la solution devient claire), puis le remonter lentement jusqu'à 4.5.

L'insuline fluorescente

Afin de visualiser l'incorporation d'insuline dans les films multicouches de polyélectrolytes, en microscopie confocale à balayage laser, l'insuline a été marquée avec une sonde fluorescente, au sein du laboratoire. Le marquage a été réalisé par couplage covalent avec la fluorescéine isothiocyanate (FITC, **figure 2.3**), verte fluorescente (FITC, longueur d'onde au maximum de la bande d'absorption $\lambda_{\text{abs}} = 488 \text{ nm}$ / longueur d'onde au maximum de la bande d'émission $\lambda_{\text{ém}} = 520 \text{ nm}$).

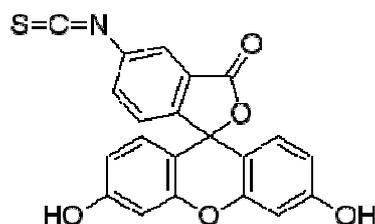


Figure 2.3 : Structure moléculaire de la fluorescéine isothiocyanate (FITC)

La réaction impliquée est une substitution nucléophile entre le groupement carboxylique de la FITC et la fonction amine au niveau de la lysine (en position 29) de la chaîne B. Une solution d'insuline est préparée dans du tampon Tris à pH=8.5, pour que les groupements amino de l'insuline ne soient pas protonés. La FITC est solubilisée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), avant d'être mélangé à la solution d'insuline. Le mélange est gardé à l'abri de la lumière pendant 1 heure, avant de dialyser la solution contre de l'eau afin d'éliminer toutes les molécules de FITC non liées à l'insuline. Le pH de la solution finale est ajusté à 4.3. Cette solution est stockée au congélateur (-24 °C) et à l'abri de la lumière.

Remarque : L'insuline possède trois groupements NH₂ susceptibles de réagir avec la FITC. La molécule de FITC possède une masse molaire de 391 g/mol ce qui est loin d'être négligeable devant la masse molaire de l'insuline, 5734 g/mol. De ce fait il ne faut pas exclure que les propriétés de l'insuline soient modifiées lors de la fixation de la FITC. Pour limiter l'influence de cette perturbation, les concentrations des deux solutions ont été calculées pour que le taux de marquage soit de 10%. Ce calcul suppose bien-sûr que le rendement de greffage est de 100%, ce qui n'est jamais le cas.

2.1.2 Construction des films multicouches de polyélectrolytes

Les substrats

Nous avons utilisé quatre sortes de substrats différents pour la construction des films multicouches de polyélectrolytes, en fonction des besoins de l'expérience. Les plaquettes de silicium, ont permis des mesures d'épaisseur à l'aide de l'ellipsomètre, ou des caractérisations de topographie de surface à l'aide du microscope à force atomique (AFM).

La microscopie confocale à balayage laser a requis l'utilisation de disques de verre transparents. Les lames de quartz étaient nécessaires pour la caractérisation par spectroscopie UV-Visible en raison de la transparence du quartz à des longueurs d'ondes inférieures à 300nm pour lesquelles l'insuline présente un chromophore. Enfin, les expériences de spectroscopie infra-rouge en mode réflexions totales ont été réalisées avec un cristal trapézoïdal en séléniure de zinc (ZnSe). Ce matériau est transparent pour des nombres

d'ondes compris entre 600 et 4000 cm^{-1} , c'est-à-dire pour des longueurs d'ondes comprises entre 2.5 et 16.7 μm .

Nous décrivons maintenant en détail la préparation et le protocole de nettoyage de chacun de ces substrats.

Les plaquettes de silicium

Les plaquettes sont découpées à partir d'un disque en silicium (Siltronix, Archamps, France) à l'aide d'un couteau à pointe diamantée selon une forme rectangulaire de 4 cm x 1 cm. Le silicium utilisé est dopé « n » avec des atomes de phosphore et orienté selon la direction (100). Les plaquettes rectangulaires sont ensuite nettoyées avec de l'éthanol, puis trempées dans une solution d'Hellmanex à 2 % (w/v) (Hellma, GmbH, Müllheim, Germany) chauffée à 70 °C pendant 30 min, suivi d'un rinçage à l'eau milli Q, puis plongées dans une solution d'acide chlorhydrique à 1 M chauffé à 70°C pendant 30 min. Le nettoyage au détergent a pour objectif de solubiliser les poussières et les molécules organiques adsorbées sur le substrat. Le Hellmanex est un mélange de molécules tensioactives comprenant des molécules cationiques ayant une forte affinité pour les oxydes chargés négativement. Le nettoyage à l'acide chlorhydrique a pour objectif d'éliminer ces molécules de détergent par le biais d'un phénomène de répulsions électrostatiques. En effet à un pH de l'ordre de 0, les groupements silanols de la silice sont chargés positivement. Les plaquettes de silicium sont finalement rincées abondamment à l'eau Milli Q et séchées à l'azote sous pression. Pour chaque expérience, nous avons utilisé une plaquette de silicium neuve et nettoyée comme décrit ci-dessus. Les films multicouches sont alors construits sur ces plaquettes de silicium comportant un film d'oxyde, SiO_2 en surface. Ce film est produit par oxydation spontanée du silicium en présence du dioxygène de l'air. L'épaisseur de ce film est mesurée par ellipsométrie avant chaque expérience de dépôt.

Les lamelles de verre

Des lamelles de verre de 12 mm de diamètre (Fischer Scientific, France) ont été utilisées principalement, pour la construction de films multicouches par immersions successives dans des solutions de polycations et de polyanions. Ces immersions ont été réalisées à l'aide d'un robot (DR3, Riegler et Kirstein, Berlin, Allemagne). Les films fluorescents ont été imagés par microscopie confocale à balayage laser. Pour l'imagerie topographique par AFM des films à réservoir d'insuline, nous avons employé des lamelles de verre de 14 mm.

Ces lamelles de verre ont été nettoyées directement sur le portoir qui sert à la construction du film.

Les portoirs seuls, ont été tout d'abord frottés au gant et au goupillon en présence d'une solution de détergent (le Hellmanex), puis rincés à l'eau, lavés à l'éthanol puis rincés à nouveau à l'eau avant d'être garnis avec les lamelles de verre.

L'ensemble (portoir et lamelles) a été ensuite trempé dans une solution de dodécyl sulfate de sodium à 10 mM à la température de 70°C et ce pendant une durée de 30 min. Le dispositif portoir-lamelles a alors été rincé à l'eau distillée, puis immergé dans une solution de HCl 0.1M à la température de 70°C pendant 30 min. Le nettoyage s'est terminé par un rinçage à l'eau MilliQ. Ce nettoyage a été effectué juste avant le début de l'expérience de dépôt du film multicouche.

Les lames de quartz

Les lames de quartz (1 x 4 x 0.1 cm, Hellma) sont transparentes dans le domaine UV du spectre électromagnétique et sont utilisées pour la caractérisation par spectroscopie UV-Vis (spectrophotomètre mc², Safas, Monaco). Le protocole de nettoyage est identique à celui utilisé pour les lamelles de verre.

Le cristal ZnSe

Le cristal de séléniure de zinc utilisé pour les expériences de spectroscopie infra rouge est nettoyé comme les surfaces de verre et de quartz à la différence près qu'il est frotté au gant après la phase d'immersion dans la solution de Hellmanex.

Construction des films multicouches par immersion

Principe

Le dépôt alterné des couches de polyélectrolytes par immersion suit le principe décrit par Decher (1997). Le substrat est trempé alternativement dans des bains de polyélectrolytes et dans des bains de la solution de rinçage (**figure 2.4**). La construction du film peut être réalisée soit manuellement soit grâce à un bras automatisé et piloté par un programme informatique (8 min d'immersion dans le polyélectrolyte et 2 fois 5 min dans la solution de rinçage). Dans ce

cas, ce sont des lamelles de verres disposées sur des portoirs qui sont immergées dans les différentes solutions prédisposées sur une plateforme conçue à cet effet (**figure 2.5**).

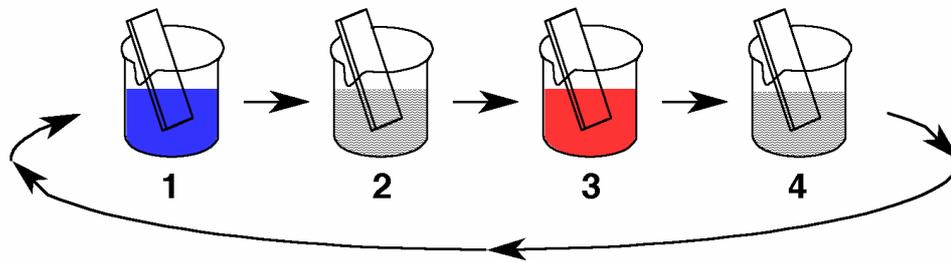


Figure 2.4 : Principe de la construction de films multicouches de polyelectrolytes (Decher, 1997). Les solutions 1 et 3 représentent les solutions de polycations et des polyanions et les solutions 2 et 4 sont les solutions de rinçage.

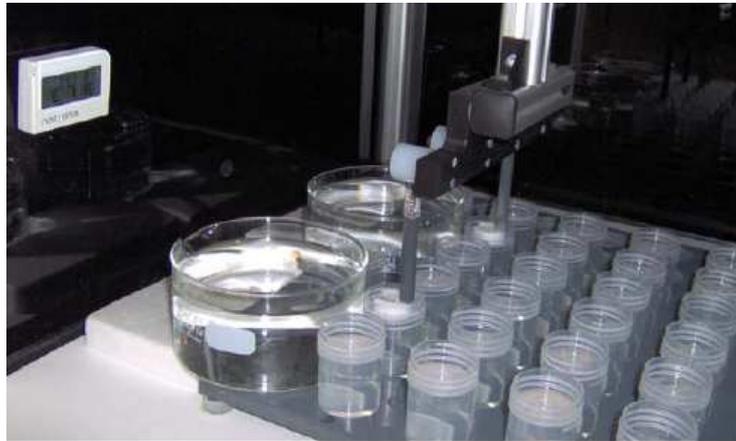


Figure 2.5 : Construction des films multicouches à l'aide du bras automatisé (Dipping Robot, Riegler et Kirstein, GmbH, Berlin, Allemagne)

Ce principe de construction a été mis en œuvre pour préparer des films épais (30 paires de couches, plusieurs micromètres en épaisseur) destinés à être utilisés pour étudier le chargement des films avec de l'insuline.

Construction des films multicouches par nébulisation

Principe

Cette méthode de construction des films (*spray coating*) consiste à déposer par nébulisation alternée des solutions de polycations et de polyanions, en intercalant entre chaque couche une

étape de rinçage (**figure 2.6**). Le substrat étant maintenu verticalement, l'écoulement des solutions par drainage grâce à la force de gravité, permet l'élimination des chaînes le plus faiblement adsorbées (Izquierdo et al. 2005).

La répétition de ce cycle permet de construire des films contenant un grand nombre de paires de couches en temps beaucoup plus faible (40 s par couche, rinçage compris) que celui nécessaire (environ 13 min) pour l'obtention d'un film ayant la même épaisseur par un processus d'immersions successives du substrat.

De façon plus détaillée, le temps de nébulisation est de 5 s par couche suivi par 15 s de repos. Le rinçage est également effectué par nébulisation (5s) suivi par 15 s de repos. Nous avons démontré au laboratoire qu'un temps de nébulisation de 5s était suffisant pour atteindre un état stationnaire, en termes de quantités adsorbées, à la concentration de 1mg/mL en polyélectrolytes. La surface n'a pas le temps de sécher pendant les 15 s de repos. Dans certaines conditions, le séchage du film avant la reprise de la construction peut avoir une forte répercussion sur la construction du film et il faut donc éviter les phases de séchage inutile. Cependant, pour la construction des films $(PEI-TiO_2)_n$ par nébulisation réactive, nous avons vérifié que le séchage, nécessaire à la caractérisation par ellipsométrie (avec l'ellipsomètre utilisé, car il existe des ellipsomètres à cellule liquide) n'influençait pas le régime de construction du film (Laugel et al. 2008). En effet l'épaisseur d'un film obtenue par le dépôt de 10 paires de couches sans séchage intermédiaire est identique, à l'erreur expérimentale près à l'épaisseur obtenue en réalisant 5 dépôts successifs de 2 paires de couches, chacune de ces étapes étant séparée de la suivante par une phase de séchage-réhydratation.

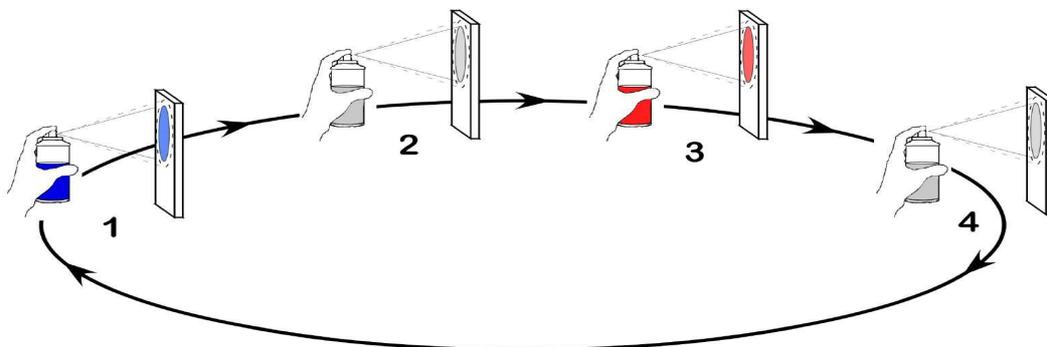


Figure 2.6 : Méthode de construction des films multicouches de polyélectrolytes par nébulisation alternée de solutions de polycations et de polyanions (*spray coating*) (Izquierdo et al. 2005)

Construction des films de polyélectrolytes

Les films multicouches ayant servi aux expériences d'impression et aux constructions de films compartimentés sont construits par la méthode de dépôt par nébulisation décrite précédemment (Ladhari et al. 2008; Laugel et al. 2007). La première couche est constituée de polyéthylène imine (PEI), qu'on a laissé s'adsorber pendant 5 min par immersion sur la plaquette de silicium, avant de bien rincer avec une solution de NaCl 1 M. La plaquette de silicium recouverte de PEI fraîchement rincée est alors immédiatement maintenue par une pince crocodile, orientée verticalement. Les dépôts par nébulisation commencent à ce moment-là. Les récipients de nébulisation sont remplis chacun d'une solution de polyélectrolytes (PSS et PDADMAC) et de NaCl (1M), et sont pressurisées manuellement. Cette pressurisation manuelle est répétée après chaque dépôt ou rinçage avec la solution de NaCl, pour réduire les fluctuations de pression pendant le processus de nébulisation (Izquierdo et al. 2005).

Les dépôts par nébulisation se font à $(25 \pm 3^\circ\text{C})$. En effet, l'évolution de l'épaisseur des films PSS/PDADMAC en fonction du nombre de paires de couches, dépend fortement de la température (Salomäki et al. 2005).

2.1.3 Impression des films multicouches de polyélectrolytes

Fabrication du moule en Silicium

Les moules microstructurés en silicium (**figure 2.7**) ont été fabriqués à l'ETH (Eifgenossene Technische Hochschule) de Zürich (équipe de Marcus Textor) selon un procédé qui se compose d'une phase de photolithographie suivie d'une étape de mordantage ICP (*inductively coupled plasma (ICP) etching*). La phase de photolithographie consiste à masquer les régions de la surface de silicium que l'on souhaite protéger du mordantage ultérieur. La phase de réaction au plasma ionique consiste à endommager les parties de la surface de silicium qui n'ont pas été protégées par le masque photolithographique.

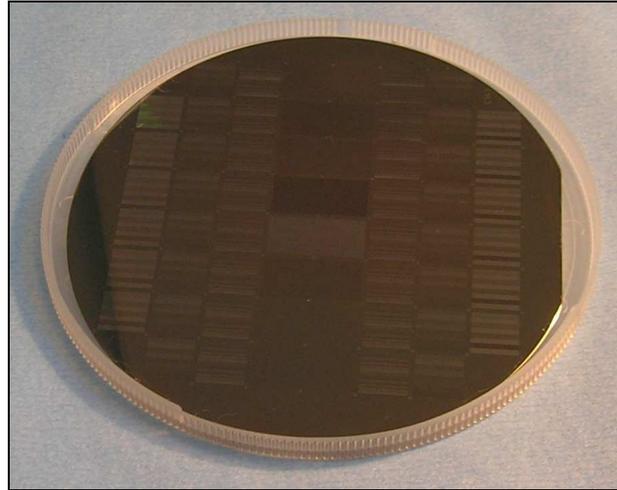


Figure 2.7 : Moule microstructuré en silicium

Photolithographie

La photolithographie est effectuée sur des plaques de silicium (de 4 pouces, soit 10.2 cm de diamètre) (**figure 2.8**). Après ultrasonication dans l'acétone et l'isopropanol, suivi par un lavage intensif dans de l'eau ultra pure, les plaquettes sont traitées dans un plasma à l'oxygène pendant 10 min (sous une pression de 0.05 mbar, et une puissance de 600 watts). Le but de ce traitement au plasma est d'augmenter l'adhésion d'un matériau appelé « photorésistant » sur le silicium. Ce matériau est appliqué sur toute la surface, puis la plaque est exposée à la lumière UV au travers d'un masque de chrome (Deltamask, NL) comportant le motif des formes que l'on désire reproduire sur le silicium. Seules les formes découpées dans le masque laissent passer la lumière UV, qui dégrade le matériau photorésistant. La plaque est ensuite lavée à l'eau et séchée.

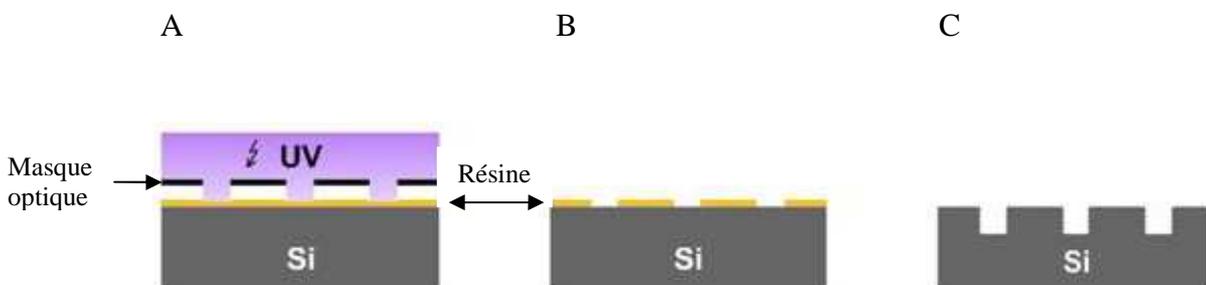


Figure 2.8 : Schéma du procédé de photolithographie et de mordantage pour la microstructuration des moules en silicium. A : la résine « photorésistante » (PR) (en gris clair) est illuminée par une lumière UV à travers un masque (en noir). B : développement de motifs en résine PR qui servent de couche protectrice lors du mordantage par ICP. C : silicium microstructuré après mordantage et élimination du PR (d'après Dusseiller 2005).

Mordançage

Les formes non recouvertes du masque photorésistant, sont mordancées en utilisant un plasma couplé inductif (ICP, STS, UK) (**figure 2.8**). Avant le mordançage la plaquette est lavée pendant 60 s en utilisant un plasma à l'oxygène pour éliminer les résidus du matériau photorésistant. Puis suivent une étape de mordançage au SF₆ (16 s) et une étape de passivation au C₄F₄ (6 s). Ces séquences de mordançage/passivation sont répétées. En jouant sur le nombre de cycles de mordançage/passivation (de 2 à 30) on peut définir la profondeur des structures finales imprimées dans le moule en silicium. Puis le matériau photorésistant est éliminé par un lavage dans de l'acétone, qui constitue un bon solvant pour ce matériau polymère. Un nettoyage final au plasma à l'oxygène pendant 60s et une étape de passivation de 30 s sont alors effectués pour créer une fine couche de polymère de fluorocarbone (épaisseur approximative de 45 nm). Ce dernier traitement a pour but de faciliter la séparation entre le moule en silicium et la réplique en PDMS.

Préparation des tampons

Principe

Les tampons utilisés pour l'impression des films multicouches ont été fabriqués au laboratoire. Ce sont des répliques (**figure 2.9**) en polydiméthylsiloxane (PDMS) d'une partie du moule en silicium, décrit dans le paragraphe précédent.

Ces méthodes de réplcation de formes à partir d'élastomères font partie des techniques dites de lithographie « douce » (*Soft lithography*).

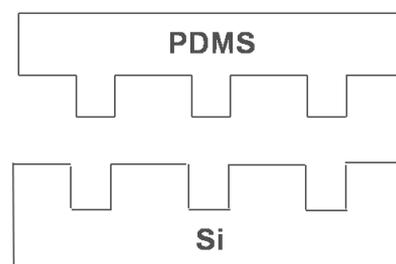


Figure 2.9 : Schéma du principe de la réplcation des formes du moule de silicium, en un tampon de PDMS

Le PDMS est un polymère organique à base de silicone dont l'unité monomérique répond à la formule $[\text{SiO}(\text{CH}_3)_2]$, (**figure 2.10**). Ce polymère est couramment utilisé pour ses propriétés rhéologiques qui permettent d'obtenir une grande précision dans la reproductibilité des détails.

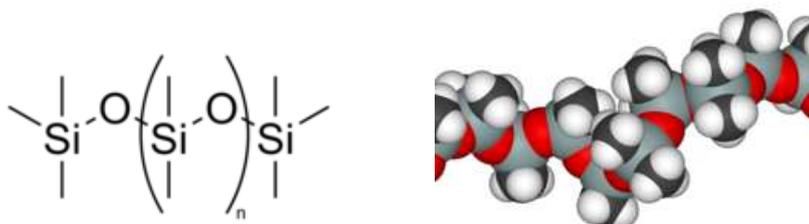


Figure 2.10 : Structure moléculaire du poly(diméthylsiloxane) (PDMS), dont l'unité monomérique est $[\text{SiO}(\text{CH}_3)_2]$.

Préparation

Le PMDS (Sylgard 184, Dow Corning) est un polymère obtenu grâce au mélange de 10 doses de « base » pour une dose d'agent d'initialisation (« curing agent »). Le mélange de cette solution visqueuse s'effectue à la main durant 2 min. Ce produit est ensuite mis au repos pendant 1h pour laisser remonter (et disparaître) les bulles d'air formées. Une fois les bulles d'air éliminée, la solution est lentement versée sur le moule en silicium. Le produit coule doucement dans toutes les anfractuosités du moule permettant une parfaite reproductibilité des détails topographiques. L'ensemble de la préparation est alors placé au minimum pendant 12h dans une étuve à 60°C pour permettre la polymérisation. L'augmentation de température permet de produire des radicaux libres à partir de l'agent d'initialisation et donc d'amorcer la réaction de polymérisation. Comme toute polymérisation radicalaire, celle-ci comporte une phase d'initialisation, de propagation et de terminaison.

En fin de polymérisation, la réplique en PDMS (**figure 2.11**) est extraite du moule en silicium et la région d'intérêt, (repérée par microscopie optique) est découpée à l'aide d'un bistouri.

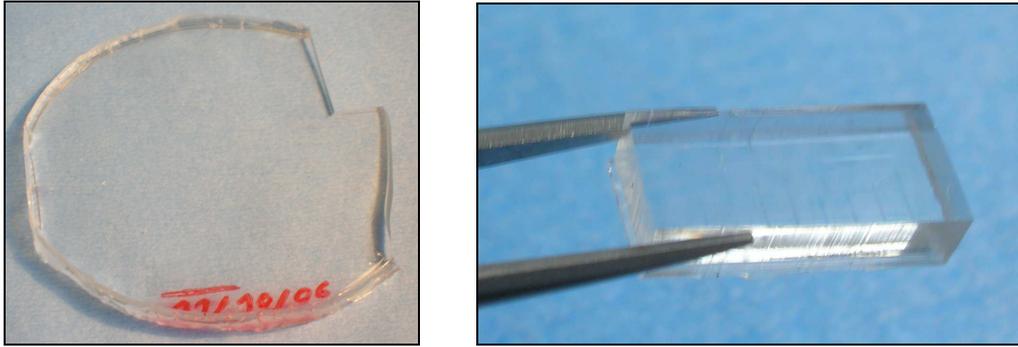


Figure 2.11 : Réplique du moule en silicium (à gauche) ; découpe de la zone d'intérêt (à droite) représentant le tampon en PDMS.

Le tampon en PDMS a été caractérisé par microscopie optique (Nikon TE, avec des objectifs x10 et x40) (**figure 2.12**) ainsi que par AFM en mode contact et à l'état sec (**figure 2.13**).

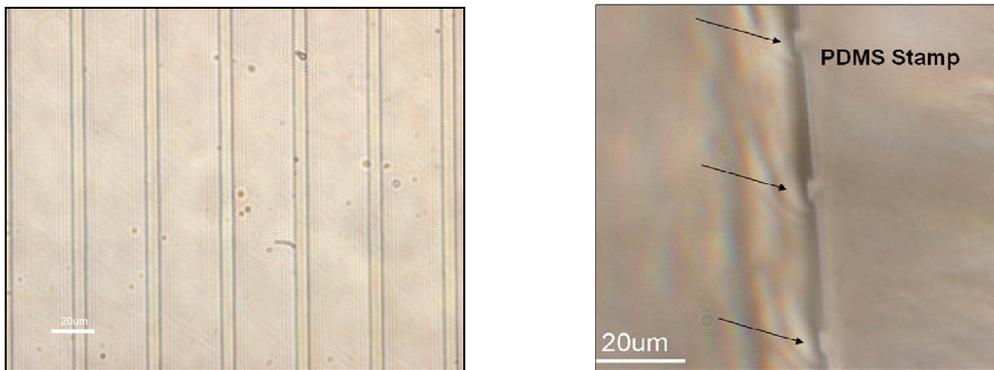


Figure 2.12 : Tampon en PDMS observé au Microscope optique inversé.

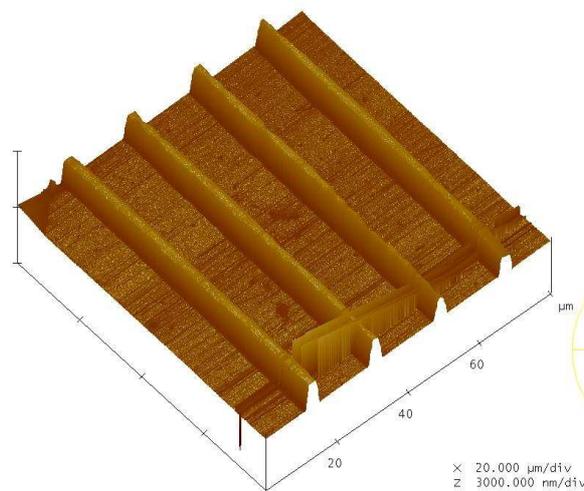


Figure 2.13 : Tampon en PDMS observé par AFM (image de 80µmx80µm ; échelle en z= 3µm/division).

Les formes utilisées pour nos impressions sont composées de lignes parallèles de $1\mu\text{m}$ de hauteur, d'environ $5\mu\text{m}$ de largeur, et espacée de $15\mu\text{m}$ (**figure 2.14**).

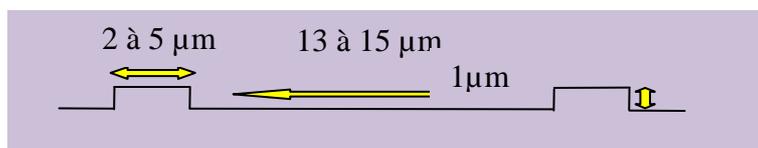


Figure 2.14 : Représentation schématique du relief des tampons en PDMS utilisés pour l'impression des films multicouches de polyelectrolytes.

Dispositif et méthode d'impression des films

Dispositif d'impression

Le dispositif d'impression des films a été conçu et réalisé au laboratoire. Il est constitué de 3 colonnes en téflon pouvant coulisser verticalement, et permettant ainsi d'imprimer 3 films simultanément (**figure 2.15**).



Figure 2.15 : Dispositif d'impression: 1-la masse, 2-le piston ou colonne, 3- le pied articulé, 4-l'échantillon

Chaque colonne comporte une extrémité supérieure pouvant supporter différentes masses calibrées (de 0.1, 0.2 ou 0.5 kg) (**figure 2.16**), conçues pour s'empiler en s'emboîtant, et une

extrémité inférieure flexible capable de transmettre la force d'impression à l'échantillon. La masse propre d'une colonne est de 0.160 kg.

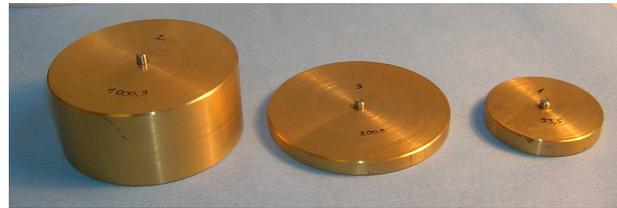


Figure 2.16 : Masses en laiton pouvant être placées au sommet des colonnes

Principe d'impression du film

Une colonne est maintenue en position haute. Le film multicouche de polyelectrolytes est positionné sous cette colonne. Un tampon de PDMS est déposé sur le film et la colonne est abaissée délicatement à l'aide d'un levier. La masse choisie est posée au sommet de la colonne et exerce une force qui est transmise par la colonne au tampon de PDMS puis sur le film, permettant d'imprimer celui-ci (**figure 2.17**).

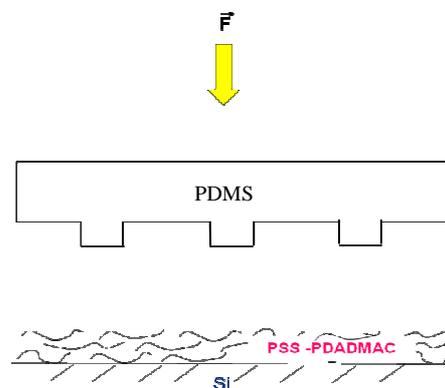


Figure 2.17 : Principe du transfert des formes lors de l'impression

Méthode

Le film multicouche une fois construit sur une plaquette de silicium est posé humide au centre d'une petite boîte de Pétri (**figure 2.18 (A)**). Le tampon en PDMS est alors déposé sur le film et quelques gouttes de solution de NaCl 1M sont ajoutées pour conserver l'humidité. L'ensemble (boîte de Pétri, film, tampon en PDMS) est placé dans l'emplacement calibré à la dimension de la boîte de Pétri sous le piston choisi et la colonne est alors descendue doucement, à l'aide d'un levier, sur le tampon en PDMS (**figures 2.18 (B) et (C)**). Une masse

additionnelle M (entre 0.3 et 2kg) est alors déposée au sommet du piston pour permettre l'impression du film pendant un temps t , et de la solution de NaCl 1M est ajoutée dans la boîte de Pétri afin d'immerger totalement l'échantillon (**figure 2.18 (D)**). L'expérience d'impression peut alors démarrer. Deux autres films peuvent être déposés sous les deux colonnes restantes suivant le même protocole et permettre ainsi trois impressions simultanées.

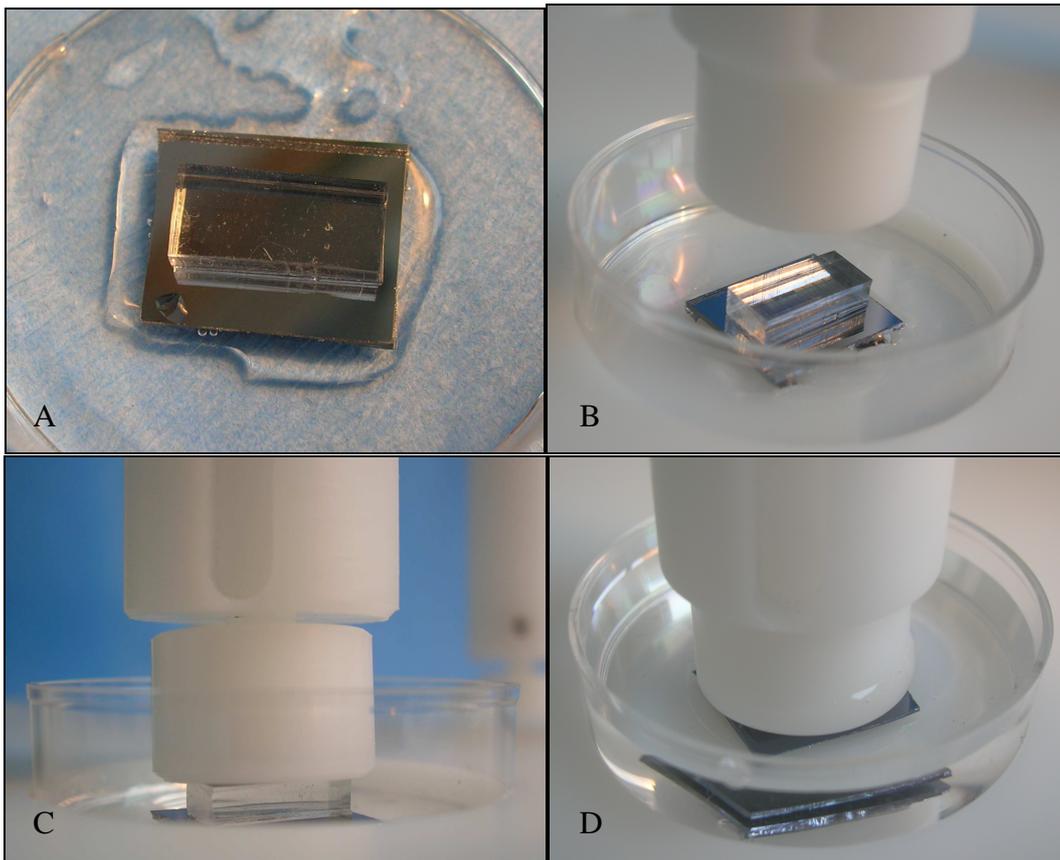


Figure 2.18 : Méthode d'impression ; (A) plaquette de silicium avec le film multicouche et pose du tampon en PDMS ; (B) et (C) application du pied articulé sur le système échantillon/tampon ; (D) impression en cours dans du NaCl 1M.

Au bout d'une heure d'impression, les trois échantillons sont retirés selon leur ordre de mise en place. La colonne et le tampon en PDMS sont rapidement retirés (en moins de 2 s) à l'aide du levier, le film est rincé avec un petit volume d'eau Milli Q (pour éviter la cristallisation de NaCl) et séché sous un flux d'azote avant caractérisation par AFM en mode contact, à « l'état sec ». Dans nos expériences, « l'état sec » signifie sans liquide en excès sur le film mais en présence de l'humidité atmosphérique ambiante, qui n'est hélas pas contrôlée dans notre étude.

Les motifs d'impression sont déjà visible à l'œil nu en faisant varier la réflexion de la lumière incidente sur l'échantillon (**figure 2.19**).

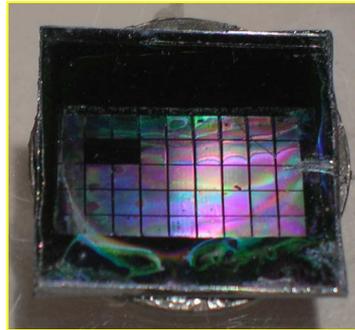


Figure 2.19 : Motifs d'impression visible sur l'échantillon

2.1.4 Chargement des films en insuline

La construction des films en vue de l'étude de leur chargement en insuline s'est faite soit sur des lamelles de verres de 12 mm (pour l'étude par microscopie confocale à balayage laser), soit directement sur le cristal de ZnSe (pour la caractérisation du chargement par spectroscopie infra-rouge en mode réflexions totales atténuées). Nous détaillons ici les préparations réalisées pour l'étude en microscopie confocale.

Les films multicouches de polyélectrolytes destinés à servir de réservoirs à l'insuline, sont déposés sur des lamelles de verre de 12 mm de diamètre (nettoyées sur un portoir suivant le protocole décrit précédemment).

Les lamelles supportant les films construits sont alors réparties en 4 groupes : le groupe témoin, un groupe qui sera immergé pendant 2h dans de l'insuline-FITC, un groupe qui y trempera 14h et un groupe qui y restera 24h. Le but de ces expériences est d'estimer le temps caractéristique nécessaire à un chargement uniforme du film. Pour ce faire, nous préparons trois flacons contenant une quantité suffisante d'insuline-FITC pour recouvrir totalement les lamelles (7.5 mL). Chaque lot de lamelles est disposé sur un portoir propre et immergé (avec le portoir) dans un de ces flacons contenant de l'insuline-FITC. Le chargement du film est réalisé à l'abri de la lumière (pour ne pas induire de photodégradation de la FITC). Chaque flacon est recouvert d'un film étanche pour éviter l'évaporation du solvant et donc pour éviter que l'insuline ne se concentre dans sa solution.

A la fin de la phase de chargement, les lamelles sont retirées de la solution d'insuline-FITC, rincées 2 fois en les trempant dans de l'eau milliQ, puis montées dans les portoirs destinés à l'observation en microscopie confocale (avec leur surnageant de 1 mL d'eau) pour être observés le jour même.

2.2 Méthodes de caractérisation et d'analyse

2.2.1 La microscopie

La microscopie à force atomique

Le microscope à force atomique AFM (pour « Atomic Force Microscopy ») permet d'imager la topographie d'une surface avec une résolution de l'ordre du nanomètre (**figure 2.20**). Son mode de fonctionnement dérive directement du microscope à effet tunnel (Scanning Tunneling Microscopy, STM) inventé en 1982 par l'équipe de Weibel (Binnig et al, 1982). L'AFM, mis au point en 1986 par Binnig (Binnig et al. 1986), ne cesse de se développer et permet l'étude de surface des matériaux à l'échelle atomique. C'est une technique de microscopie à sonde locale qui repose sur la détection d'une interaction entre une pointe (la sonde) de dimension nanométrique et une surface. La sonde, balayant la surface, est soumise à un ensemble de forces d'interactions (de type électrostatiques, Van der Waals, répulsions ioniques) qui conduisent à sa déflexion, d'où sont extraites les informations quantitatives (topographiques pour le mode image, courbe d'indentation pour le mode spectroscopie de force).

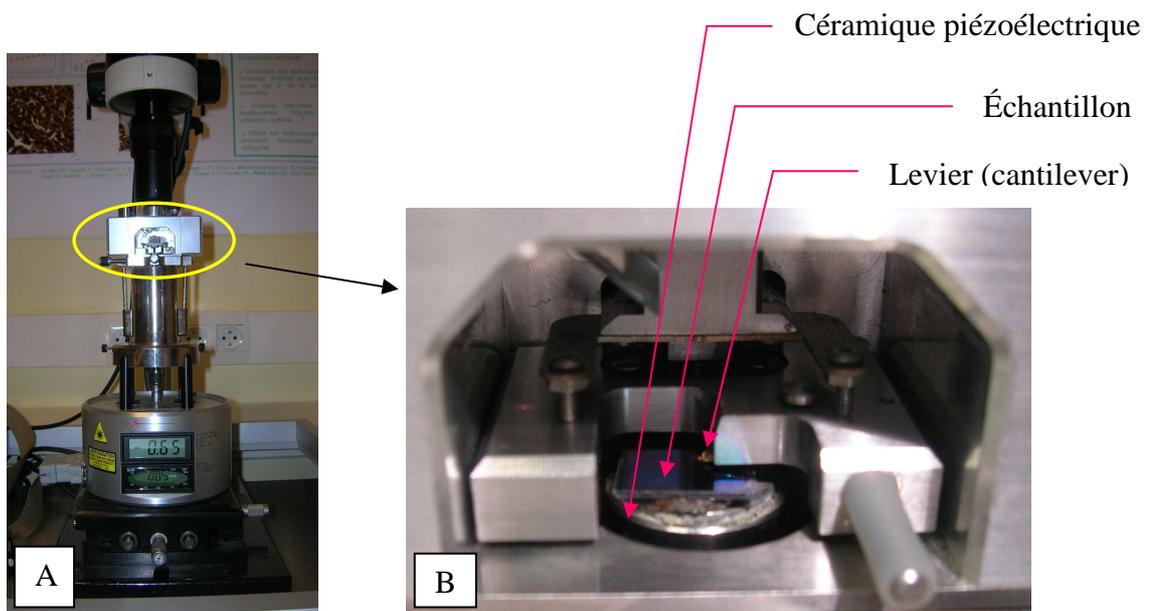


Figure 2.20 : A - Microscope à force atomique (AFM). B - cellule supportant l'échantillon et le cantilever.

Fonctionnement

La sonde est en général une pointe pyramidale en nitrure de silicium (Si_3N_4) montée sur un bras de levier (cantilever) caractérisé par une constante de raideur k (**figure 2.21**). La partie supérieure de la pointe est recouverte d'une mince couche de métal réfléchissant (or).

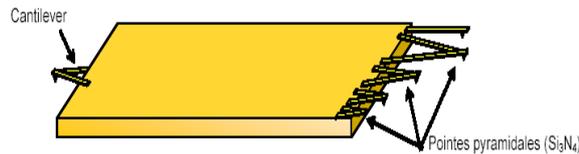


Figure 2.21 : Schéma d'une microplaquette (« chip ») comportant 6 cantilevers munis de leur pointe pyramidale.

L'échantillon est fixé sur un tube piézo-électrique 3D, autorisant des déplacements dans les 3 directions de l'espace (**figure 2.22**). La céramique piézoélectrique autorise des déplacements en x, y permettant à la pointe de balayer l'échantillon. Lors du balayage de la surface des forces d'interaction provoquent la déflexion du cantilever (sonde). Pour quantifier la déflexion, un faisceau laser est focalisé sur l'extrémité du cantilever et le faisceau réfléchi est détecté par un photodétecteur à 4 quadrants. Les variations de positions du faisceau réfléchi donnent des signaux d'intensité différente sur chacun des quadrants de la photodiode. Pour de faibles déflexions, il existe une relation linéaire entre le déplacement du cantilever et la différence entre les intensités reçues par les différents quadrants. L'intensité lumineuse est convertie en signal électrique (volts), puis convertie en déplacement (nm) par un logiciel.

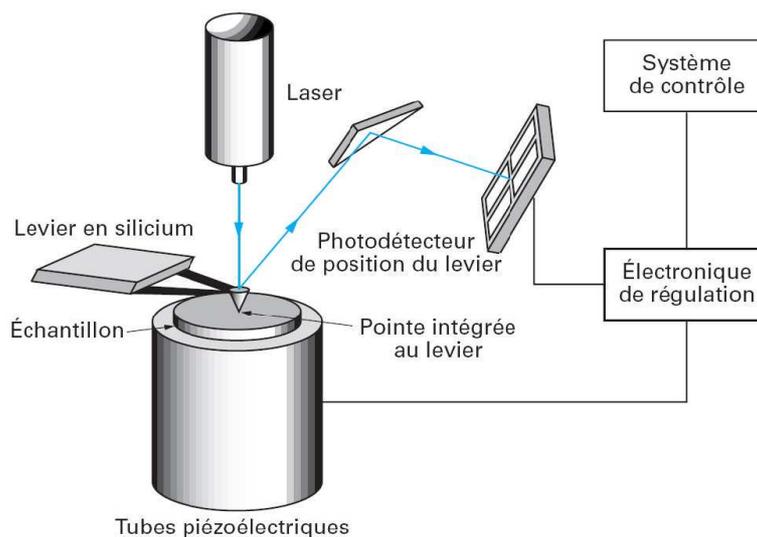


Figure 2.22 : Schéma de fonctionnement d'un microscope à force atomique.

On distingue 3 modes d'opération de l'AFM : le mode contact, le mode non-contact et le mode contact intermittent. Ces modes de fonctionnement exploitent différents types

d'interactions entre la pointe et la surface. Nous nous intéresserons au mode contact que nous avons utilisé pour réaliser nos images.

Le mode contact

Lors du mode contact, la pointe interagit avec la surface et peut être attirée ou repoussée par des interactions à courte distance. Le bilan de ces forces dévie le cantilever. Une boucle d'asservissement maintient la force d'interaction (déflexion du cantilever) constante, et ajuste en permanence la position en z de l'échantillon à l'aide du déplacement de la céramique piézo-électrique. Ce sont les déplacements relatifs de la céramique le long de l'axe z , par rapport à la position de référence (correspondant à une force d'interaction nulle), qui sont enregistrés et qui vont permettre de reconstruire point par point (pour chaque point (x,y) de la surface étudiée) l'image de la topographie de la surface.

Ces déplacements Δz sont traduits en fausse couleur (code de 12 ou 24 couleurs, où une couleur donnée correspond à un intervalle de hauteur Δh donné).

Réalisation d'une expérience de microscopie à force atomique

La topographie de surface et l'épaisseur des films (PSS-PDADMAC)₂₀ imprimés sont caractérisés au moyen de la microscopie à force atomique (Nanoscope IV et V de Veeco) (**figure 2.23 (A)**). Des images du tampon en PDMS sont aussi réalisées selon le même principe, à l'aide de l'AFM (**figure 2.23 (B)**).

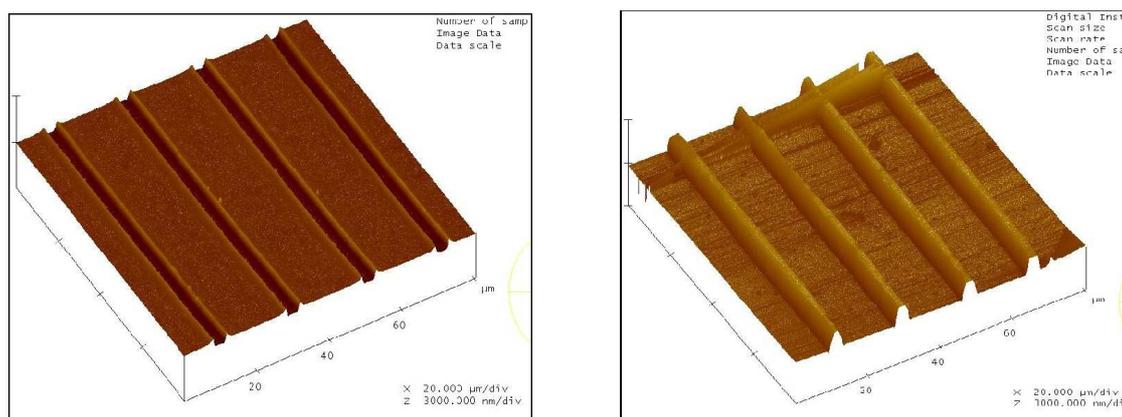


Figure 2.23 : Topographies AFM d'une surface de 80 μm x 80 μm ; (A): d'un tampon en PDMS utilisé pour l'impression de films PEI-(PSS-PDAMAC)₂₀, (B) : un film PEI-(PSS-PDADMAC)₂₀ imprimé avec un tampon imagé en (A).

Les images sont acquises (**figure 2.24 (A)**) à la fréquence de 2 Hz en mode contact et à l'état sec dans une direction perpendiculaire à l'orientation des lignes imprimées. Une camera

digitale est associée à l'AFM afin de visualiser la surface de l'échantillon sur un écran (**figure 2.24 (B)**) ainsi que l'approche de la pointe vers la surface.



Figure 2.24 : (A) Image numérique de la topographie de surface d'un film imprimé obtenue par la technique d'AFM ; (B) image digitale de l'ensemble de la surface du film et de la pointe, visionnée sur l'écran de contrôle relié à la caméra de l'AFM.

Chaque échantillon est imagé et la moyenne de la profondeur des créneaux de chaque échantillon est obtenue à partir de 6 sections, dans un plan orthogonal à la surface. Ceci nous permet de relever 6 mesures de la profondeur maximale des créneaux imprimés (**figure 2.25**) et aussi d'estimer la valeur moyenne de la profondeur des canaux.

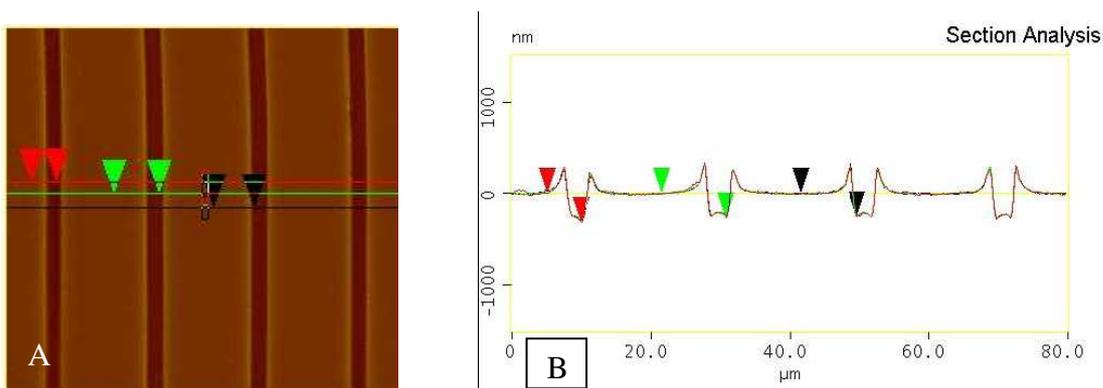


Figure 2.25 : (A) Trois lignes de sections, dans un plan normal à la surface de l'échantillon, visualisées en rouge, vert et noir. Les flèches marquent les endroits de mesure de profondeur des créneaux imprimés. (B) Représentation des trois sections superposées de l'échantillon, les flèches marquent les repères pris pour la mesure de la profondeur maximale de trois créneaux.

L'épaisseur des films de 20 paires de couches est aussi caractérisée par AFM. Pour se faire, il suffit d'endommager le film à l'aide d'une aiguille et de mesurer la différence de hauteur entre le film et son substrat. En ce qui concerne les expériences d'impression, 6 mesures sont réalisées pour chaque film afin de déterminer l'épaisseur moyenne d'un film.

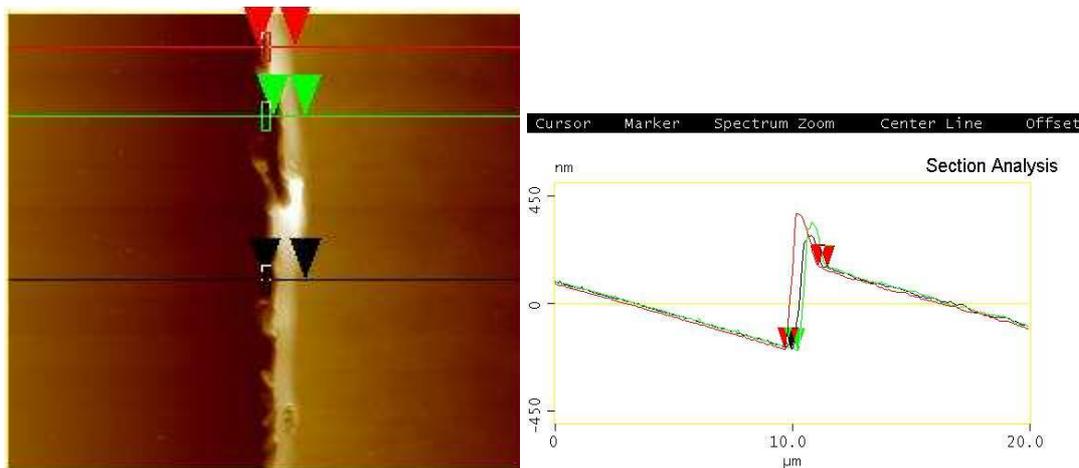


Figure 2.26 : Image AFM montrant le film et son substrat (« scratch »). Trois plans de coupe sont visualisés ainsi que les flèches matérialisant les points de mesures. (B) Représentation schématique des trois plans de coupes superposés, les flèches marquant les repères pris pour le relevé des mesures.

La microscopie confocale à balayage laser

Phénomène de fluorescence

La fluorescence est la propriété d'une molécule à réémettre un photon préalablement absorbé par une transition spectrale. L'émission de fluorescence se produit toujours à une longueur d'onde plus élevée que la longueur d'onde de la radiation utilisée pour assurer le passage d'un électron du niveau fondamental S_0 à un niveau d'énergie supérieur S_1 (diagramme de Jablonski, figure 2.27).

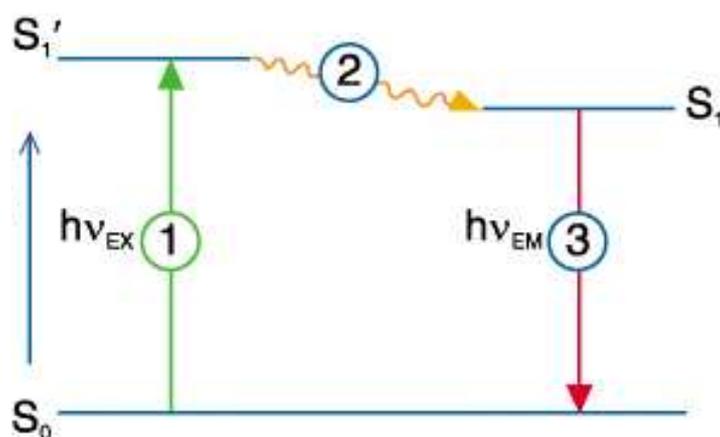


Figure 2.27 : Diagramme de Jablonski.

Lors de la désexcitation, la molécule perd d'abord de l'énergie par conversion interne (2) (dissipation d'énergie sous forme de chaleur, de vibrations ou de chocs moléculaires) et se retrouve à l'état excité d'énergie inférieure S₁. Elle subit ensuite une transition électronique de l'état S₁ à son état stable S₀ (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 la variation d'énergie mise en jeu lors de l'émission est plus faible que celle mise en jeu lors de l'excitation).

Les sondes fluorescentes

Les molécules fluorescentes sont généralement des hydrocarbures contenant des cycles aromatiques dans lesquels les doubles liaisons carbone-carbone sont conjuguées. Ces molécules relativement petites peuvent être liées de manière covalente à d'autres molécules sans perdre leurs propriétés de fluorescence et jouent ainsi le rôle de sonde ou de marqueur. Les sondes fluorescentes présentent une grande sensibilité de détection et permettent l'imagerie d'espèces marquées présentes dans des films multicouches de polyélectrolytes par des techniques de microscopie de fluorescence comme la microscopie confocale à balayage laser.

Principe de la microscopie confocale à balayage laser

Le microscope confocal à balayage laser (CLSM, pour Confocal Laser Scanning Microscope), est une technique qui permet de visualiser des échantillons en trois dimensions et qui fournit des images de haute résolution dans la direction perpendiculaire au substrat, en éliminant la lumière parasite.

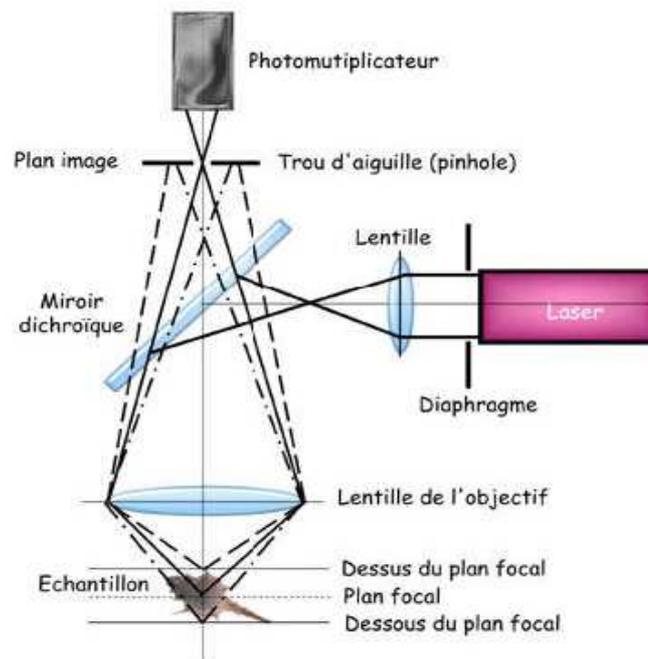


Figure 2.28 : géométrie de l'optique confocale à balayage laser.

L'illumination de l'échantillon par la lumière laser, ainsi que la détection du signal sont réduites à un point, grâce à l'utilisation de deux diaphragmes (un diaphragme de champ à l'illumination et un diaphragme détecteur à l'émission, le sténopé ou *pinhole*) de faible diamètre. Ces deux diaphragmes sont situés dans les plans confocaux, c'est-à-dire qu'ils sont tous deux conjugués au plan de mise au point (plan focal) dans l'objet. Ainsi la lumière émise hors du plan focal, ou fluorescence parasite (ligne en pointillé) n'atteint pas le détecteur (**figure 2.28**) et seuls les objets situés dans le plan focal contribuent à la constitution de l'image. La fluorescence émise par l'échantillon est recueillie par un photomultiplicateur. Le diamètre de la zone illuminée étant très petit ($0.3 \mu\text{m}$), la constitution de l'image totale de l'objet nécessite de balayer le faisceau laser point par point sur l'objet à l'aide d'un système constitué de deux miroirs vibrants (galvanomètre) en x, y. Le déplacement selon l'axe axial (z) est réalisé grâce à une platine motorisée qui en variant le plan focal permet d'obtenir une

série de coupes optiques appelées « séries Z ». Un empilement par projection de sections optiques conduit à une image reconstruite en 3D, dont la résolution spatiale est limitée par la résolution (résolution maximale théorique $d=0.61\lambda/NA$ où NA représente l'ouverture numérique de la lentille de l'objectif et λ la longueur d'onde utilisée).

Procédure expérimentale

Nous nous sommes servis d'un microscope inversé de type LSM 510 (Carl Zeiss, Jena, Allemagne). Ce microscope possède trois sortes de sources de laser :

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

Nous avons essentiellement utilisé un objectif à immersion dans l'huile (x40) d'ouverture numérique égale à 1.4 et d'une résolution verticale de 0.4 μ m.

Au cours de nos expériences nous avons utilisé les deux premiers lasers disponibles. La raie d'excitation à 488 nm fournie par le laser Argon nous a servi à exciter la fluorescence de l'isothiocyanate de fluorescéine qui fluoresce dans le vert, et le laser Hélium Néon I est adapté à l'excitation de la rhodamine, qui réémet dans le rouge.

Ne pouvant pas marquer le film PDADMAC-PAA, la première couche de PAH-Rho adsorbée sur la lamelle de verre nous a permis de détecter l'interface verre/film (en rouge). Une phase d'adsorption d'insuline-FITC (adsorption de 5 min, puis rinçage) sur nos films témoins, juste avant la prise d'image assurait la visualisation de la partie supérieure du film, afin de permettre la mesure de son épaisseur. Les films de polyélectrolytes étudiés en microscopie confocale étaient plongés pendant 2h, 14h ou 24h dans de l'insuline-FITC. C'est l'émission de fluorescente de la FITC qui nous a permis d'observer la diffusion de l'insuline dans les films. Toutes les observations ont été effectuées quelques heures après la fin de la phase de chargement du film afin d'éviter une trop grande diffusion non contrôlée d'insuline dans ces films.

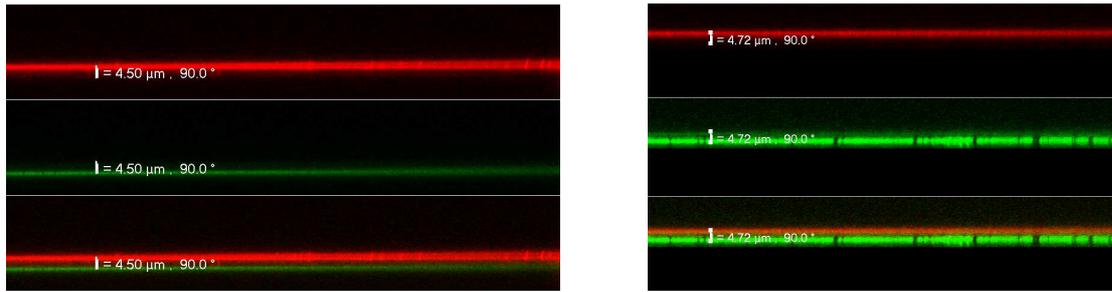


Figure 2.29 : Images de microscopie confocale à balayage laser des films $(\text{PDADMAC-PAA})_{30}$ mis en contact avec une solution d'insuline-FITC. Film témoin (à gauche) ; film ayant trempé pendant 2h dans la solution d'insuline fluorescente (à droite). Le canal supérieur ne montre que la lumière émise dans le rouge de la PAH-Rho, le canal du milieu ne montre que la lumière émise dans le vert de l'insuline-FITC et le canal inférieur conjugue les 2 images. Les canaux rouge et vert ont été découplés pour visualiser la contribution des deux marqueurs fluorescents : PAH-Rho et insuline-FITC.

2.2.2 L'ellipsométrie

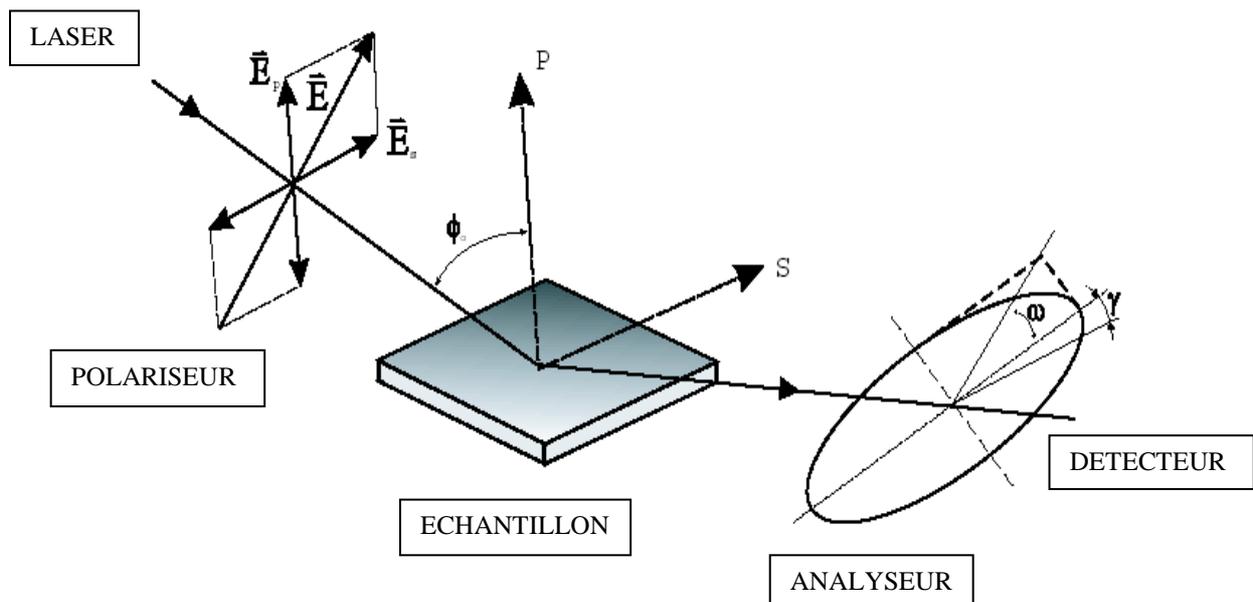


Figure 2.30 : Principe de fonctionnement d'un ellipsomètre.

L'ellipsométrie est une technique de caractérisation optique très utilisée pour la mesure d'épaisseur de films semi-conducteurs, de couches optiques minces, de films d'oxydes à la surface de métaux ou encore de films polymères. Elle a pour avantage d'être non destructive et d'offrir une mesure rapide et particulièrement sensible (en terme d'épaisseur de film). Elle repose sur un changement de l'état de polarisation de la lumière lors d'une réflexion sur la

surface séparant deux milieux inégalement réfringents. Rappelons que la direction de la polarisation de la lumière correspond à la direction du champ électrique. La mesure de ce changement de polarisation lors de la réflexion de la lumière permet de remonter aux propriétés optiques du film déposé, notamment son épaisseur et son indice de réfraction moyen, grâce à une modélisation de la couche déposée. Le modèle optique le plus simple est celui de la couche homogène et isotrope, mais il existe beaucoup de variantes à ce modèle simpliste.

Instrumentation

L'appareil utilisé est un ellipsomètre Laser (Jobin Yvon, model PZ 2000, France) qui permet la caractérisation de l'épaisseur (jusqu'à 20 μ m) de couches minces avec une précision de l'ordre de quelques dixièmes de nanomètres. La source lumineuse est un laser He-Ne dont l'angle d'incidence (qui est l'angle entre l'axe optique du bras source et la normale à la surface de l'échantillon) est maintenu constant et égal à 70°. Le faisceau laser est polarisé linéairement, grâce à un polariseur placé avant l'échantillon. Un analyseur, positionné après l'échantillon, est mis en rotation durant la mesure afin de déterminer la direction de polarisation du rayonnement après réflexion sur le substrat (**figure 2.30**).

Le support est une lame de silicium nettoyée et séchée selon le protocole décrit précédemment, et recouvert soit uniquement de sa couche d'oxyde (SiO₂), soit d'un film multicouche de polyelectrolyte.

L'épaisseur de la couche d'oxyde de silicium couvrant le substrat en silicium est mesurée à longueur d'onde du laser de 632.5 nm. L'épaisseur d'un film est calculée à partir des angles ellipsométriques mesurés (ψ et Δ) en faisant l'hypothèse que le film était uniforme et isotrope et en utilisant un index de réfraction égal à 1.465, qui correspond à la valeur de la silice pure à la longueur d'onde de 632.8 nm. Dans nos expériences, les valeurs d'épaisseur données sont la moyenne (\pm un écart type) de 5 mesures indépendantes prises à des intervalles réguliers le long d'un axe principal de la plaquette de silicium rectangulaire. L'épaisseur optique d'un film multicouche de polyelectrolytes est déterminée en soustrayant l'épaisseur de la couche de SiO₂ de l'épaisseur totale mesurée.

Les mesures d'épaisseur par ellipsométrie nécessitent l'utilisation d'échantillons préalablement séchés sous un flux d'azote, car nous ne disposons pas d'une cellule permettant de travailler en milieu liquide. Les échantillons sont réhydratés juste après la mesure lors de

mesures répétées en cours de construction. Lorsque les films sont construits à partir de solutions de NaCl la surface est rincée avec de l'eau Milli Q avant d'être séchée sous un courant d'azote. Cette précaution est nécessaire afin d'éviter la formation de cristaux de NaCl à la surface du substrat. Nous faisons évidemment l'hypothèse que le rinçage à l'eau MilliQ est suffisamment rapide pour enlever les ions Na^+ et Cl^- en surface du film sans modifier sa structure interne et donc son épaisseur.

2.2.3 Les techniques spectroscopiques

La spectroscopie infrarouge

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Via des mesures de transitions vibrationnelles des molécules, elle permet la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques et ainsi l'analyse qualitative et/ou quantitative des groupements chimiques présentes dans le matériau.

On considère que l'énergie totale d'une molécule est la somme de quatre contributions : l'énergie électronique (E_e), l'énergie de vibration (E_v), l'énergie de rotation (E_r) et l'énergie de translation (E_t) :

$$E_{\text{total}} = E_e + E_v + E_r + E_t \quad \text{avec } E_e \gg E_v \gg E_r > E_t$$

Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par un faisceau lumineux est voisine de l'énergie d'un mode de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchié ou transmise. Le domaine infrarouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} (c'est-à-dire pour des longueurs d'onde de $2.5 - 25 \mu\text{m}$) correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules.

Les vibrations caractéristiques des liaisons covalentes peuvent être classées en deux groupes distincts : les vibrations d'élongation, induisant des changements de longueur des liaisons (symétriques ou asymétriques) et des vibrations de déformations angulaires (cisaillement, torsion) ou de balancement (rotation pure, balancement).

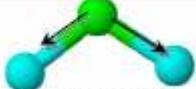
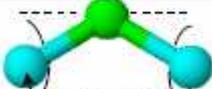
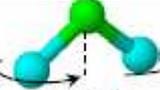
Modes d'élongation ("stretching")	Modes de déformation	
	déformations angulaires	vibrations de balancement
 Symétrique (v s)	 Cisaillement ("bending", δ)	 Balancement ("waving", w)
 Asymétrique (v as)	 Torsion ("scissoring", γ)	 Rotation ("rocking", r)

Tableau 2.2 : Modes d'élongation et de déformation des molécules.

Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela dépend aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie : pour qu'une vibration soit active en spectroscopie infra rouge, le moment dipolaire de la molécule doit être non nul dans ce mode de vibration. La position spectrale de ces bandes d'absorption va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse. Par conséquent à un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau : le spectre infra rouge constitue une sorte d'empreinte digitale d'un composé chimique. Les spectres infrarouges sont représentés en fonction du nombre d'onde, correspondant à l'inverse de la longueur d'onde de la radiation incidente. Le nombre d'onde est exprimé en cm^{-1} .

Principe de fonctionnement d'un spectromètre

L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et les intensités de l'absorption. La **figure 2.31** décrit le schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier.

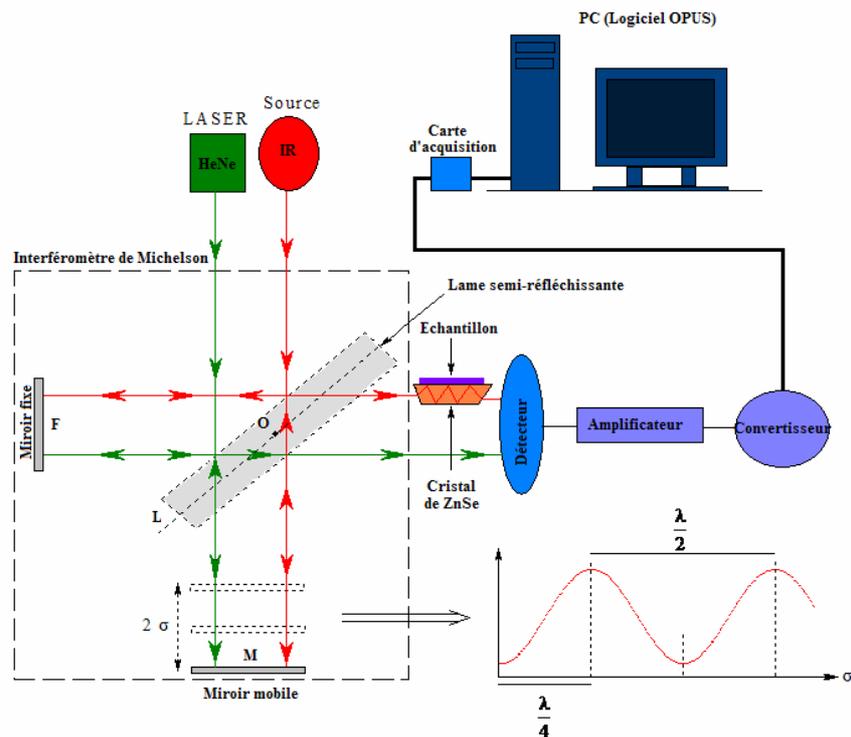


Figure 2.31 : Schéma du principe de fonctionnement d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier.

Le faisceau infrarouge polychromatique provenant de la source A est dirigé vers l'interféromètre de Michelson qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Dans l'interféromètre le faisceau lumineux arrive sur une lame séparatrice semi-réfléchissante, généralement une lame de KBr revêtue de Germanium. La moitié du faisceau est alors dirigée sur le miroir fixe, le reste passe à travers la lame séparatrice et est dirigé sur le miroir mobile. Quand les deux faisceaux se recombinaient, des interférences destructives ou constructives apparaissent en fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs vers l'échantillon, où des absorptions interviennent si une radiation particulière du faisceau traversant l'échantillon est absorbée. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique.

Le signal du détecteur apparaît comme un interférogramme, c'est-à-dire une signature de l'intensité en fonction de la position du miroir. L'interférogramme est transformé en un spectre par transformée de Fourier.

La résolution d'un spectromètre représente la différence de nombre d'onde entre deux raies spectrales voisines, qui peuvent être distinguées dans le spectre final. La résolution maximale est de 2 cm^{-1} pour notre appareil (Bruker IFS 55).

Les informations que l'on peut obtenir des spectres sont de deux sortes :

- les informations qualitatives : les longueurs d'ondes auxquelles l'échantillon absorbe, sont caractéristiques des groupes chimiques présents dans le matériau analysé. Des tables permettent d'attribuer les absorptions aux différents groupes chimiques présents,
- les informations quantitatives : l'intensité de l'absorption à la longueur d'onde caractéristique est reliée à la concentration du groupe chimique responsable de l'absorption. En mesurant l'aire du signal caractéristique on peut, si on connaît l'épaisseur de la couche, comparer la proportion d'un groupement chimique donné dans plusieurs échantillons ou si on a une composition constante avoir une idée de l'épaisseur des films les uns par rapport aux autres. Pour avoir une mesure absolue il convient d'étalonner auparavant les couches par une autre technique pour pouvoir établir une relation expérimentale entre intensité du signal et proportion ou épaisseur. Cependant en configuration de réflexions totales atténuées, l'intensité de l'onde pénétrant dans le film et la solution aqueuse est une fonction exponentielle décroissante de la distance entre l'interface ZnSe-solution et le point considéré. Cela complique considérablement l'analyse du signal. L'analyse du signal est beaucoup plus facile en mode transmission pour lequel la perte d'intensité lumineuse est directement reliée à la concentration des groupements étudiés par l'intermédiaire de la loi de Beer-Lambert.

Dans notre étude nous utilisons un cristal en séléniure de zinc (ZnSe) de forme trapézoïdale (**figure 2.32**). Le faisceau infrarouge entre sous une incidence normale par rapport à l'une des arêtes du cristal (l'arête du trapèze fait un angle $\alpha=45^\circ$ avec la base du cristal) et atteint l'interface entre le milieu 1 (cristal d'ATR) et le milieu 2 (film déposé sur le cristal). Le faisceau crée une onde évanescente dans le milieu 2 au-dessus du cristal d'ATR pourvu que la condition de la réflexion totale soit satisfaite. Le faisceau est ainsi réfléchi plusieurs fois avant de ressortir par l'autre face du prisme. L'intensité du faisceau sortant est alors mesurée par un détecteur de type MCT (mercury cadmium telluride) refroidi à la température de l'azote liquide. La courbe bleue représente l'évolution de l'intensité du champ électrique de l'onde évanescente par rapport à la distance à l'interface entre les milieux 1 et 2.

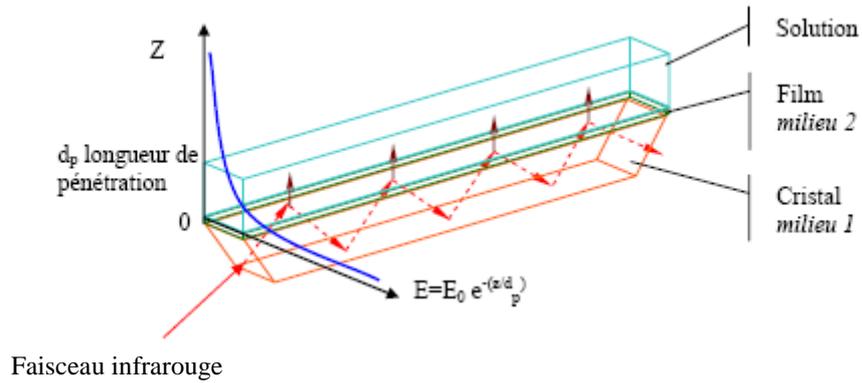


Figure 2.32 : Faisceau infrarouge traversant un cristal trapézoïdal d'ATR.

La spectroscopie UV – visible

Les spectroscopies dans les domaines de rayonnement allant de l'ultraviolet au proche infrarouge ($200 \text{ nm} \leq \lambda \leq 900 \text{ nm}$) sont des techniques de caractérisation très courantes dans les sciences physiques et chimiques en général. Elles tirent parti des interactions entre le rayonnement lumineux et les molécules et offrent l'avantage de permettre la détection de signatures caractéristiques de nombreuses espèces chimiques, ainsi que leur dosage.

Dans les expériences sur les films à compartiments fonctionnalisés par du TiO_2 , La spectroscopie UV-visible nous a permis de détecter la présence caractéristique de PSS dans le premier compartiment $(\text{PDADMAC-PSS})_{20}$ et de TiO_2 dans le compartiment supérieur constitué d'un dépôt $(\text{PDADMAC-TiO}_2)_n$.

Principe

Les atomes absorbent ou émettent des radiations dont la longueur d'onde λ se situe dans le domaine des rayonnements ultraviolets, ou dans le domaine du spectre visible. Ce sont les couches électroniques externes du nuage électronique des atomes ou des molécules qui sont impliquées dans ce processus au cours duquel l'absorption d'un photon de longueur d'onde appropriée peut provoquer la promotion d'un électron d'une orbitale liante ou non-liante vers une orbitale d'énergie plus élevée. Le principe de construction de ce type de spectromètre est représenté dans la figure 2.33.

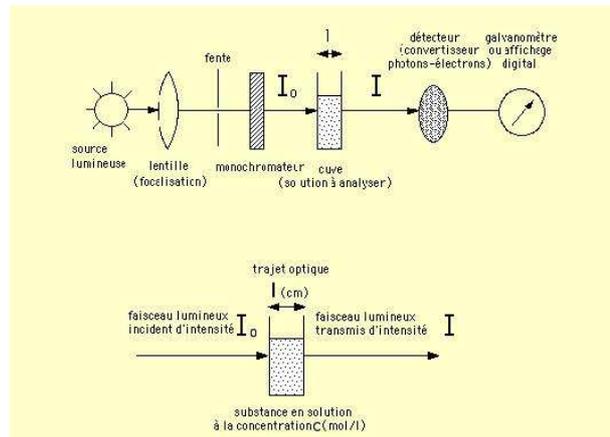


Figure 2.33: Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre monofaisceau permettant de mesurer l'absorption de la lumière, dans le domaine UV-Visible du spectre électromagnétique, par des molécules en solution (ou adsorbées sur une surface).

Du point de vue quantitatif, on mesure l'atténuation de la lumière à une fréquence donnée, soit I/I_0 où I et I_0 sont respectivement l'intensité lumineuse à la sortie de la cellule et à l'entrée. Ce rapport définit la transmission T . On peut également calculer l'absorbance, A , à partir des mesures expérimentales avec :

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right)$$

L'absorbance est reliée à la concentration des molécules d'intérêt par la loi de Beer-Lambert :

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot l \cdot c$$

où $A(\lambda)$ et $\varepsilon(\lambda)$ représentent respectivement l'absorbance et le coefficient d'extinction moléculaire à la longueur d'onde λ . l est la longueur du trajet optique à travers la cuvette de mesure et c la concentration du soluté d'intérêt.

Dans nos expériences, le film étudié étant déposé sur une lame de quartz, puis séché (sous flux d'azote ou dans une étuve à 70°C), le trajet optique parcouru par le faisceau dans la cuve du spectromètre équivaut à l'épaisseur du film (l'épaisseur de la lame de quartz a été prise en compte lors de la mesure du blanc, c'est-à-dire l'atténuation de l'intensité lumineuse lors de son passage à travers la lame de quartz non recouverte de film).

Il est ainsi possible de suivre la construction d'un film multicouche, l'absorbance augmentant avec la quantité de matériau déposé, pourvu que le matériau en question possède une bande d'absorbance aux longueurs d'ondes adéquates.

Le spectromètre utilisé est de modèle UV mc² (SAFAS, Monaco).

2.2.4 Mesures d'angle de contact

La mesure des angles de contact a été effectuée à l'aide d'un appareil Digidrop à l'Institut Charles Sadron. Une goutte d'eau de 6 μL est déposée sur la surface à étudier dans un compartiment à température régulée. Une source lumineuse, positionnée derrière la goutte, la fait alors apparaître plus foncée permet son observation par une caméra (**figure 2.34**). L'image est enregistrée par le système vidéo relié à un ordinateur. L'angle formé entre la surface et la tangente à la goutte est dessiné à l'image par l'opérateur grâce à un logiciel qui permet aussi de déterminer automatiquement sa mesure. Nos données sont des valeurs moyennes issues de la mesure de 3 gouttes d'eau différentes.



Figure 2.34 : Exemples de mesures de l'angle de contact formé entre la surface et la tangente à la goutte d'eau déposée sur la surface. A gauche l'angle proche de 20° est caractéristique d'une surface hydrophile. A droite l'angle proche de 90° est caractéristique d'une surface hydrophobe.

CHAPITRE 3 : Microimpressions de canaux dans des films multicouches de polyélectrolytes

3.1 Résumé

3.2 Article 1

Ladhari N., Hemmerlé J., Haikel Y., Voegel J.C., Schaaf P., Ball V. Stability of embossed PEI-(PSS-PDADMAC)₂₀ multilayer films versus storage time and versus a change in ionic strength. *Applied Surface Science*, 2008, 255 : 1988-1995.

3.1 Résumé

Le but de cette étude a été d'étudier la stabilité dans le temps de microcanaux imprimés dans des films multicouches de polyélectrolytes. Des expériences préliminaires ainsi qu'une étude bibliographique ont montré que parmi tous les types de films multicouches de polyélectrolytes, seuls ceux construits à partir de polystyrène-4-sulfonate (PSS) et de chlorure de poly(diallyl dimethyl ammonium) (PDADMAC) ou ceux à base d'acide poly(acrylique) (PAA) et de poly(allylamine) (PAH) pouvaient subir une contrainte permettant d'atteindre une déformation plastique irréversible. Pour cela, nous avons construit des films PEI-(PSS-PDADMAC)₂₀ par la méthode de nébulisation alternée des couches, les polyélectrolytes ayant été solubilisés dans du NaCl à 1M. Des expériences effectuées à taux de sel plus faible ont montré que la reproduction des formes du moule en poly(dimethylsiloxane) dans les films n'était pas fidèle. En suivant la construction de ces films par ellipsométrie, nous avons constaté que l'épaisseur augmentait de façon « supralinéaire » jusqu'à atteindre une valeur de (400 ± 50) nm pour un film constitué de 20 paires de couches.

Les expériences d'impression ont été réalisées en présence de la solution de NaCl (1M) utilisée pour construire les films multicouches.

En déposant des masses de 0.3 à 2 kg pendant 1h sur le sommet du piston d'impression, nous avons fait varier la contrainte appliquée sur la partie du film exposée aux motifs du moule en PDMS. Nous avons obtenu la meilleure reproductibilité des formes du tampon de PDMS en déposant une masse de 1kg pendant 1h. Nous avons pu calculer que nous appliquions alors une contrainte de l'ordre de 1.4 MPa sur notre échantillon. Ce calcul a été effectué en considérant que la force appliquée n'est transmise au film que par l'intermédiaire des parties exposées du moule en PDMS.

Nous avons réussi à imprimer la forme de canaux longitudinaux parallèles entre eux. Les motifs obtenus dans le film présentent des bourrelets de fluage de forme triangulaire de part et d'autre du canal imprimé. Ces bourrelets sont caractéristiques d'une déformation plastique. Le volume de ces bourrelets correspond approximativement au volume du canal créé dans le film multicouche. Cette déformation plastique irréversible s'effectue donc probablement à volume constant.

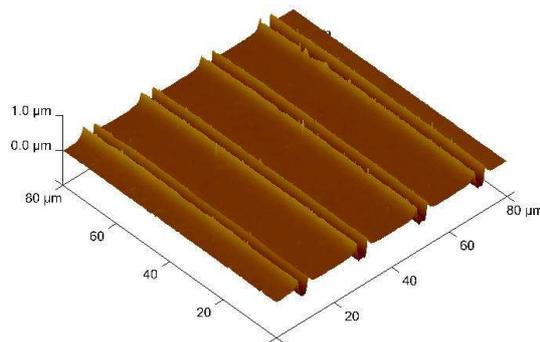


Figure 3.1 : Image AFM d'un film PEI-(PSS-PADAMAC)₂₀ imprimé par l'application d'une contrainte de 1.4 MPa pendant 1h.

Le module élastique des films (PDADMAC-PSS)_n a été mesuré deux fois dans des publications. La première étude a porté sur des films (PDADMAC-PSS)₅ construits en présence d'une solution de NaCl à 0.5M (Gao et al. 2001). Ces films ont été déposés par un procédé d'adsorption séquentielle sur des particules de mélamine. La dissolution du coeur de ces particules en présence d'une solution d'acide chlorhydrique a permis la création de capsules creuses. Les propriétés mécaniques de ces capsules ont été étudiées en mesurant leur déformation par microscopie confocale suite à l'augmentation de la force ionique des solutions mises en contact avec ces capsules. Cette augmentation de force ionique produit une augmentation de la pression osmotique et donc de la contrainte subie par les capsules creuses. Le module élastique calculé à partir de ces mesures et d'un modèle physique approprié a été de 140 MPa. L'autre étude était basée sur une méthode d'indentation par bille colloïdale fixée sur un bras de levier du microscope à force atomique (Mueller et al. 2005). L'ajustement du modèle de Hertz aux mesures expérimentales a conduit à un module de Young à 100 MPa. Contrairement aux mesures effectuées avec des capsules creuses, ces mesures par microscopie à force atomique ont été effectuées dans un milieu sans sel. Il faut noter que la contrainte appliquée dans nos expériences d'impressions est de nature différente de celle exercée dans ces études, puisqu'elle correspond à une compression uniaxiale. A notre connaissance la limite élastique des films PDADMAC/PSS n'a pas non plus été déterminée, ce qui ne nous permet pas de justifier de manière rigoureuse que nous avons bien atteint le domaine de déformation plastique. Empiriquement il semble qu'une contrainte de l'ordre du Mpa soit nécessaire pour déformer un film (PDADMAC-PSS)₂₀ de manière irréversible. Une contrainte similaire n'induit aucune déformation irréversible dans un film (PSS-PAH)₂₀ construit dans les mêmes conditions de force ionique. Cela montre que les films (PSS-PAH)₂₀ restent dans le

domaine de déformation élastique lors de l'application d'une contrainte de compression uniaxiale de l'ordre du MPa.

Remarquons que dès que nous arrêtons l'impression (au bout d'une heure), le tampon est enlevé rapidement, le film est rincé à l'eau (pendant 5s) puis aussitôt séché. Il est possible que le séchage diminue considérablement la mobilité des chaînes permettant ainsi de conserver la déformation irréversible qui y a été imposée lors du processus d'impression.

Nous avons montré que les films imprimés dans les conditions décrites précédemment gardaient leur morphologie et leur profondeur non seulement au cours du temps (jusqu'à 9 mois, quand ils sont conservés à sec), mais aussi en présence d'une solution proche de celles rencontrées dans un milieu physiologique.

Ainsi, lorsque l'on immerge des films (PDADMAC-PSS)₂₀ qui ont été « microstructurés » dans une solution de NaCl à 0.15 M, la profondeur des canaux obtenus reste inchangée au cours du temps (**figure 3.2**).

De plus, la spectroscopie infra rouge en mode réflexions totales atténuées (ATR-FTIR) nous a confirmé que lorsque l'on soumet le film (PDADMAC-PSS)₈ à une solution de force ionique inférieure à celle utilisée lors de sa construction (0,15 M de NaCl au lieu de 1 M), les bandes d'absorbance attribuées aux vibrations du PSS restent inchangées. Seule la bande correspondant au solvant (D₂O) diminue légèrement dans les minutes suivant la diminution de force ionique puis ne varie plus. Ceci démontre que lorsque la force ionique diminue il n'apparaît qu'un petit dégonflement du film. Ce phénomène semble dû à une légère perte d'eau, ce qui explique la grande stabilité des canaux imprimés.

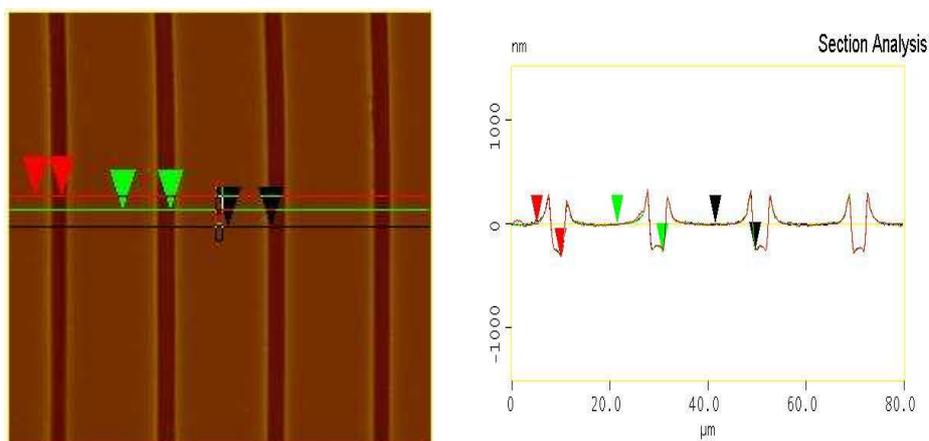


Figure 3.2 : A gauche : image AFM d'un film imprimé, stocké pendant 6 mois à sec, puis mis en contact avec une solution NaCl à 0.15M (1h, 3h ou 6h) : la profondeur des canaux reste inchangée. A droite : mesures de la profondeur des canaux à l'AFM.

Lorsque que le film est exposé à une force ionique supérieure (NaCl 4M) à celle utilisée lors de la construction, la spectroscopie infra-rouge montre que l'absorbance correspondant aux vibrations du PSS diminue de 45% après 6 min d'exposition à la solution saline, alors que la bande d'absorbance du D₂O est peu affectée. Cette diminution du signal caractéristique du PSS peut être attribuée à une érosion du film. Celle-ci a été confirmée par AFM. En effet, un film (PDADMAC-PSS)₂₀ imprimé, exposé pendant 6h à une solution de NaCl 4 M, puis observé à sec, ne permet plus d'observer de canaux et son épaisseur passe de 400 nm à 150 nm (**figure 3.3**).

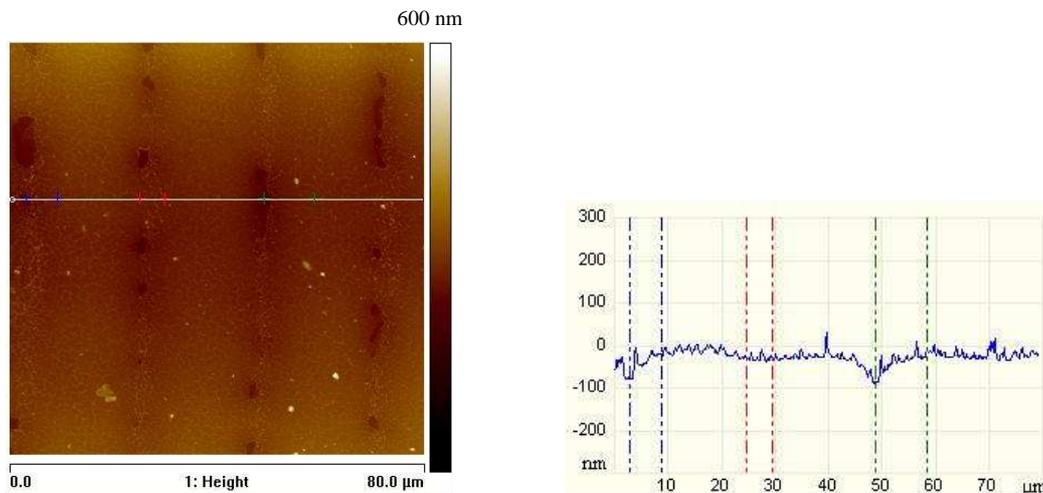


Figure 3.3 : A gauche : image AFM d'un film imprimé, stocké pendant 6 mois à sec, puis mis en contact avec une solution de NaCl à 4M (pendant 6h) : le film est érodé et seules les traces des microcanaux imprimés restent observables. A droite : section du film résiduel, obtenue par AFM.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Stability of embossed PEI-(PSS–PDADMAC)20 multilayer films versus storage time and versus a change in ionic strength

Nadia LADHARI, Joseph HEMMERLE, Youssef HAIKE, Jean-Claude VOEGEL, Pierre SCHAAF and Vincent BALL

Applied Surface Science, vol. 255, n° 5, part. 1, pages 1988-1995

Pages 82-89 :

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

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

<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.apsusc.2008.06.198>

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/>

CHAPITRE 4 : Fonctionnalisation des films multicouches par des nanoparticules de TiO₂

4.1 Fabrication de nanoparticules de TiO₂

4.1.1 Résumé

4.1.2 Article 2

Laugel N., Hemmerlé J., **Ladhari N.**, Arntz Y., Gonthier E., Haikel Y., Voegel J. C., Schaaf P., Ball V. Composite films of polycations and TiO₂ nanoparticles with photoinduced superhydrophilicity. *J Colloid Interface Sci*, 2008, 324 : 127-133.

4.2 Films compartimentés fonctionnalisés avec des nanoparticules de TiO₂

4.2.1 Résumé

4.2.2 Article 3

Ladhari N., Hemmerle J., Ringwald C., Haikel Y., Voegel J.C., Schaaf P., Ball V. Stratified PEI-(PSS-PDADMAC)₂₀-PSS-(PDADMAC-TiO₂)_n multilayer films produced by spray deposition. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2008, 322 : 142-147.

4.3 Résultats complémentaires

4.1 Fabrication de nanoparticules de TiO₂

4.1.1 Résumé

Le travail présenté dans cet article correspond à l'étude de films formés par des dépôts réactifs obtenus par nébulisations successives d'une polyamine (la polyéthylène imine, PEI) et d'un précurseur du TiO₂. Ce précurseur est le bis(ammonium lactato) dihydroxyde de titane (IV), aussi désigné par TiBisLac (**figure 4.1**).

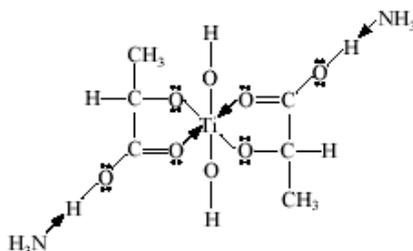


Figure 4.1 : Formule développée du bis (ammonium lactato) dihydroxyde de titane (IV) ou TiBisLac.

Ce composé a été choisi comme précurseur du TiO₂ car il a déjà été montré qu'il pouvait former un gel de dioxyde de titane en présence de silicatéines (protéines sécrétées par des algues marines monocellulaires, les diatomées, dans le processus de formation de silice à partir d'acide silicilique) (Sumerel et al. 2003). Par ailleurs, l'équipe de F. Caruso a montré que ce précurseur associé à divers polycations, permettait de former des films d'épaisseur croissante en fonction du nombre de paires de couches déposées. Ces expériences ont été réalisées à la fois sur des substrats plats et sur des colloïdes (Caruso et al. 2002 ; Shi et al. 2002). Nous considérons que les dépôts alternés d'une polyamine et du TiBisLac sont des dépôts « réactifs », car la présence du polycation accélère la cinétique de formation du dioxyde de titane. Nous préférons ne pas parler de « catalyse », car un catalyseur n'intervient pas dans le produit final de la réaction, ni dans le bilan de celle-ci. Or il se pourrait que certains monomères du polycation se trouvent piégés dans la structure des nanoparticules obtenues.

Nous avons montré que la méthode simple de dépôts réactifs couche-par-couche (soit par nébulisation soit par immersion) permettait d'obtenir des films (PEI-TiBisLac)_n d'épaisseur contrôlée. L'épaisseur de ces films augmente de façon linéaire en fonction du nombre de paires de couches déposées et l'incrément d'épaisseur par paire de couche est maximal pour une concentration en TiBisLac égale à 5mM dans (dans ces expériences, la concentration en

PEI est constante et égale à 0.5mg/mL). La microscopie électronique à transmission (MET) révèle la présence d'inclusions inorganiques distribuées de façon homogène à la surface des films (PEI-TiBisLac)₂₅. Le diamètre moyen de ces particules est de 4.9 ± 1.2 nm. De plus, la diffraction des rayons X montre que les films contiennent une phase cristalline de TiO₂. Il est fort probable que le polymorphe obtenu soit l'anatase plutôt que le rutile, la phase cristalline la plus stable du TiO₂. La mesure de l'absorbance des films (PEI-TiBisLac)_n à $\lambda=242$ nm, en fonction du nombre de paires de couches déposées, montre qu'un film comprenant n= 30 paires de couches atténue l'intensité de la lumière UV transmise de deux ordres de grandeur. Cette atténuation n'est pas due à un phénomène de diffusion de la lumière, mais à une absorption par le semi-conducteur TiO₂ dont la largeur de la bande interdite 3.2 eV correspond à un seuil de coupure à 365 nm dans le spectre UV-visible. Effectivement, les films sont complètement transparents pour des longueurs d'onde supérieures à 365 nm alors que dans le cas d'un mécanisme d'atténuation par diffusion de la lumière, le spectre présenterait une absorbance décroissante de manière continue au-delà de cette longueur d'onde de coupure. Cette observation expérimentale permettrait d'utiliser ces films (PEI-TiBisLac)_n comme recouvrement filtrant les rayons UV. Ces films pourraient aussi être utilisés comme recouvrement antibactérien après irradiation par un rayonnement UV suffisamment énergétique, c'est-à-dire de longueur d'onde inférieure à 365 nm (Kikuchi et al. 1997).

Finalement, l'irradiation de films (PEI-TiBisLac)₂₅ avec une lampe émettant dans l'UV, suivie par la mesure de l'angle de contact statique de gouttes d'eau à la surface des films, nous a permis de vérifier la propriété de super hydrophilie photoinduite du TiO₂ (Wang et al. 1997 ; Tokudome et Miyauchi 2004).

Ces travaux, mettant en évidence la condensation du TiBisLac en nanoparticules de TiO₂, ainsi que ceux montrant la condensation possible d'une solution d'acide silicique en particules de silice (Laugel et al. 2007), ont abouti à la mise au point d'une méthode brevetée permettant de construire des films composites contenant à la fois des molécules organiques et des particules inorganiques.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Composite films of polycations and TiO₂ nanoparticles with photoinduced superhydrophilicity

Nicolas LAUGEL, Joseph HEMMERLE, Nadia LADHARI, Youri ARNTZ, Eric GONTHIER, Youssef HAIKEL, Jean-Claude VOEGEL, Pierre SCHAAF and Vincent BALL

Journal of Colloid and Interface Science, 2008, vol. 324, n° 1-2, pages 127-133

Pages 94-100 :

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

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

<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jcis.2008.05.018>

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/>

4.2 Films compartimentés fonctionnalisés avec du TiO₂

4.2.1 Résumé

Les films stratifiés sont constitués de deux films multicouches de composition et donc de propriétés différentes. Il est intéressant de recouvrir un premier film, à croissance exponentielle donc hautement hydraté, et pouvant être utilisé comme réservoir de drogues, par un deuxième film à croissance linéaire, de nature et de perméabilité différentes, dans le but par exemple de pouvoir contrôler la libération de ces drogues. Nous avons voulu structurer l'architecture d'un tel film en utilisant les résultats développés dans les articles 1 et 2. Le but de l'étude suivante est de montrer que l'on peut construire des films stratifiés utilisant comme compartiment inférieur un film (PDADMAC-PSS)₂₀, déposé dans les mêmes conditions que celles décrites pour les films microimprimés, et les fonctionnaliser en surface par le dépôt d'une strate supérieure contenant des nanoparticules de TiO₂, grâce à la méthode originale du dépôt par nébulisation réactive couche-par-couche (LbL). Nous avons ainsi construit des films dont le premier compartiment de (PDADMAC-PSS)₂₀, déposé en présence de NaCl à 1M, était recouvert d'un compartiment supérieur formé de n paires de couches de PDADMAC et du précurseur de TiO₂, le TiBisLac (**figure 4.2**)

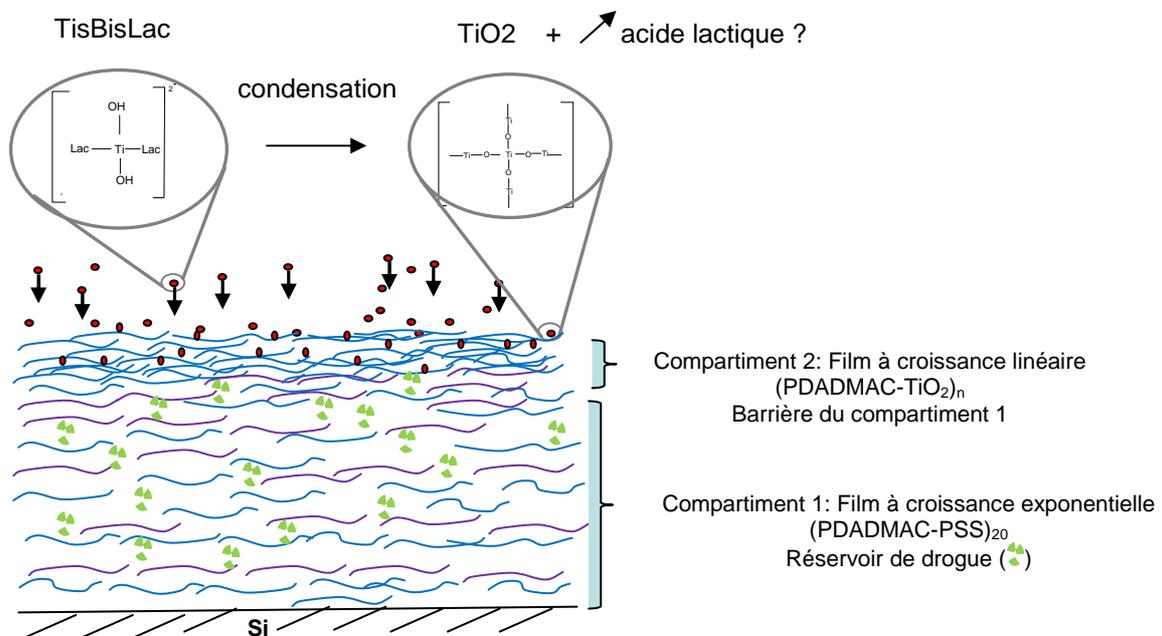


Figure 4.2 : Représentation schématique de l'hydrolyse et de la condensation du TiO₂ sur le PDADMAC. « Si » représente le support en silicium, — représente le polyélectrolyte PDADMAC, — représente le polyélectrolyte PSS, • les nanoparticules, et ▲ des drogues éventuelles.

L'ellipsométrie a permis de mettre en évidence que le compartiment inférieur présentait un régime de croissance supralinéaire, tandis que le compartiment supérieur de (PDADMAC-TiO₂)_n, avait une croissance linéaire.

La spectroscopie UV-visible nous a apporté la preuve que le PSS (qui présente un pic d'absorbance à $\lambda=225$ nm) entrainait dans la composition du premier compartiment et que le TiO₂ (qui présente un pic d'absorbance à $\lambda=260$ nm) était un constituant de la deuxième strate.

Par spectroscopie infra rouge en mode réflexions totales atténuées (ATR-FTIR), nous avons observé que lorsque la première strate était significativement plus épaisse que la profondeur de pénétration de l'onde évanescente (environ 1 μm à l'interface ZnS/eau et pour un nombre d'onde de 1000 cm^{-1}), aucun signal dû aux vibrations du TiO₂ de la seconde strate n'était détecté. Ce qui nous permet de conclure que les nanoparticules restent majoritairement concentrées dans la strate supérieure de (PDADMAC-TiO₂)_n. Nous avons également démontré que la couche superficielle riche en TiO₂ modifie les propriétés de surface du film. En effet la mesure d'angles de contact sur ces films stratifiés, après 5 min d'irradiation à la lumière ultraviolette, montre que le film acquiert des propriétés de surface de super hydrophilie photoinduite, et ce même après le dépôt de seulement trois paires de couches.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Stratified PEI-(PSS-PDADMAC)20-PSS-(PDADMAC-TiO₂)_n multilayer films produced by spray deposition

Nadia LADHARI, Joseph HEMMERLE, Christian RINGWALD, Youssef HAIKEL, Jean-Claude VOEGEL, Pierre SCHAAF and Vincent BALL

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2008, volume 322, n° 1-3, pages 142-147

Pages 103-108 :

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

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

<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.colsurfa.2008.03.011>

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/>

4.3 Résultats complémentaires

Dans le but d'accroître les potentialités des films multicouches de polyélectrolytes, nous avons cherché à développer une « multifonctionnalisation » de ces films, en combinant nos différents résultats. Nous avons donc cherché à savoir s'il était possible d'imprimer des canaux longitudinaux dans des films stratifiés, fonctionnalisés par du TiO_2 .

Nous avons ainsi réalisé quelques expériences préliminaires, qui même si elles méritent d'être répétées, nous ouvrent néanmoins des pistes de réflexions. En effet, nous avons construit un film stratifié $\text{PEI}-(\text{PDADMAC-PSS})_{20}$ recouvert cette fois par 20 paires de couches de (PDADMAC-TiO_2) . La construction suivie par ellipsométrie révèle comme précédemment la réalisation d'un film stratifié dont le compartiment inférieur suit un régime de croissance exponentiel et le compartiment supérieur, un régime de croissance linéaire (**figure 4.3**). Néanmoins, nous remarquons à ce stade qu'il se produit une diminution de l'épaisseur du premier film lors de la superposition de la seconde strate, ce qui évoque un « tassement » du premier compartiment, probablement dû à une perte d'eau. Cette hypothèse pourrait être vérifiée, par exemple par une expérience de spectroscopie infra-rouge en mode ATR.

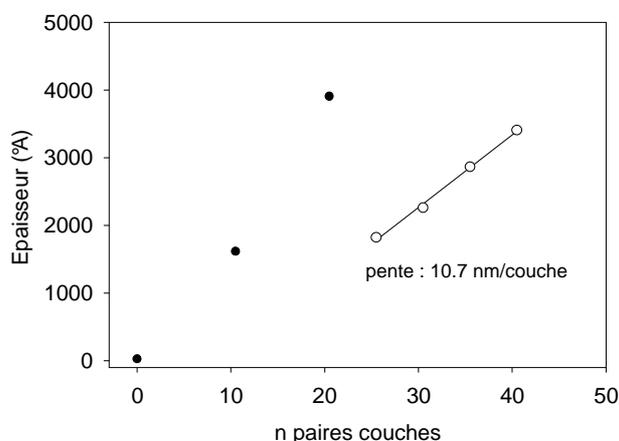


Figure 4.3 : Mesure de l'épaisseur d'un film stratifié $\text{PEI}-(\text{PDADMAC-PSS})_{20}-(\text{PDADMAC-TiO}_2)_{20}$, en fonction du nombre de paires de couches déposées. La première strate $\text{PEI}-(\text{PSS-PDADMAC})_{20}$ a été construite en présence de NaCl 1M (polyélectrolytes à 1mg/mL). Dans la deuxième strate, le TiBisLac (à 10mM) et le PDADMAC (à 1mg/mL) étaient dilués dans du Tris à 50mM.

La deuxième étape a consisté à tenter l'impression de ces films en suivant exactement le même protocole que celui décrit pour nos expériences d'impressions dans les films $\text{PEI}-(\text{PDADMAC-PSS})_{20}$. L'observation des films à l'AFM, après impression et séchage, a révélé qu'il était possible d'imprimer ce type de films stratifiés (**figure 4.4**).

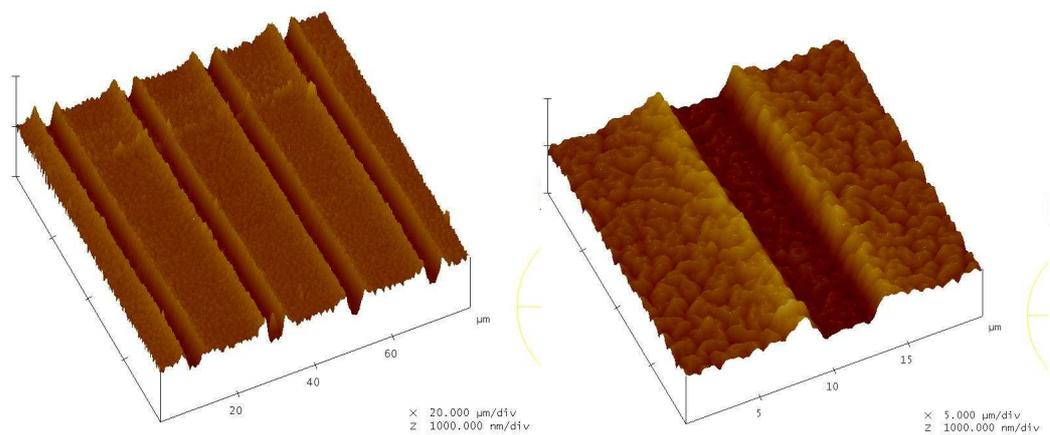


Figure 4.4 : Images AFM (3D) de la topographie d'un film PEI-(PSS-PDADMAC)₂₀-(TiBisLac-PDADMAC)₂₀ après impression. A gauche la surface imagée est de 80 μm x 80μm, et à droite l'observation porte sur une surface de 20μm x 20μm.

La topographie de surface visualisée à sec laisse apparaître un aspect vermiforme de ce film. Une section en « z » montre la profondeur des canaux (**figure 4.5**).

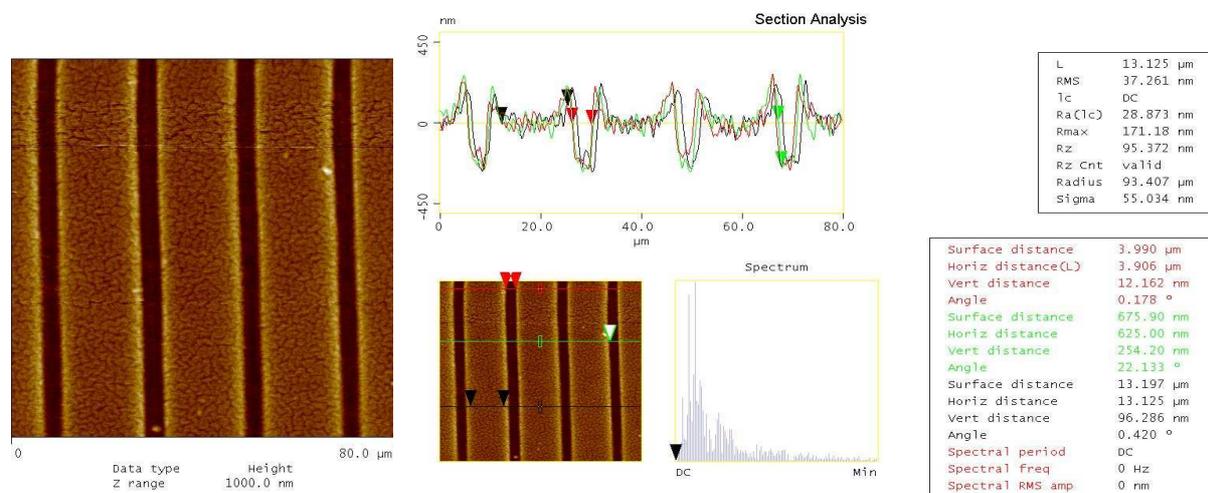


Figure 4.5 : A gauche : images AFM (2D) de la topographie d'un film PEI-(PSS-PDADMAC)₂₀-(TiBisLac-PDADMAC)₂₀ après impression. A droite, la section du film montre l'impression de canaux.

Enfin, dans un troisième temps nous avons pu remarquer que si l'on mettait ce même film à nouveau en contact avec une solution de Tris 50mM pendant 36h, les formes imprimées perduraient.

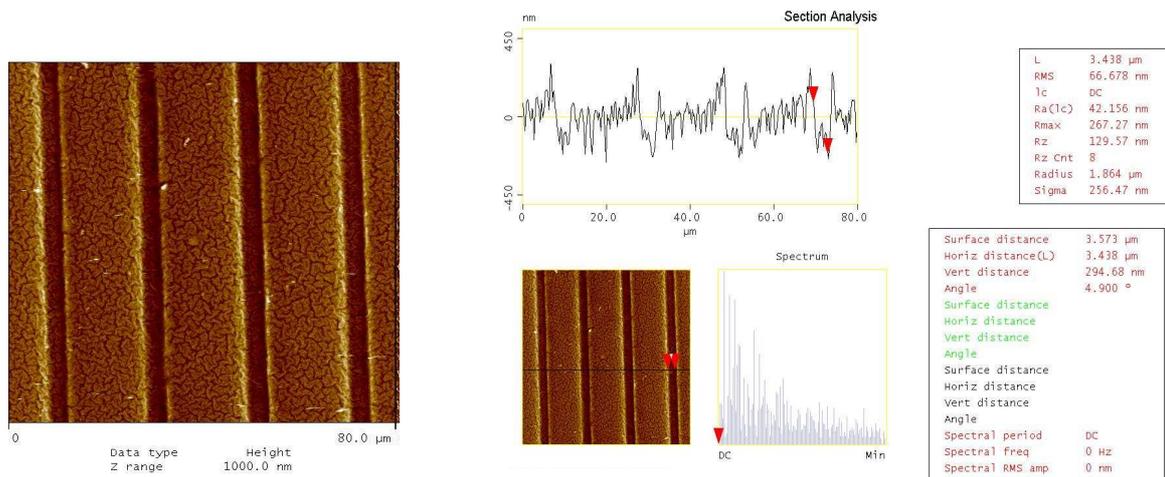


Figure 4.6 : A gauche : images AFM d'un film PEI-(PSS-PDADMAC)₂₀-(TiBisLac-PDADMAC)₂₀ imprimé après 36h d'immersion dans du Tris 50mM. A droite, la vue de la section du film permet encore de distinguer l'impression des canaux.

Conclusion

Ces premières expériences suggèrent que l'on peut construire des films stratifiés, fonctionnalisés en surface par du TiO₂ et que l'on peut les imprimer. Ce type de films pourrait alors présenter simultanément trois propriétés : (1) être un réservoir de drogues, (2) acquérir des propriétés de surface caractéristiques du TiO₂, et (3) permettre une déformation plastique microscopique, stable dans le temps, aussi bien à sec que dans un environnement aqueux (stockage pendant plusieurs heures dans du tampon Tris).

Les propriétés de surface visées concernent ici la modification de la mouillabilité grâce à la possibilité d'acquérir une superhydrophilie photoinduite (par la présence des nanoparticules de dioxyde de titane), ce qui permettrait par exemple une meilleure intégration d'un tel film dans des fluides biologiques.

L'autre propriété intéressante des films contenant des nanoparticules de dioxyde de titane est leur propriété antibactérienne photoinduite. En effet, lorsque ces films sont soumis à un rayonnement UV de longueur d'onde inférieure à 365 nm, il se produit une séparation de charges photoinduites. En présence d'eau, celle-ci permet d'obtenir de l'eau oxygénée ainsi que des ions superoxyde dont le pouvoir bactéricide est bien décrit (Kikuchi et al. 1997).

La présence de canaux longitudinaux pourrait servir à guider la croissance cellulaire, ou à des prolongements neuronaux, par exemple.

CHAPITRE 5 : Incorporation d'insuline dans des films multicouches de polyélectrolytes

5.1 Caractérisation des films (PDADMAC-PAA)_n

5.1.1 Suivi de la croissance du film par ellipsométrie

5.1.2 Observation de la morphologie des films par AFM

5.1.3 Observation de coupes en microscopie électronique à balayage

5.2 Cinétique de chargement et de libération d'insuline dans des films (PDADMAC-PAA)_n

5.2.1 Cinétique de chargement

5.2.2 Cinétique de libération

5.3 Etude de l'incorporation d'insuline dans d'autres systèmes de films multicouches de polyélectrolytes

5.3.1 Le système (PLL-HA)₃₀

5.3.2 Le système (PDADMAC-PSS)₃₀

A l'heure actuelle le diabète et ses complications représentent un problème majeur de santé publique. Face aux difficultés liées à un traitement souvent très contraignant (injections par piqûres ou pompes à insuline), la mise au point de nouvelles stratégies d'administration de l'insuline constitue un sujet de recherche en plein essor (Sadrzadeh et al. 2006). Dans le but de développer de nouveaux films minces chargés en insuline, avec la possibilité de libérer cette hormone de façon progressive, nous avons utilisé dans l'étude suivante des films multicouches de polyélectrolytes, comme support et réservoirs d'insuline. Nous avons ainsi dans un premier temps, étudié la possibilité d'incorporer de l'insuline de façon simple dans des films multicouches. Puis une fois les films chargés nous avons cherché à caractériser la libération de ce polypeptide en variant la composition du milieu environnant, notamment en immergeant ces films dans une solution de NaCl à 0.15M, imitant la salinité du sérum physiologique. Nous avons choisi d'utiliser dans un premier temps des films (PDADMAC-PAA)_n, encore peu étudiés, sachant qu'ils étaient capables d'incorporer par simple diffusion des particules chargées (Srivastava et al. 2008). Puis, dans une deuxième partie, nous avons voulu élargir ce concept en l'appliquant à d'autres systèmes de films multicouches de polyélectrolytes.

5. 1. Caractérisation des films (PDADMAC-PAA)_n

5.1.1 Suivi de la croissance du film par ellipsométrie

L'évolution de l'épaisseur des films (PDADMAC-PAA)_n en fonction du nombre de paires couches déposées a été suivie par ellipsométrie. Dans ces expériences, le temps de dépôt de chaque couche a été d'une minute, avec des rinçages intermédiaires à l'eau pendant une minute également (**figure 5.1**). D'autres expériences ont été effectuées en utilisant des durées d'immersion de 8 min dans les solutions de polyélectrolytes. L'influence du temps d'immersion ne se fait pas sentir pour un nombre de paires de couches inférieur à 15, mais au delà l'épaisseur du dépôt devient plus importante dans le cas où la durée d'immersion est de 8min. Nous avons essayé de définir le temps d'adsorption minimal permettant d'atteindre un état stationnaire en effectuant des expériences de microbalance à cristal de quartz. Pour un dépôt comprenant moins de 6 paires de couches, des temps d'adsorption de 1-2 min semblent suffisant. Hélas, la dissipation (c'est-à-dire la perte d'énergie mécanique) du cristal est telle qu'il est impossible de suivre la cinétique du dépôt pour un nombre de paires de couches

supérieur. Notons que le suivi de la construction par ellipsométrie a nécessité le séchage du film avant chaque mesure, et sa réhydratation pour la reprise des phases de dépôt. Pour vérifier l'influence des phases de séchage/réhydratation sur l'épaisseur du film, nous avons tout d'abord mesuré l'épaisseur du film après le dépôt de chaque paire de couche, puis nous avons construit un film qui n'a été séché qu'après chaque dépôt de 5 ou 10 paires de couches.

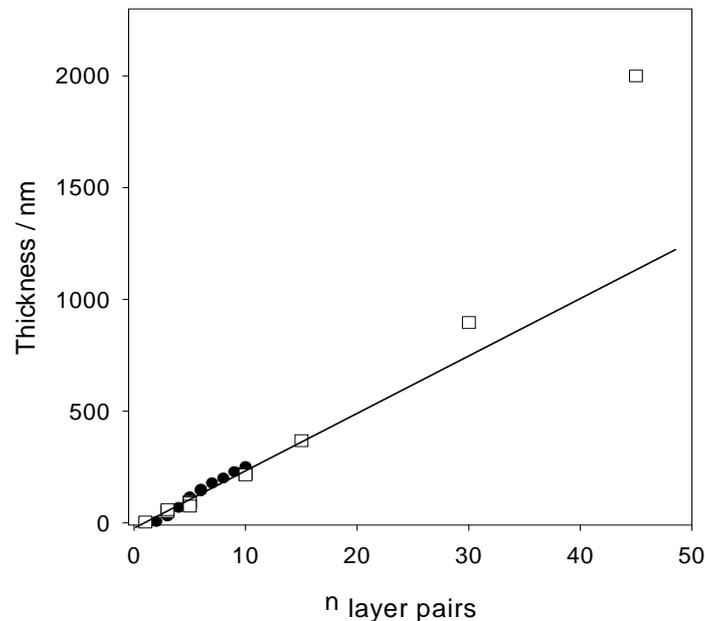


Figure 5.1: Suivi de la construction des films (PDADMAC-PAA)_n par ellipsométrie. ● Films séchés après chaque dépôt ; □ construction effectuée sans séchage intermédiaire.

La figure 5.1 montre que le séchage intermédiaire n'influence pas la construction de notre film, en tout cas pour un nombre de paires de couches inférieur à 10. Jusqu'au dépôt de la quinzième paire de couche, l'épaisseur du film semble augmenter linéairement avec le nombre de paires de couches. Au-delà, la croissance du film passe à un régime exponentiel. Cette transition pourrait s'expliquer par la formation initiale d'ilots dont la taille ou le nombre augmente jusqu'à leur coalescence. A ce stade, la construction du film se fait de façon exponentielle comme pour d'autres combinaisons de polyélectrolytes (Lavalle 2002). Le mécanisme de croissance du film n'étant pas l'objet de notre étude, il nous a fallu nous assurer de l'obtention d'un film homogène après le dépôt d'un nombre minimal de paires de couches. Nous avons donc caractérisé la morphologie des films (PDADMAC-PAA)_n par microscopie à force atomique.

5.1.2 Observation de la morphologie des films par AFM

Nous avons construit des films $(PDADMAC-PAA)_n$ sur des lamelles de verre, par immersion de 8 minutes dans les solutions de polyélectrolytes, de façon automatisée. Nous avons vu au paragraphe précédent que cette durée des étapes d'adsorption était quelque peu arbitraire. Nous aurions pu faire des constructions pour des durées encore plus élevées et évaluer l'influence de ce paramètre, toutes choses étant égales par ailleurs sur l'épaisseur des films. Cette épaisseur peut d'ailleurs aussi être estimée par AFM après avoir rayé le film à l'aide d'un bistouri ou d'une aiguille de seringue. Mais ceci aurait été fastidieux et ne constitue pas l'objectif de ce travail : il s'agit ici d'étudier l'aptitude des films $(PDADMAC-PAA)_n$ à incorporer des nano-objets, et en particulier des protéines.

Pour cela, des films comprenant 8, 20 et 30 paires de couches ont été observés à sec, en mode contact, à l'AFM, avant et après trempage dans une solution d'insuline à 1mg/mL et à pH 4.3. L'épaisseur des films comprenant 20 et 30 paires de couches a été déterminée en rayant le film à l'aide d'une aiguille de seringue (« scratch »). Nous allons décrire successivement la topographie et l'épaisseur, déterminée par AFM, de ces différents dépôts.

a - Films $(PDADMAC-PAA)_8$

Les dépôts faits à partir de 8 paires de couches ne peuvent pas être réellement qualifiés de « films ». En effet nous pouvons observer, grâce à la caméra couplée à l'AFM, des dépôts en îlots sur la lamelle de verre (**figure 5.2**). Ces amas ont une épaisseur irrégulière qu'il nous est impossible d'imager directement par AFM. Ceci nous montre qu'il existe un nombre de paires de couches critique nécessaire à l'obtention d'un film, comme nous l'avions suspecté lors de l'étude de la croissance du film par ellipsométrie (**figure 5.1**).

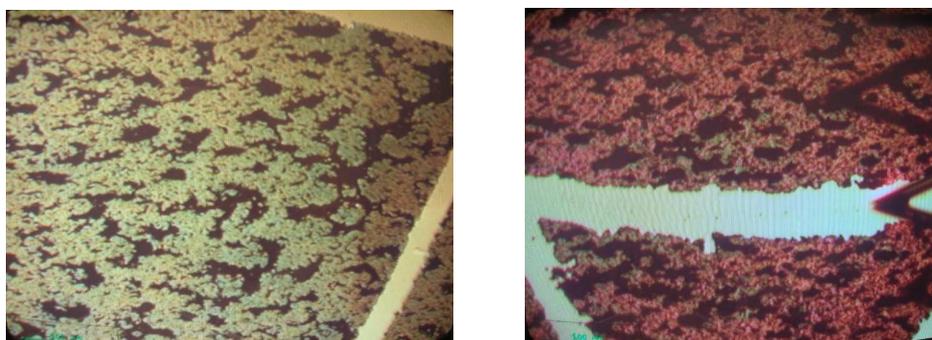


Figure 5.2 : Morphologie granuleuse des dépôts $(PDADMAC-PAA)_8$ vue à la caméra couplée à l'AFM. A gauche, la morphologie de la construction et les rayures (ou *scratches*) sont visibles. A droite, image de $(PDADMAC-PAA)_8$ après immersion pendant 14h dans une solution d'insuline à pH=4.3; les rayures gravées dans le film et les bras du cantilever de l'AFM sont visibles.

b - Films (PDADMAC-PAA)₂₀

Les dépôts (PDADMAC-PAA)₂₀ présentent à l'AFM une topographie de surface très légèrement ondulée, avec quelques irrégularités (**figure 5.3.A**) La rugosité moyenne est de 8.5 nm. L'épaisseur moyenne mesurée à l'AFM d'un tel film est de 712 ± 40 nm (**figure 5.3.B**). Cette valeur n'est pas incompatible avec l'épaisseur calculée à l'aide des données ellipsométriques (**figure 5.1**), pourtant obtenues en réalisant des cycles d'adsorption/rinçage ayant une durée d'une minute.

Notons que la figure 5.3.B montre que le dépôt est constitué d'un « vrai film », puisque la section transverse montre que dans la région du film il n'y a pas de pores atteignant le substrat en silice.

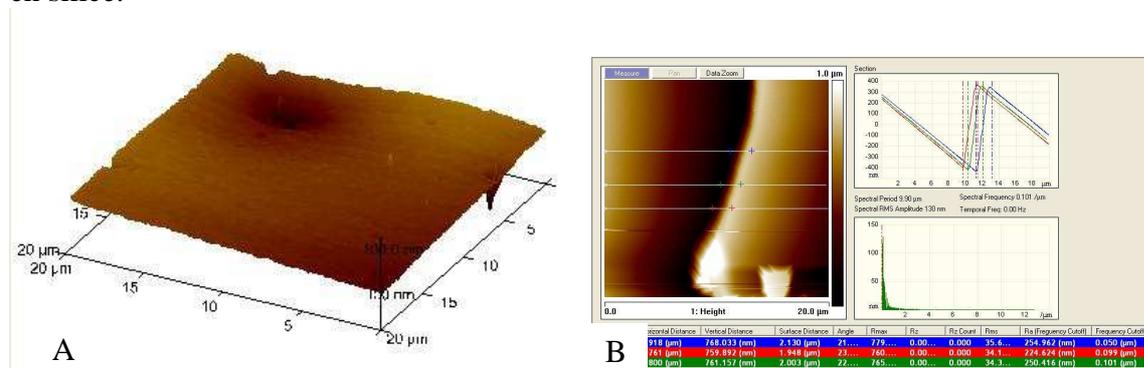


Figure 5.3 : A : topographie d'un film (PDADMAC-PAA)₂₀ . B : exemple de mesures de son épaisseur à l'AFM.

Les films (PDADMAC-PAA)₂₀ immergés pendant 14h dans une solution d'insuline à 1mg/mL et à pH=4.3, montrent aussi une surface très légèrement ondulée et parsemée de fines granulosités (**figure 5.4**). La rugosité moyenne est de 4 nm, donc inférieure à celle du film (PDADMAC-PAA)₂₀. L'épaisseur ces films est égale à 890 ± 70nm. Elle est légèrement supérieure à celle des films natifs, (712 ± 40 nm). Nous émettons donc l'hypothèse que la mise en contact du film avec une solution d'insuline induit son gonflement.

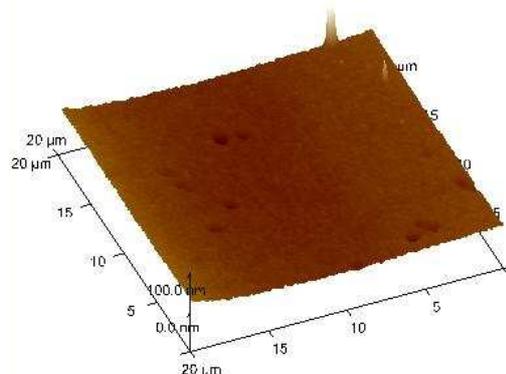


Figure 5.4 : Image topographique par AFM d'un film (PDADMAC-PAA)₂₀, après sa mise en contact pendant 14h avec une solution d'insuline à pH=4.3.

c - Films (PDADMAC-PAA)₃₀

L'observation d'un dépôt (PDADMAC-PAA)₃₀ à une échelle en $z = 400$ nm, montre une surface ondulée, dont la rugosité moyenne est de 50.2 nm (**figure 5.5.A**). Nous constatons ainsi, que la rugosité du film augmente fortement en fonction du nombre de paires de couches déposées.

L'épaisseur de ce film dépasse par endroit la limite de la course de la céramique piézoélectrique. Seules les zones accessibles à la mesure ont été quantifiées. Ainsi la valeur donnée de l'épaisseur ne peut être qu'un minorant. A titre indicatif nos mesures donnent une épaisseur de 1402 ± 40 nm.

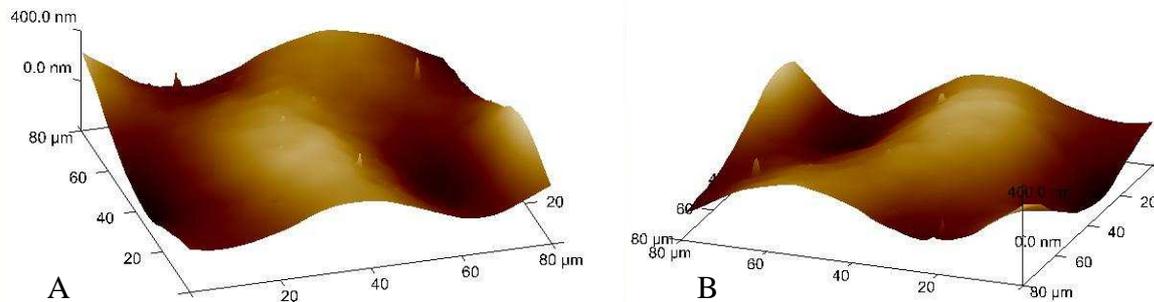


Figure 5.5 : A : image AFM de la topographie de surface d'un film (PDADMAC-PAA)₃₀. B : image AFM de la topographie de surface d'un film (PDADMAC-PAA)₃₀ après immersion pendant 14h dans une solution d'insuline à pH=4.3. L'échelle en z est de 400 nm.

Les films (PDADMAC-PAA)₃₀ imagés après immersion pendant 14h dans une solution d'insuline à pH = 4.3 montrent également, à une échelle en $z = 400$ nm, une surface ondulée. (**figure 5.5. B**) La moyenne des épaisseurs que nous avons pu relever était de 1414 ± 122 nm. Elle est, comme précédemment, relevée à titre indicatif, compte tenu de la limite de la course de la céramique piézoélectrique. La rugosité moyenne est de 43.1 nm. Il semble ainsi sur la base de ces deux expériences que la rugosité de surface diminue après que le film ait été immergé pendant 14h dans une solution d'insuline, tant pour des films de 20 paires de couches que pour des films de 30 paires de couches. Cependant ces expériences mériteraient d'être répétées pour vérifier ces résultats. Néanmoins si l'on compare un film natif à un film mis en contact avec la solution d'insuline, à une échelle verticale de $z = 100$ nm, des différences apparaissent (**figure 5.6**). En effet, le film natif présente des ondulations de grande portée, dont la distance entre les pics supérieurs et inférieurs est d'au moins 100 nm, alors qu'une fois le film trempé dans l'insuline, cette distance est réduite environ de moitié. Tout se passe comme si le film s'était rempli aux endroits les moins épais. Il apparaît donc que la

mise en contact du film avec une solution d'insuline produit des changements morphologiques assez marqués.

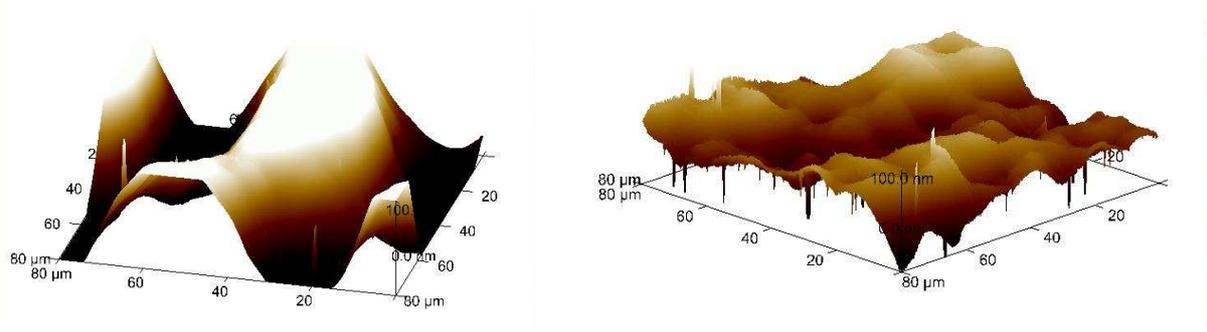


Figure 5.6 : Image AFM de la topographie de surface d'un film (PDADMAC-PAA)₃₀ avant (à gauche) et après (à droite) immersion pendant 14h dans une solution d'insuline à pH=4.3. Remarquons que l'échelle en z est de 100 nm.

5.1.3 Observation de coupes en microscopie électronique à balayage

Comme nous ne disposons que du module picoforce de l'AFM lors de la caractérisation de nos films, la limite de la course de la céramique piézoélectrique ne nous permettait pas de mesurer des films dont l'épaisseur était supérieure à 1 μm .

Des mesures de section de films constitués de 30 paires de couches ont donc été réalisées en microscopie électronique à balayage en mode environnemental (Quanta 400, Philips) au laboratoire de Chimie des Surfaces et Interfaces à Mulhouse. Toujours dans le but de vérifier l'effet d'une solution d'insuline sur l'épaisseur du film, des sections de films (PDADMAC-PAA)₃₀ avant et après immersion pendant 14h dans une solution d'insuline (1 mg.mL^{-1} à pH = 4.3), ont été observées en microscopie électronique à balayage en mode environnemental. Les mesures indiquent une épaisseur de $1.5\mu\text{m}$ pour le film comprenant 30 paires de couches, et une épaisseur de $2.0\mu\text{m}$ pour le film qui a été plongé dans la solution protéique. Ces mesures permettent de valider l'observation faite par AFM, à savoir que le film gonfle lorsqu'il a été mis en contact avec la solution d'insuline (**figure 5.7**).

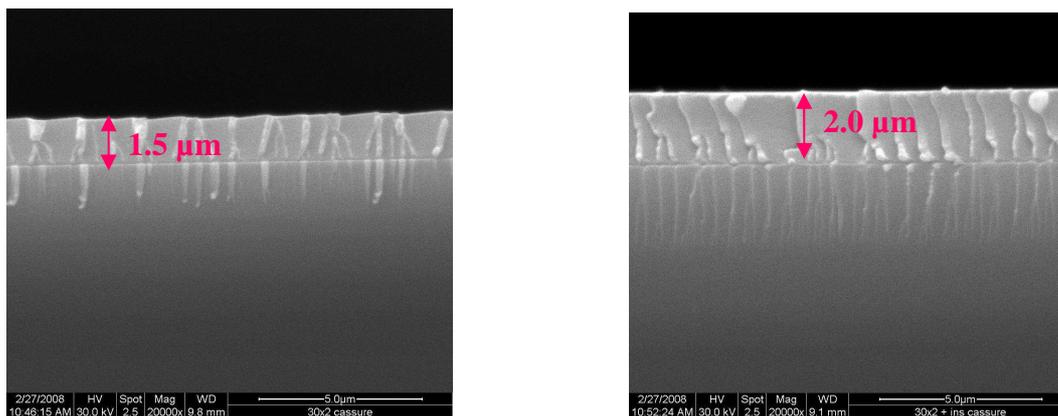


Figure 5.7 : sections de films (PDADMAC-PAA)₃₀ observés en microscopie électronique à balayage en mode environnemental. Images du film avant (à gauche) et après (à droite) immersion pendant 14h dans une solution d'insuline à pH=4.3. Les flèches montrent l'épaisseur des films (déposés sur une lamelle de verre).

Cependant, ces expériences d'imagerie topographique ou de détermination d'épaisseur, ne nous permettent pas de dire si l'effet de l'insuline est limité à une simple adsorption en surface du film ou s'il implique une incorporation à l'intérieur du film. Pour répondre à cette question nous avons marqué l'insuline avec un fluorophore et observé son adsorption ou son incorporation dans les films (PDADMAC-PAA)_n par microscopie confocale à balayage laser. Les expériences précédentes montrent que les dépôts comprenant 20 ou 30 paires de couches sont les mieux appropriés pour cette étude : ils sont relativement peu rugueux et ont une épaisseur suffisante pour pouvoir discriminer plusieurs zones au sein du film.

5.2 Cinétique de chargement et de libération d'insuline dans des films (PDADMAC-PAA)_n

5.2.1 Cinétique de chargement

a - Immersion de films (PDADMAC-PAA)₃₀ dans une solution d'insuline-FITC à pH 4.3

Les films (PDADMAC-PAA)₃₀ ont été mis en présence d'une solution d'insuline-FITC (1mg.mL⁻¹) pendant 2h, 14h et 24h afin de suivre la cinétique de leur interaction avec le polypeptide. Après cette mise en contact avec la solution d'insuline, les films ont été rincés à l'eau et observés en microscopie confocale à balayage laser.

Remarque : sur toutes images présentées, le substrat (coloration rouge) se trouve sur le haut de l'image et la partie supérieure du film se trouve vers le bas. Cela provient du mode d'acquisition des images du microscope confocal à balayage laser.

La réalisation de films témoins doit permettre de visualiser l'épaisseur des films construits. Le marquage de la première couche à la PAH-Rho fait apparaître en rouge la limite lamelle de verre/film. La limite supérieure du film est mise en évidence grâce à l'adsorption pendant 5min tantôt d'une couche de PAH-Rho, tantôt d'une couche d'insu-FITC, sur le film juste avant l'observation en microscopie confocale à balayage laser (**figure 5.8**).

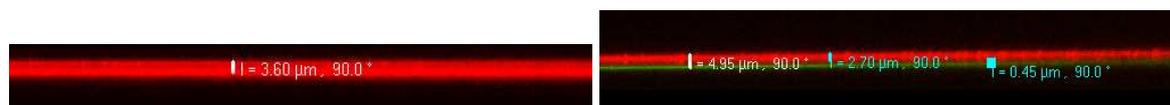


Figure 5.8 : Images obtenues par microscopie confocale à balayage laser de films témoins PAH-Rho-PSS-PDADMAC-PSS-(PDADMAC-PAA)₃₀. A gauche, le film a été mis en contact pendant 5 min avec de la PAH-Rho, juste avant d'être rincé à l'eau puis imagé. A droite le film a été mis en contact pendant 5 min avec de l'insuline-FITC à pH=4.3, juste avant d'être rincé à l'eau puis imagé. Rappelons que sur les images obtenues, la position de la lamelle de verre est inversée : elle se trouve sur le haut de la bande fluorescente rouge.

Toutes expériences confondues, l'épaisseur moyenne des films témoins de 30 paires de couches de PDADMAC-PAA est de 4.2 μm. Cette valeur est plus élevée que celle obtenue par AFM ou par ellipsométrie. Ceci provient du fait que la mesure d'épaisseur par microscopie confocale est effectuée en présence d'eau alors que les mesures par AFM et par ellipsométrie se font sur un film qui a subi une déshydratation partielle. Ceci a aussi été observé sur d'autres systèmes de films multicouches (Porcel et al. 2006).

Films (PDADMAC-PAA)₃₀ immergés pendant 2h dans une solution d'insuline-FITC

Les lames immergées durant 2h montrent une incorporation d'insuline-FITC surtout à l'interface film/eau (**figure 5.9**). Cette bande fluorescente est épaisse d'environ 1 à 2μm. Dans quelques cas une très faible intensité de fluorescence apparaît dans tout le film, démontrant une diffusion plus profonde de la protéine fluorescente. Cela montre néanmoins que l'insuline FITC ne remplit pas l'ensemble du film dans un intervalle de temps de 2h. L'épaisseur moyenne des films chargés pendant 2h est de 4.11μm.

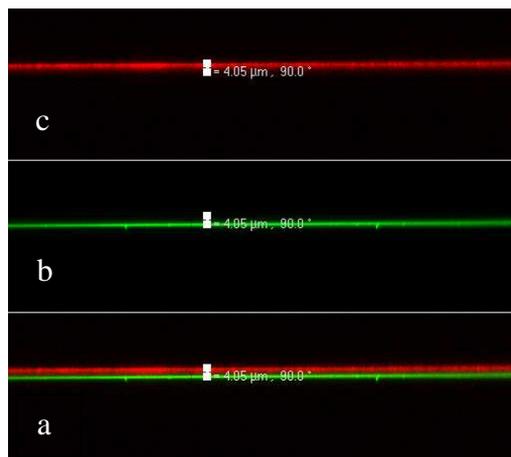


Figure 5.9 : Images obtenues par microscopie confocale à balayage laser d'un film (PADAMAC-PAA)₃₀ après immersion pendant 2h dans une solution d'insuline-FITC à pH 4.3. (a) Observation du film dans les deux canaux vert et rouge simultanément. Les canaux vert (b) et rouge (c) ont été découplés pour visualiser la contribution des deux marqueurs fluorescents. On remarque une bande noire dans la partie a, cela montre que l'insuline n'est présente que dans la partie supérieure du film et n'a pas eu le temps d'atteindre la région de l'interface film-lamelle.

Films (PDADMAC-PAA)₃₀ immergés pendant 14h dans une solution d'insuline-FITC

Les films immergés pendant 14h dans une solution d'insuline-FITC, présentent une bande fluorescente due à l'insuline plus intense et plus large que la bande observée sur les mêmes films immergés pendant 2h. Cette fois-ci la bande fluorescente mesure environ 2 μ m d'épaisseur. Elle est localisée près de l'interface film/eau . L'épaisseur moyenne de ces films est de 4.77 μ m (figure 5.10).

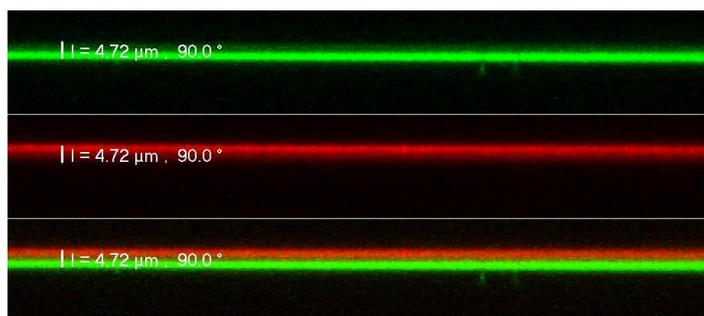


Figure 5.10 : Image obtenues par microscopie confocale à balayage laser d'un film (PDADMAC-PAA)₃₀ après immersion pendant 14h dans une solution d'insuline-FITC à pH 4.3. Les canaux vert et rouge ont été découplés dans les parties supérieures de la figure pour visualiser la contribution des deux marqueurs fluorescents.

Films (PDADMAC-PAA)₃₀ immergés pendant 24h dans une solution d'insuline-FITC

Les films plongés pendant 24h dans une solution d'insuline-FITC montrent une forte intensité de fluorescence répartie dans tout le film (**figure 5.11.A**). L'épaisseur moyenne de ces films est de 5.73 μm . Une coupe d'un de ces films dans un plan (x,y) montre une majorité de grains fins répartis de façon homogène et quelques particules plus grandes lorsque la fluorescence est récoltée avec le filtre adapté à la FITC (fluorescence verte, **figure 5.11.B**).

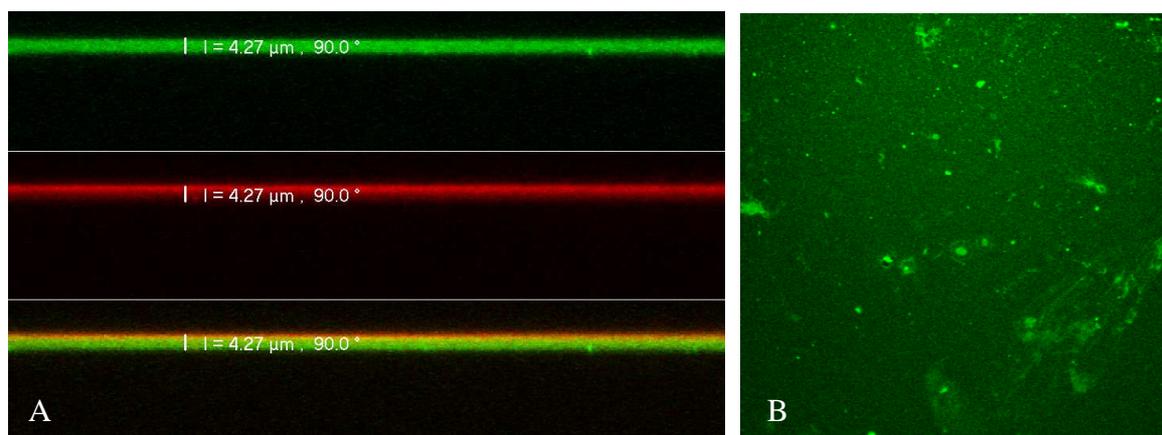


Figure 5.11 : Image obtenue par microscopie confocale à balayage laser d'un film (PADAMAC-PAA)₃₀ après immersion pendant 24h dans une solution d'insuline-FITC à pH 4.3.-A- coupes en z. Les canaux vert et rouge ont été découplés pour visualiser la contribution des deux marqueurs fluorescents. -B- coupe en (x,y).

Cette dernière observation suggère que l'insuline s'aggrège lors de son incorporation dans le film, mais nous ne pouvons pas exclure que ces agrégats soient déjà présents dans la solution aqueuse utilisée lors du chargement. En effet l'insuline est très peu soluble dans l'eau à son point isoélectrique et il se trouve que ces expériences de chargement ont été effectuées à pH 4.3, soit à un pH à peine inférieur d'une unité à la valeur du point isoléctrique.

Il serait alors intéressant d'étudier la cinétique de chargement d'un film en faisant varier le pH.

b - Immersion de films (PDADMAC-PAA)₃₀ dans une solution d'insuline-FITC à pH 8.3

Afin de voir si l'insuline s'incorpore de la même façon dans un film (PDADMAC-PAA)₃₀ lorsqu'elle est chargée négativement, nous avons réalisé les mêmes séries d'expériences que celles présentées précédemment, mais en immergeant cette fois, le film pendant 2h, 14h et 24h dans une solution d'insuline-FITC à 1mg/mL et à $pH=8.3$.

Nous observons alors, d'une façon générale, le même comportement du film, quel que soit le temps de trempage. Tous les films présentent une épaisseur irrégulière variant de 1 à 5 μm pour les témoins ou les films immergés pendant 2h, et de 1 à 7 μm pour les films immergés pendant 14h ou 24h. L'incorporation de l'insuline-FITC est très faible et semble se concentrer préférentiellement au niveau des interfaces film/verre et film/eau (**figure 5.12**).

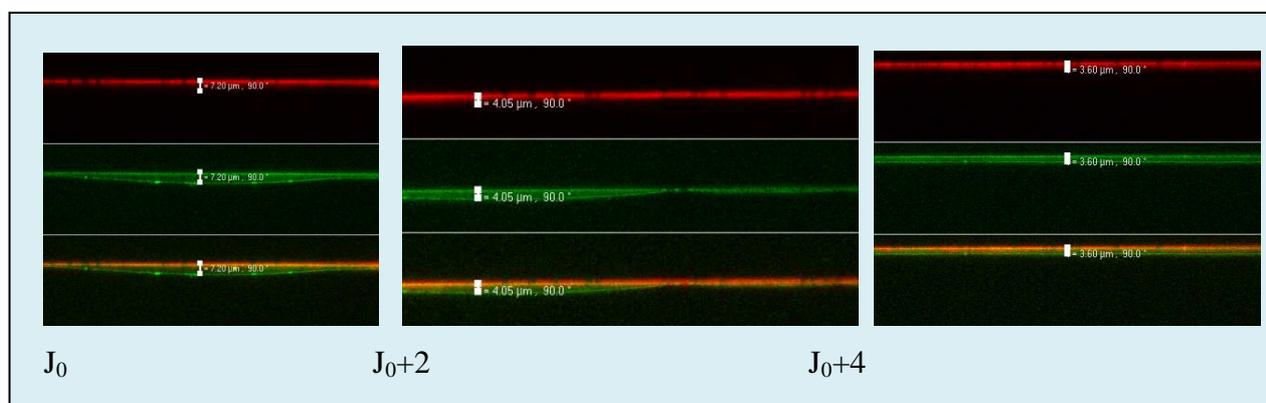


Figure 5.12 : Image de microscopie confocale à balayage laser montrant l'évolution d'un film PAH-Rho-PSS-PDADMAC-PSS-(PDADMAC-PAA)₃₀ après immersion pendant 24h dans de l'insuline-FITC à $pH=8.3$. J₀ représente l'image réalisée le jour où le film est sorti du bain d'insuline. J₀+x est l'image prise x jours après l'immersion. Les canaux vert et rouge ont été découplés sur les parties supérieures de chaque image pour visualiser la contribution des deux marqueurs fluorescents.

Ainsi, l'insuline ne s'incorpore que faiblement dans un film (PDADMAC-PAA)₃₀ lorsqu'elle est chargée négativement (son point isoélectrique est de 5.4) et ce même pour une durée d'immersion de 24h. Nous avons alors voulu savoir si le profil de la cinétique de chargement observé pour des films de 30 paires de couches avec une solution d'insuline à pH 4.5, était vérifié pour un film significativement plus épais.

c- Immersion de films (PDADMAC-PAA)₆₀ dans une solution d'insuline-FITC à pH 4.3

Le même type d'expériences a été effectué avec des films (PDADMAC-PAA)₆₀, construits de façon automatisée, avec des durées d'immersion de 8 min dans les solutions de

PDADMAC et de PAA. A l'œil nu, ce type de film se comporte comme un gel qui s'écoule progressivement sur son support selon l'inclinaison de la lamelle support par rapport à la verticale. L'épaisseur de ces films avoisine les 2mm à l'état hydraté. En microscopie confocale à balayage laser, cette épaisseur est variable et seules les zones d'épaisseur inférieure à la résolution en z du microscope (c'est-à-dire inférieures à 200 μ m) sont imageables (**figure 5.13.a**).

Si l'on trempe ce film pendant 2h dans l'insuline-FITC à pH 4.3, on peut observer (dans les zones d'épaisseur inférieure à 200 μ m) un remplissage total du film avec une tendance à montrer une pellicule plus marquée à l'interface film/eau (**figure 5.13.b**).

Après 14 h d'immersion, il apparaît des inclusions sphériques à l'intérieur du film, et après 24h d'incubation dans la solution d'insuline, le film s'est partiellement décomposé. Des débris de film contenant de l'insuline-FITC sont visibles à la surface de la lame de verre (**figures 5.13.c et d**).

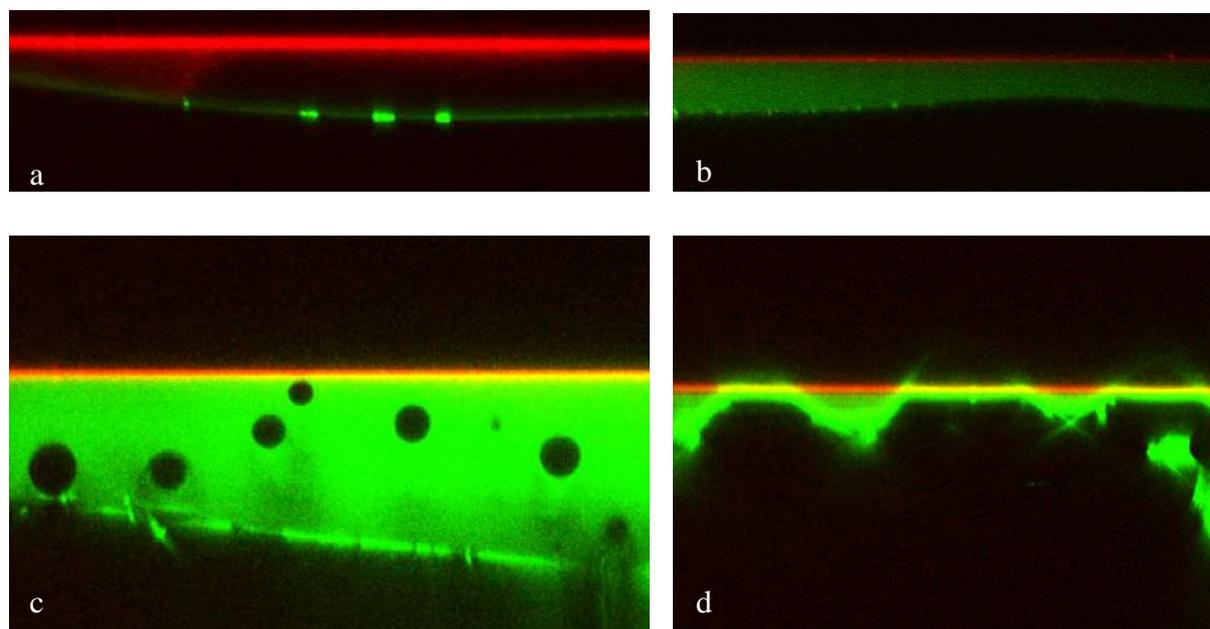


Figure 5.13 : Image par microscopie confocale à balayage laser d'un film PAH-Rho-PSS-PDADMAC-PSS-(PDADMAC-PAA)₆₀ ; -a- témoin ; -b- après immersion pendant 2h dans une solution d'insuline-FITC pH 4.3 ; -c- après 14h d'immersion ; -d- après 24h d'immersion.

Cette expérience suggère que pour un film très épais, après un gonflement initial dû à l'incorporation d'insuline, le film gonfle et finit par se décomposer. Cette décomposition est

certainement liée à une entrée d'eau due à une différence de pression osmotique entre le film et la solution aqueuse. Le même type de comportement a été observé pour des films (PLL-HA)_n (HA représente l'acide hyaluronique et PLL la poly-L-lysine) lors de leur immersion dans une solution de chlorure de sodium de concentration plus élevée que celle utilisée lors de la construction du film (Mjahed et al., article soumis pour publication).

Conclusion

L'analyse de la cinétique de chargement des films (PDADMAC-PAA)₃₀ par l'insuline-FITC (diluée dans l'eau à 1mg/mL et à pH=4.3), montre un chargement progressif du film à partir de l'interface film/solution. La cinétique de diffusion semble se faire en deux étapes : tout d'abord il se produit un chargement intense du film à l'interface film/eau, puis des particules envahissent progressivement et discrètement le film dans sa totalité avant que le chargement ne s'intensifie progressivement dans la totalité du film entre 14 et 24h d'immersion. Ce phénomène s'accompagne d'un gonflement du film (de $(4.2 \pm 0.5) \mu\text{m}$ pour le film témoin à $(5.7 \pm 0.5) \mu\text{m}$ pour le film immergé pendant 24h). Ce phénomène de gonflement corrobore les observations faites en AFM et en microscopie électronique à balayage. Par conséquent, notons qu'un tel film est ainsi capable de se charger en insuline lorsque cette molécule est chargée positivement. Par contre, lorsque l'insuline est diluée à 1mg/mL et à pH 8.3, donc chargée négativement, les observations de microscopie confocale à balayage laser montrent peu d'incorporation de l'insuline dans le film, mais un signal de fluorescence plus intense aux interfaces. Etant donné que dans nos expériences, la dernière couche des films de polyélectrolytes était toujours du PAA chargé négativement, nos résultats corroborent ceux de Salloum et Schlenoff. (2004). En effet, ces auteurs expliquent l'incorporation de différentes protéines dans des films multicouches de polyélectrolytes par l'effet de la charge de la dernière couche de polyélectrolyte adsorbée sur le film. Ils concluent ainsi que lorsqu'une protéine dont la charge globale est de même signe que le dernier polyélectrolyte adsorbé sur le film, celle-ci s'adsorbe à la surface, alors que lorsque la dernière couche adsorbée est de signe opposée à la charge globale de la protéine, celle-ci s'incorpore à l'intérieur du film.

Il nous a paru alors intéressant de déterminer la concentration moyenne en insuline dans les films (PDADMAC-PAA)₃₀. Malheureusement, la forte intensité du signal de fluorescence de l'insuline-FITC incorporée dans les films à pH 4.3, ne permet pas un dosage direct par microscopie confocale. En effet le dosage repose sur la comparaison du signal de fluorescence

du film avec celui de solutions d'insuline-FITC de concentrations variables. Le signal dû au film étant beaucoup plus intense que celui de la solution d'insuline-FITC la plus concentrée, nous serions donc obligés d'extrapoler la courbe d'étalonnage pour déterminer la concentration dans le film. Une telle procédure n'est pas permise en raison d'une saturation éventuelle du détecteur.

Nous nous sommes alors tournés vers la spectroscopie UV-visible en nous basant sur le fait que l'insuline contient une tyrosine dans sa structure primaire. Elle absorbe donc le rayonnement UV à une longueur d'onde aux environs de 280nm, tandis que le film (PDADMAC-PAA)_n ne présente qu'un fond continu dans ce domaine. Il se trouve que ces expériences ont toujours confirmé que de l'insuline s'incorpore dans les films multicouches, mais les résultats ont été très peu reproductibles (du simple au double d'une expérience à l'autre). Il est possible que ce manque de reproductibilité soit lié au séchage du film à l'étuve, entre la fin de l'immersion dans la solution d'insuline et la mesure spectroscopique. Ce séchage s'est hélas avéré nécessaire en raison du gonflement du film. Nous n'insisterons donc pas davantage sur ces mesures. Nous envisageons de doser l'insuline par une méthode de dosage spécifique des protéines, la méthode de Bradford, après dissolution du film (PDAMAC-PAA)_n. Cette dissolution peut être induite par une augmentation du taux de sel de la solution mise en contact avec le film.

Après avoir caractérisé la cinétique de chargement des films avec de l'insuline, il nous a semblé nécessaire d'étudier sa cinétique de libération en présence d'une solution aqueuse dépourvue d'insuline.

5.2.2 Cinétique de libération

a - Observations en microscopie confocale à balayage laser

Afin de suivre la cinétique d'incorporation de l'insuline, les films (PDADMAC-PAA)₃₀ immergés dans une solution d'insuline à pH 4.3, ont été conservés dans l'eau et imagés le jour de leur chargement, mais aussi le lendemain, 5 jours et 12 jours après.

Une tendance générale se dessine pour tous les films étudiés. Les figures 5.14 à 5.17 résument ces expériences. En effet, les films chargés en insuline-FITC montrent le jour de leur chargement, une incorporation d'insuline principalement dans une frange à l'interface

film/eau. Dès le lendemain, 5 jours et 12 jours après, nous voyons une diminution de l'intensité de fluorescence et une répartition un peu plus intense dans les zones aux interfaces : l'une vers l'interface film/eau et l'autre vers l'interface film/lamelle de verre.

Par ailleurs, remarquons que si l'on retire le surnageant (c'est-à-dire l'eau), et qu'on le remplace par une solution de NaCl 0.15M, on observe que le film gonfle de façon irrégulière (données non représentées).

Pour déterminer si de l'insuline sortait ou restait confinée à l'intérieur des films, nous avons utilisé la spectroscopie infra rouge à réflexions totales atténuées.

Evolution d'une lamelle témoin : PAH-Rho-PSS-PDADMAC-PSS-(PDADMAC-PAA)₃₀

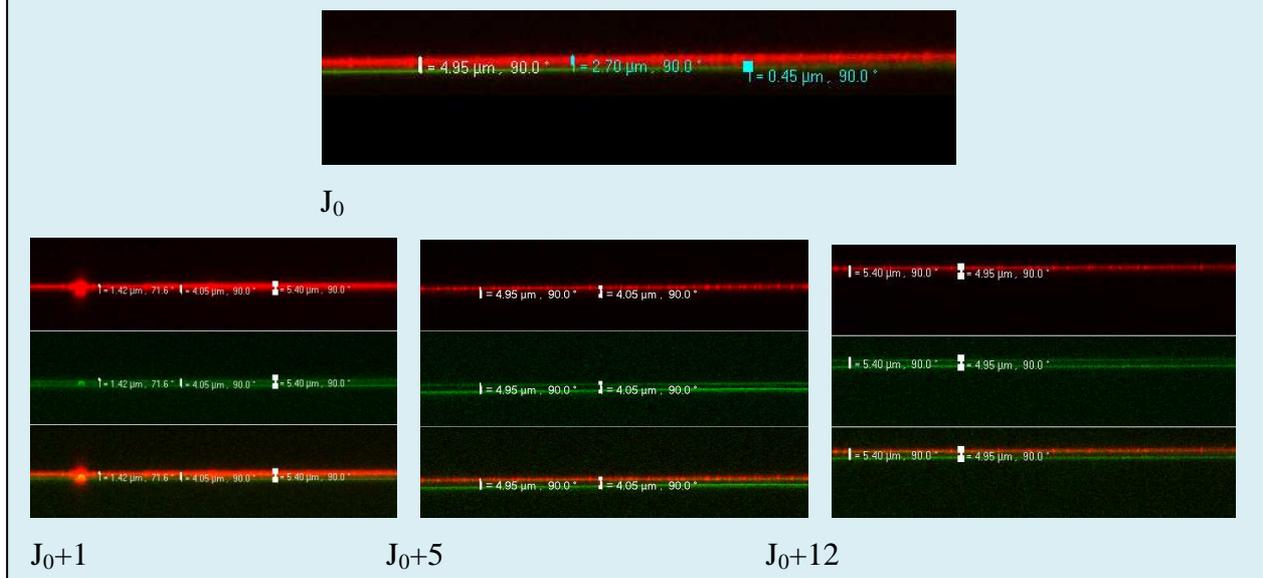


Figure 5.14 : Observation par microscopie confocale à balayage laser de l'évolution d'un film témoin dans l'eau. J_0 est le jour de la première observation du film ; J_0+x représente l'observation du film faite à $J_0 + x$ jours.

Evolution d'un film PAH-Rho-PSS-PDADMAC-PSS-(PDADMAC-PAA)₃₀, après 2h d'immersion dans l'insuline-FITC

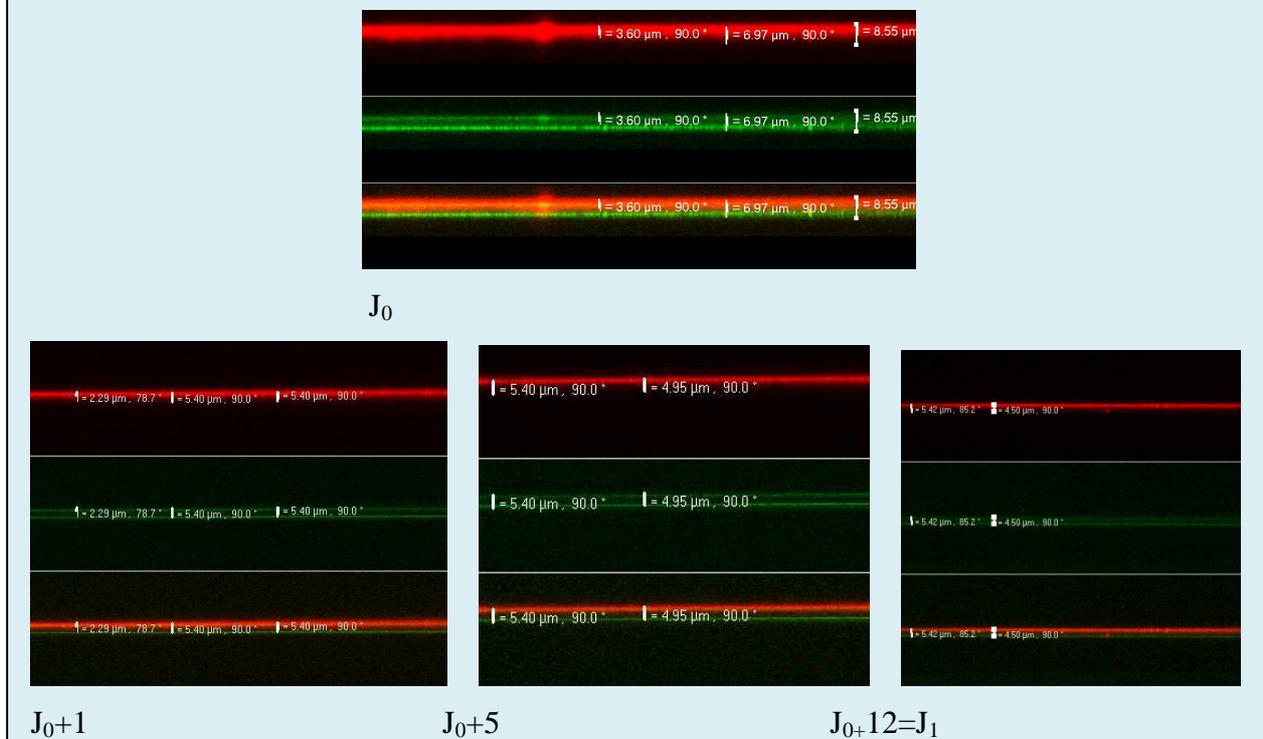


Figure 5.15 : Observation par microscopie confocale à balayage laser de l'évolution d'un film ayant été immergé pendant 2h dans une solution d'insuline-FITC (1mg/mL à pH 4.3), puis conservé dans l'eau. J_0 est le jour de la première observation du film (jour où le film est sorti de la solution d'insuline) ; J_0+x représente l'observation du film faite à $J_0 + x$ jours.

Evolution d'un film PAH-Rho-PSS-PDADMAC-PSS-(PDADMAC-PAA)₃₀, après 14h d'immersion dans l'insuline-FITC

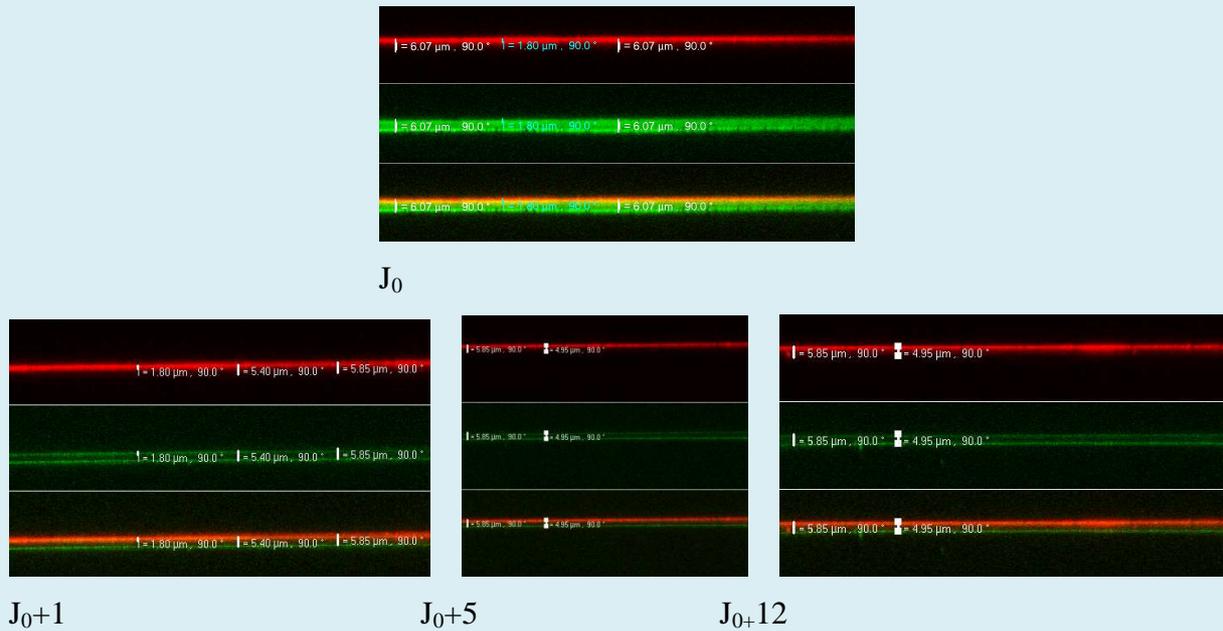


Figure 5.16 : Observation par microscopie confocale à balayage laser de l'évolution d'un film ayant été immergé pendant 14h dans l'insuline-FITC à pH 4.3, puis conservé dans l'eau. J₀ est le jour de la première observation du film (jour où le film est sorti de la solution d'insuline) ; J₀+x représente l'observation du film faite à J₀ + x jours.

Evolution d'un film PAH-Rho-PSS-PDADMAC-PSS-(PDADMAC-PAA)₃₀, après 24h d'immersion dans l'insuline-FITC

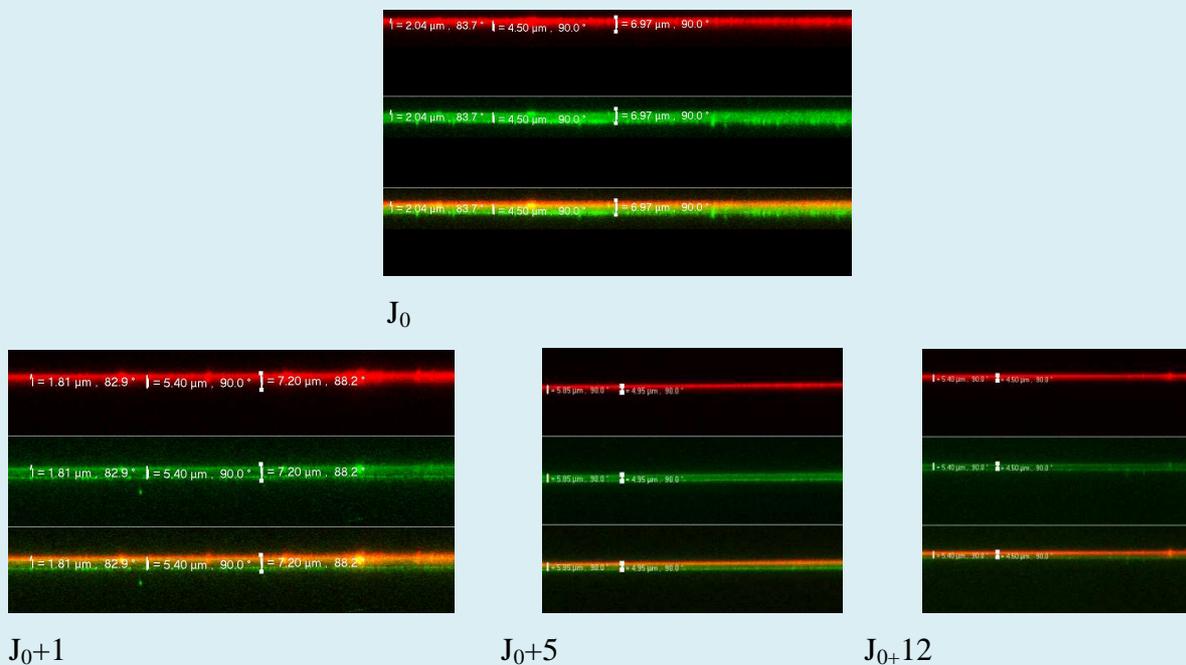


Figure 5.17 : Observation par microscopie confocale à balayage laser de l'évolution d'un film ayant été immergé pendant 24h dans l'insuline-FITC à pH 4.3, puis conservé dans l'eau. J₀ est le jour de la première observation du film (jour où le film est sorti de la solution d'insuline) ; J₀+x représente l'observation du film faite à J₀ + x jours.

b – Caractérisation par spectroscopie infra rouge en mode réflexions totales atténuées

La spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier en mode réflexions totales atténuées nous a permis d'étudier la cinétique de libération de l'insuline incorporée dans les films (PDADMAC-PAA)_n à pH 4.3, en présence d'une solution aqueuse dépourvue d'insuline. En effet, par cette méthode de caractérisation lorsque l'on dépose sur le cristal de ZnSe un film significativement plus épais que la profondeur de pénétration de l'onde évanescente, on ne mesure plus la contribution des molécules qui se trouvent dans la solution aqueuse. De ce fait si de l'insuline sort de ce film, l'intensité de la bande amide I (entre 1600 et 1700 cm⁻¹) diminue. Si l'on compare alors l'intensité transmise à travers toute la longueur du cristal à l'instant t par rapport à l'intensité transmise à $t = 0$, qui définit la fin de la phase de chargement du film, on voit apparaître une bande négative si des molécules initialement présentes dans le film sont libérées.

En présence d'eau distillée, nous avons remarqué qu'il n'y avait pas de libération détectable d'insuline (données non représentées). En revanche en présence d'une solution de NaCl à 0,15M et à un pH proche de 6, la bande amide I diminue progressivement dans le temps, sans que les bandes caractéristiques dues au film (PDADMAC-PAA)₁₅, notamment celles dues aux groupements -COOH et -COO⁻ ne subissent une diminution. Cela signifie que la libération lente d'insuline se produit sans décomposition significative de la matrice du film multicouche. Nous avons cependant observé, à l'aide de mesures ellipsométriques, que ces films (PDADMAC-PAA)_n, construits dans l'eau distillée, se décomposaient rapidement lorsque le taux de sel de la solution mise en contact avec le film dépasse 0.5 M.

La figure 5.18 représente les spectres infra rouge d'un film (PDADMACPAA)₁₅ chargé en insuline, placé dans une solution NaCl à 0,15M. Ces spectres sont recueillis à différents temps successifs et montrent une libération lente et progressive d'insuline dans la solution aqueuse. Le spectre semble ne plus évoluer au-delà de 120 heures.

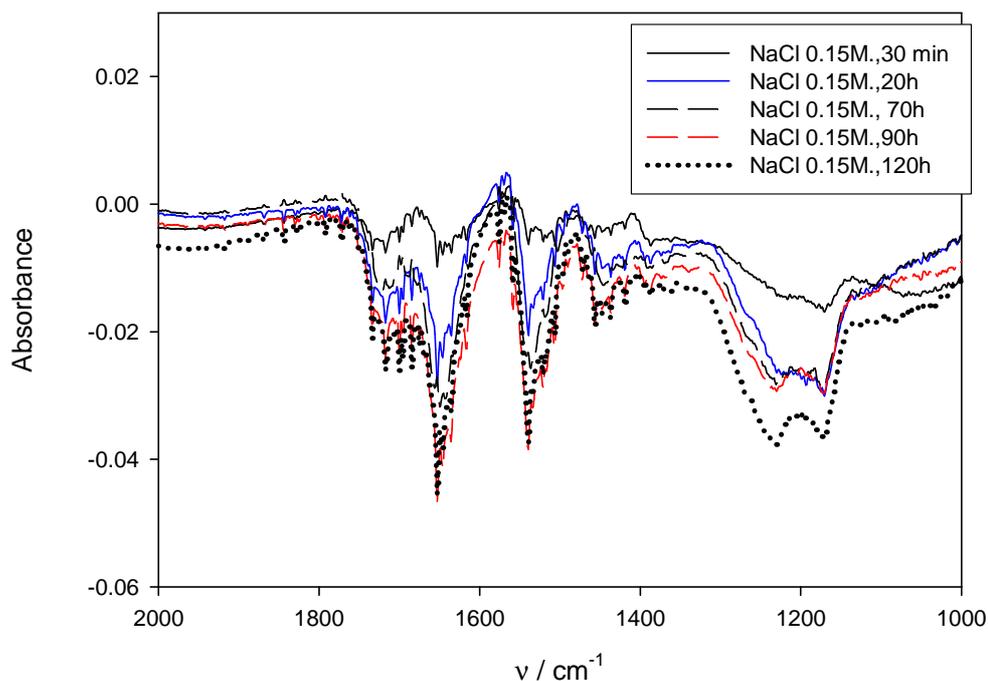


Figure 5.18 : Suivi de l'intensité de la bande amide I ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$), de la bande amide II ($1500-1400\text{ cm}^{-1}$) de l'insuline incorporée au sein d'un film $(\text{PDADMAC-PAA})_{30}$ lors de la mise en contact du film avec une solution aqueuse de chlorure de sodium à 0.15 M . L'encart montre les temps au bout desquels l'acquisition des spectres a été effectuée, $t = 0$ correspondant au début de la circulation de la solution de NaCl à 0.15 M .

Ces expériences montrent que la méthode de choix pour quantifier la libération semble donc être la spectroscopie infra-rouge. Néanmoins cette méthode est fastidieuse du fait que le film doit être déposé sur le cristal de ZnSe par une méthode non automatisée. Beaucoup d'efforts théoriques devront être investis aussi sur l'interprétation quantitative de ces spectres : le but étant de relier la diminution de l'intensité des bandes amides à une diminution de concentration protéique au sein du film. Ce travail est rendu difficile par le fait que la loi de Beer-Lambert reliant l'absorbance à la concentration, valable en mode transmission, ne l'est plus dans une configuration de réflexions totales atténuées. Cela tient à la nature d'onde évanescente du signal qui pénètre dans le film.

Même s'il reste beaucoup de travail à faire pour mieux comprendre le mécanisme d'incorporation d'insuline dans les films $(\text{PDADMAC-PAA})_n$, il nous a semblé intéressant de voir si cette observation était propre au système considéré, où si elle pouvait se généraliser à des films comprenant d'autres combinaisons de polyélectrolytes.

5.3 Etude de l'incorporation d'insuline dans d'autres systèmes de films multicouches de polyélectrolytes

5.3.1 Le système (PLL-HA)₃₀

La première expérience complémentaire a consisté à mettre en contact des films PLL-HA pendant 14h avec de l'insuline-FITC. Ces films (PLL-HA)_n sont capables d'incorporer de fortes concentrations de taxol (Vodouhê et al. 2006), il est donc intéressant d'étudier leur chargement par une molécule de masse moléculaire beaucoup plus élevée, l'insuline.

Le protocole de construction de ces films est identique à celui de la réalisation des films PAH-Rho-PSS-PAH-PSS-(PDADMAC-PAA), si ce n'est que les solutions de HA et de PLL contiennent 0.15 M en NaCl. La lamelle témoin montre que le film mesure environ (3.0 ± 0.5) μm d'épaisseur (**figure 5.19.a**).

Trois autres lamelles sont immergées pendant 14h dans une solution d'insuline-FITC diluée dans l'eau à pH 4.3, puis rincées à l'eau et imagées. Ces lamelles montrent toutes une frange plus intense d'insuline-FITC dans les deux premiers micromètres à l'interface film/eau. Dans tout le reste du film, l'insuline-FITC incorporée, moins concentrée, est mélangée à de la PAH-Rho (**figures 5.19.b et c**). Cependant, la répartition de la fluorescence dans le film nous montre que la PAH-Rho est exclue de l'interface film/eau. En effet la PAH-Rho diffuse de l'interface lamelle de verre/film vers l'intérieur de celui-ci.

Nous pouvons noter que les films chargés en insuline sont plus épais (de 9 à 12 μm) que le film témoin (environ 3 μm). Une fois encore, le chargement du film en insuline s'accompagne d'un gonflement de celui-ci.

Remarque : lors de cette expérience, nous ne disposons pas encore de portoirs spécifiques pour la microscopie confocale, et les lamelles ont été observées, « à l'envers », c'est-à-dire retournées sur une lame, ce qui explique que l'image soit inversée par rapport aux images des expériences précédentes (sur ces images le substrat se trouve donc vers le bas).

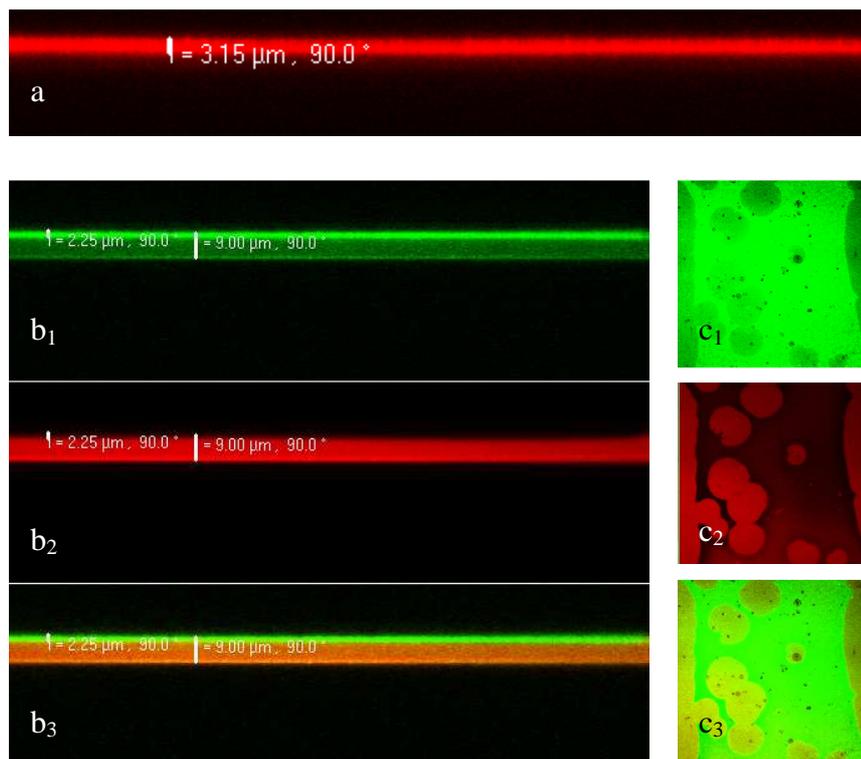


Figure 5.19 : Images en microscopie confocale à balayage laser d'un film PAH-Rho-PSS-PDADMAC-PSS-(PLL-HA)₃₀ ; -a- témoin. -b- après immersion pendant 24h dans une solution d'insuline-FITC à pH=4.3. -c- coupes en (x,y) vers le milieu de l'épaisseur du film. Les indices 1, 2et 3 représentent respectivement les canaux permettant de visualiser la fluorescence verte, la fluorescence rouge et les deux couleurs en même temps.

Cependant l'observation de ces trois films montre aussi des cavités irrégulières ne contenant plus de polyélectrolytes marqués entre les deux zones décrites précédemment (figure 5.20).

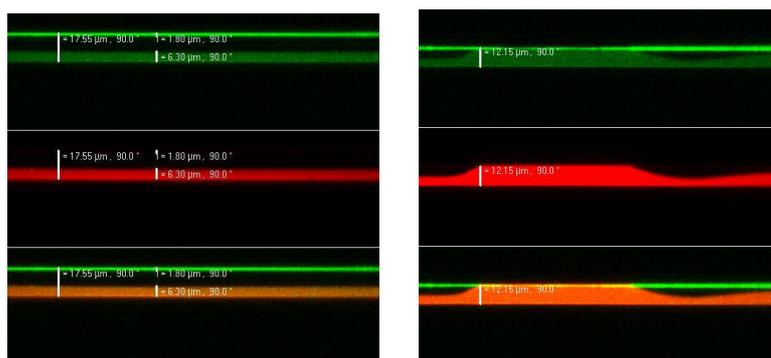


Figure 5.20 : Exemples d'images en microscopie confocale à balayage laser de deux zones du film PAH-Rho-PSS-PDADMAC-PSS-(PLL-HA)₃₀ après immersion pendant 14h dans une solution d'insuline-FITC à pH=4.3 . Une cavité irrégulière et sans fluorescence apparaît entre les deux strates du film. (Les canaux vert et rouge ont été découplés pour visualiser la contribution des deux marqueurs fluorescents).

5.3.2 Le système (PDADMAC-PSS)₃₀

Les films (PDADMAC-PSS)_n, construits en présence de NaCl 1M, ayant été utilisés avec succès dans nos expériences de microimpressions et de films stratifiés, il était intéressant de voir leur comportement face à une solution d'insuline-FITC diluée dans l'eau et à pH=4.3.

Notre expérience a consisté à construire des films PAH-Rho-PSS-PDADMAC-PSS-(PDADMAC-PSS)₃₀, puis comme dans les expériences précédentes, de les immerger pendant 2h, 14h et 24 h dans une solution d'insuline-FITC.

Les lamelles témoins ont été mises en contact avec la solution d'insuline-FITC pendant 5 min, puis rincées à l'eau juste avant l'observation en microscopie confocale. Les deux lames ont montré un film d'épaisseur 4.05µm (**figure 5.21**).

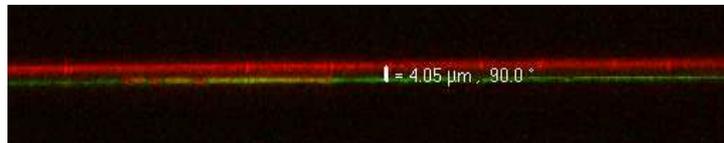


Figure 5.21 : Image en microscopie confocale à balayage laser d'un film témoin PAH-Rho-PSS-PDADMAC-PSS-(PDADMAC-PSS)₃₀, mis en contact pendant 5 min avec une solution d'insuline-FITC. Le film a été rincé juste avant la prise d'image.

Par contre, les deux films immergés pendant 2h, nous ont montré chacun un comportement différent, ne permettant pas de conclure à ce stade sur le mode d'incorporation. En effet, la première lame montrait un film fortement chargé en insuline dans sa totalité avec diffusion de la PAH-Rho alors que la deuxième lame montrait un film chargé en insuline-FITC uniquement à l'interface film/eau (**figure 5.22**).

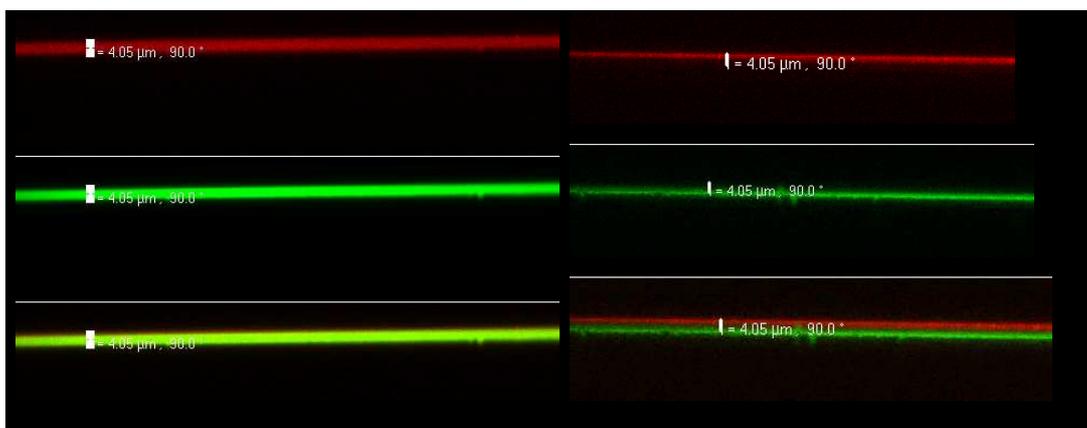


Figure 5.22 : Images en microscopie confocale à balayage laser de deux films PAH-Rho-PSS-PDADMAC-PSS-(PDADMAC-PSS)₃₀ immergés pendant 2 h dans de l'insuline-FITC à pH 4.3. A gauche le film montre un remplissage intense et homogène d'insuline-FITC. A droite, seule l'interface film/eau a incorporé de l'insuline. (Les canaux vert et rouge ont été découplés pour visualiser la contribution des deux marqueurs fluorescents).

Il faut noter que les films trempés dans la solution d'insuline pendant 2h présentent tous la même épaisseur que le film témoin, quelle que soit la profondeur d'incorporation de l'insuline dans le film.

Les deux lames immergées pendant 14h dans la solution d'insuline-FITC (à pH 4.3) ont montré une frange de pénétration intense et épaisse à l'intérieur du film (**figure 5.23**). Aucun gonflement du film n'a été observé. Seul un film immergé pendant 24h a pu être observé et a montré un remplissage intense d'insuline-FITC dans la totalité du film, toujours sans augmentation significative de son épaisseur.

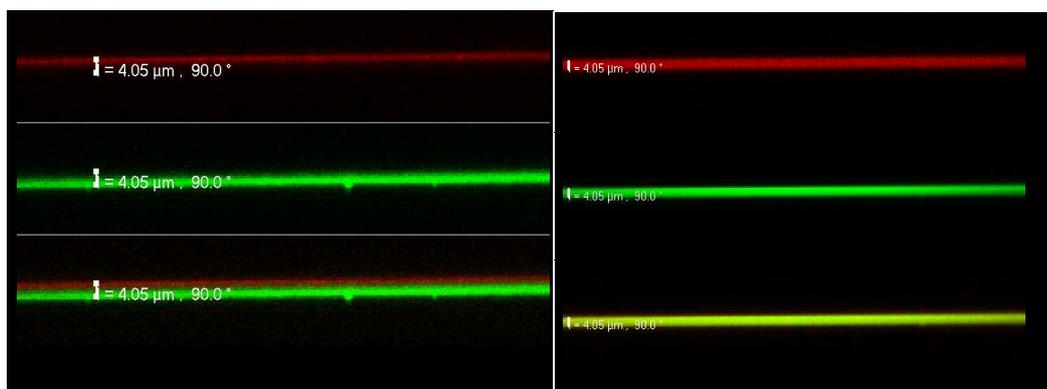


Figure 5.23 : Images en microscopie confocale à balayage laser de deux films PAH-Rho-PSS-PDADMAC-PSS-(PDADMAC-PSS)₃₀ immergés dans une solution d'insuline-FITC à pH 4.3. A gauche le film a été immergé pendant 14h. A droite, le film a été immergé pendant 24h. (Les canaux vert et rouge ont été découplés dans les parties supérieures des images pour visualiser la contribution des deux marqueurs fluorescents).

Cette première expérience ne nous permet pas de conclure quant à la cinétique de chargement d'un film (PDADMAC-PSS)₃₀ avec de l'insuline-FITC à pH=4.3. Les premiers résultats sont cependant très encourageants car ils montrent que de l'insuline dissoute dans de l'eau peut diffuser dans un film (PDADMAC-PSS)₃₀ construit en présence de NaCl 1M. De plus, ce type de films se remplit de façon homogène et sans gonflement, contrairement aux autres types de films étudiés.

Par conséquent, les expériences concernant les systèmes tels que les films (PLL-HA)_n ou (PDADMAC-PSS)_n mériteraient d'être reproduites. Cependant, les cavités apparaissant dans les films (PLL-HA)₃₀ évoquant un film capable de se séparer en deux phases, pourraient déjà nous laisser penser que les films (PDADMAC-PSS)₃₀, pourraient s'avérer être de meilleurs candidats pour le chargement en insuline. Ces films sont d'autant plus intéressants qu'ils cumulent par ailleurs des propriétés de plasticité permettant leur microimpression.

Ces résultats préliminaires montrent qu'il est possible d'incorporer une protéine d'intérêt thérapeutique avéré, l'insuline, dans différents types de films multicouches présentant un régime de croissance exponentiel en fonction du nombre de paires de couches déposées.. Même si nous n'avons pas réussi à quantifier la concentration en insuline dans le film, il semble d'après nos observations qu'elle est certainement beaucoup plus élevée que la concentration dans la solution utilisée pour charger le film. Cette observation qualitative et la généralité du concept, constituent une perspective enthousiasmante qui mobilise d'ores et déjà un énorme effort de recherche au laboratoire.

Conclusions et perspectives

Déposés à la surface de matériaux, les films multicouches de polyélectrolytes constituent un nouveau moyen de fonctionnaliser simplement l'interface entre ce matériau et le milieu environnant. La quasi-totalité des interactions d'un matériau avec son environnement étant une conséquence de la nature de sa surface, nous nous sommes intéressés à développer de nouvelles façons de fonctionnaliser ces films selon trois orientations différentes.

Dans la première partie de notre étude (**chapitre 2**) la fonctionnalisation a consisté à changer la topographie de surface d'un film multicouche. En effet par une technique d'impression par compression nous avons réussi à transférer un motif microstructuré dans des films multicouches de polyélectrolytes, à partir d'un tampon en polydimethylsiloxane (PDMS). Nous avons utilisé des films composés de 20 paires de couches PDADMAC/PSS, construits par la méthode de nébulisation alternée et qui présentent un régime de croissance supralinéaire. Une contrainte de l'ordre de 1.4 MPa exercée sur nos échantillons, nous a permis d'imprimer des canaux longitudinaux parallèles. Nous avons montré que ces films imprimés gardaient non seulement leur morphologie au cours du temps (jusqu'à 9 mois, quand ils sont conservés à sec), mais aussi leur dimension (notamment la profondeur des canaux). De plus, lorsque l'on soumet le film à une solution de force ionique inférieure à celle utilisée lors de sa construction et imitant la salinité des fluides biologiques (0,15 M en NaCl au lieu de 1 M), la profondeur des canaux obtenus reste inchangée. Seule une faible perte d'eau se produit, ce qui explique la grande stabilité des canaux imprimés.

Dans une deuxième partie (**chapitre 3**) nous avons montré qu'il était possible de construire des films fins hybrides fonctionnalisés avec des nanoparticules de TiO₂. En effet, nous avons tout d'abord construit des films (PEI-TiBisLac)_n d'épaisseur contrôlée par la méthode simple de dépôts réactifs couche-par-couche (soit par nébulisation soit par immersion). La microscopie électronique à transmission (MET) a révélé la présence d'inclusions inorganiques distribuées de façon homogène à la surface de ces films. La diffraction des rayons X a montré que les films contiennent une phase cristalline de TiO₂. Il est fort probable que le polymorphe obtenu soit l'anatase plutôt que le rutile, phase cristalline la plus stable du TiO₂. De plus, la mesure de l'absorbance des films (PEI-TiBisLac)_n à $\lambda=242$ nm, en fonction du nombre de

paires de couches déposées, montre qu'un film comprenant $n=30$ paires de couches atténue l'intensité de la lumière UV transmise de deux ordres de grandeur.

Le but de la seconde étude du **chapitre 3** a été de montrer que l'on peut construire des films stratifiés et fonctionnalisés par du TiO_2 en surface, en utilisant la méthode originale du dépôt par nébulisation réactive couche-par-couche (LBL). Nous avons donc structuré l'architecture d'un film en créant deux compartiments. Le compartiment inférieur était de même composition que les films utilisés dans nos expériences d'impression, $(\text{PDADMAC-PSS})_{20}$, déposés en présence de NaCl à 1M (film à croissance exponentielle). La spectroscopie UV-visible et l'ellipsométrie nous ont permis de confirmer qu'il était possible de construire un film stratifié, en superposant à la première strate de $(\text{PDADMAC-PSS})_{20}$ un compartiment supérieur de $(\text{PDADMAC-TiO}_2)_n$, à croissance linéaire. Nous avons démontré que les nanoparticules de dioxyde de titane restaient majoritairement concentrées dans la strate supérieure de $(\text{PDADMAC-TiO}_2)_n$ et que la couche superficielle riche en TiO_2 modifiait les propriétés de surface du film qui acquiert des capacités de super hydrophilie photoinduite.

En outre, des premières expériences d'impression par compression révèlent qu'il est aussi possible de transférer des motifs microstructurés dans ces films stratifiés.

La troisième partie de notre travail a consisté à étudier le chargement de certains de ces films à croissance exponentielle, réservoirs potentiels de médicaments. Nous avons pu charger des films de natures différentes, avec une molécule biologique de grand intérêt thérapeutique, l'insuline, simplement en les plongeant dans une solution aqueuse contenant ce polypeptide. Nous avons ainsi montré que trois sortes de films, les films $(\text{PDADMAC-PAA})_{30}$, $(\text{PLL-HA})_{30}$ et $(\text{PDADMAC-PSS})_{30}$, pouvaient incorporer des molécules d'insuline-FITC à un pH de 4,3 (inférieur au pH isoélectrique de cette protéine). La microscopie électronique à balayage en mode environnemental ainsi que la microscopie confocale effectuées sur des films $(\text{PDADMAC-PAA})_{30}$ ont révélé que ces films augmentaient en épaisseur lors de la diffusion du polypeptide dans leur structure. Nous avons observé que l'insuline diffusait d'abord en se concentrant dans la partie supérieure du film (après 2h et 14h d'immersion dans la solution protéique), puis dans la totalité du film (au bout de 24h). L'augmentation du pH de la solution d'insuline à 8.3 (pH supérieur au point isoélectrique de la protéine), a contrario, n'était pas favorable au chargement du film. Nous avons fourni une tentative d'explication à

ce phénomène en comparant nos résultats à ceux obtenus par le groupe du professeur J.B. Schlenoff.

La spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier (ATR-FTIR) nous a permis de montrer qu'un film (PDADMAC-PAA)₁₅ chargé en insuline ne libérait pas cette molécule, même après plusieurs jours d'immersion dans de l'eau distillée. Par contre, une libération lente de ce polypeptide a été observée en présence d'une solution de NaCl 0.15M (salinité proche de celle du sérum physiologique). Ce système ouvre des perspectives dans la recherche d'une nouvelle voie de délivrance de ce médicament.

Les perspectives de ce travail sont centrées sur la biologie et les applications biomédicales. Ainsi, les films multicouches de polyélectrolytes comportant des motifs microstructurés stables pourraient être utilisés pour guider la croissance cellulaire, ou servir de substrats dans des dispositifs de microfluidique.

En ce qui concerne les films stratifiés, le compartiment inférieur hautement hydraté peut servir de réservoir de drogues. La strate superficielle riche en nanoparticules de TiO₂ pourrait jouer le rôle de barrière ou simplement d'interface apportant les propriétés de surface propres à ses composants. En effet, le dioxyde de titane est un matériau très intéressant car reconnu pour être biocompatible, et pour ses propriétés bactéricides en l'exposant pendant quelques minutes à un rayonnement ultra-violet de fréquence supérieure à la fréquence seuil. De plus, ce matériau est un semi-conducteur capable d'atténuer l'intensité de la lumière UV transmise à travers un film contenant des nanoparticules de ce matériau. Ces observations expérimentales montrent que les films (PEI-TiO₂)_n pourraient servir de recouvrement tant pour leur propriétés bactéricides que pour leur capacité à filtrer les rayons UV.

Enfin, la possibilité de charger simplement des films en insuline en solution aqueuse et de pouvoir libérer cette hormone en solution saline, ouvre des perspectives quant aux nouveaux moyens de délivrance de ce médicament.

L'originalité de ce travail a été de montrer qu'il était possible de combiner ces différentes propriétés des films multicouches de polyélectrolytes. En effet, il ressort de cette étude qu'un film (PDADMAC-PSS)_n peut être imprimé, ou chargé en insuline, ou recouvert d'une strate (PDADMAC-TiO₂)_n. Ces recherches ouvrent de nouvelles perspectives quant aux

combinaisons possibles permettant de « multifonctionnaliser » le revêtement d'un biomatériau.

Bibliographie

Advincula R., Aust E., Meyer W., Knoll W. In situ investigations of polymer self-assembly solution adsorption by surface plasmon spectroscopy. *Langmuir*, 1996, 12 : 3536-3540.

Agarwal V., Khan M.A., Nazzal S. Polymethacrylate based microparticules of insulin for oral delivery, part II : solid strate characterization. *Pharmazie*, 2008, 63 : 122-128.

Aizenberg J. Patterned crystallisation on self-assembled monolayers with integrated regions of disorder. *J Chem Soc, Dalton Trans*, 2000, 21 : 3963-3968.

Anderson M., Axelsson A., Zacchi G. Diffusion of glucose and insulin in a swelling N-isopropylacrylamide gel. *International Journal of Pharmaceutics*, 1997, 157 : 199-208.

Bessueille F., Pla-Roca M., Mills C.A., Martinez E., Samitier J., Errachid A. Submerged Microcontact Printing (S μ CP): An unconventional printing technique of thiols using high aspect ratio, elastomeric stamps. *Langmuir*, 2005, 21 : 12060-12063.

Biancardo S.B.N., Pranov H.J., Larsen N.B. Protein in-mold patterning. *Adv Mater*, 2008, 20 : 1825-1829.

Binnig G., Quate C.F., Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 1986, 56 : 930-933.

Binnig G., Rohrer H., Gerber C., Weibel E. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys Rev Lett*, 1982, 49 : 57-61.

Blodgett K.B. Monomolecular films of fatty acids on glass. *J Am Chem Soc*, 1934, 56 : 495-495.

Blodgett K.B., Langmuir I. Built-Up films of barium stearate and their optical properties. *Phys Rev*, 1937, 51 : 964-982.

Burke S.E., Barrett C.J. pH-Dependent loading and release behavior of small hydrophilic molecules in weak polyelectrolyte multilayer films. *Macromolecules*, 2004, 37 : 5375-5384.

Caruso F., Donath E., Möhwald H. 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*, 1998, 102 : 2011-2016.

Caruso F., Shi X., Caruso R.A., Susha A. Hollow titania spheres from layered precursor deposition on sacrificial colloidal core particles. *Adv Mat*, 2002, 13 : 740.

Chen Y. Micro et nanofluidique : Les nanotechnologies. *REE (Revue de l'électricité et de l'électronique)*, 2004, 1 : 40-47.

Chiarelli P., Johal M.S., Casson J.L., Roberts B.L, Robinson J.M., Wang H.L. Controlled fabrication of polyelectrolyte multilayer thin films using spin-assembly. *Adv Mat*, 2001, 13 : 1167-1170.

Chluba J., Voegel J.C., Decher G., Erbacher P., Schaaf P., Ogier J. Peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity. *Biomacromolecules*, 2001, 2 : 800-805.

Decher G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science*, 1997, 277 : 1232-1237.

Decher G., Hong J.D., Schmitt J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charges surface. *Thin Solid Films*, 1992, 210 : 831-835.

Denis F.A., Pallandre A., Nysten B., Jonas A.M., Dupont-Gillain C.C. Alignment and assembly of adsorbed collagen molecules induced by anisotropic chemical nanopatterns. *Samm*, 2005, 1 : 984-991.

Dubas S.T., Schlenoff J.B. Factors controlling the growth of polyelectrolyte multilayers. *Macromolecules*, 1999, 32 : 8153-8160.

Dusseiller M.R. Micro- and Nanoengineering the 3-Dimensional Environment of Cells in Culture. PhD Thesis, No. 16433, ETH Zürich, 2005.

Dusseiller M.R., Schlaepfer D., Koch M., Kroschewski R., Textor M. An inverted microcontact printing method on topographically structured polystyrene chips for arrayed micro-3-D culturing of single cells. *Biomaterials*, 2005, 26 : 5917-5925.

Dusseiller M., Smith M.L., Vogel V., Textor M. Microfabricated three-dimensional environments for single cell studies. *Biointerphases*, 2006, 1 : P1-P4.

Falconnet D., Csucs G., Grandin H.M., Textor M. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials*, 2006, 27 : 3044-3063.

Falconnet D., Koenig A., Assi F., Textor M. A combined photolithographic and molecular-assembly approach to produce functional micropatterns for applications in the biosciences. *Adv Funct Mater*, 2004, 14 : 749-756.

Gao C., Donath E., Moya S., Dudnik V., Möhwald H. Elasticity of hollow polyelectrolyte capsules prepared by the layer-by-layer technique. *Eur Phys J E*, 2001, 5 : 21-27.

Gao C., Leporatti S., Moya S., Donath E., Möhwald H. 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*, 2001, 17 : 3491-3495.

Gao C., Wang B., Feng J., Shen J. Irreversible compression of polyelectrolyte multilayers. *Macromolecules*, 2004, 37 : 8836-8839.

Glawe J.D., Hill J.B., Mills D.K., McShane M.J. Influence of channel width on alignment of smooth muscle cells by high-aspect-ratio microfabricated elastomeric cell culture scaffolds. *J Biomed Mater Res*, 2005, 75A : 106-114.

Guyomard A., Nysten B., Muller G., Glinel K. Loading and release of small hydrophobic molecules in multilayer films based on amphiphilic polysaccharides. *Langmuir*, 2006, 22 : 2281-2287.

Hammond P.T. Form and function in multilayer assembly: new applications at the nanoscale. *Adv Mat*, 2004, 16 : 1271-1293.

Hammond P.T., Whitesides G.M. Formation of polymer microstructures by selective deposition of polyion multilayers using patterned self-assembled monolayers as a template. *Macromolecules*, 1995, 28 : 7569-7571.

Hennen G. *Endocrinologie*. De Boeck : Sciences Médicales. 2001.

Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. *San Diego Academic Press*, 1996, 169-176.

Huh D., Mills K.L., Zhu X., Burns M.A., Thouless M.D., Takayama S. Tuneable elastomeric nanochannels for nanofluidic manipulation. *Nature Materials*, 2007, 6 : 424-428.

Iler R.K. Multilayers of colloidal particles. *J Colloid Interface Sci*, 1966, 21 : 569-594.

Izquierdo A., Ono S.S., Voegel J.C., Schaaf P., Decher G. Dipping versus spraying: Exploring the deposition conditions for speeding up layer-by-layer assembly. *Langmuir*, 2005, 21 : 7558-7567.

Khademhosseini A., Yeh J., Eng G., Karp J., Kaji H., Borenstein J., Farokhzad O.C., Langer R. Cell docking inside microwells within reversibly sealed microfluidic channels for fabricating multiphenotype cell arrays. *Lab Chip*, 2005, 5 : 1380-1386.

Kikuchi Y., Sunada K., Iyoda T., Hashimoto K., Fujishima A. Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ thin films: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. *Photochem. & Photobiol. A : Chemistry*, 1997, 106 : 51-56.

Kotov N.A. Layer-by-layer self-assembly: the contribution of hydrophobic interactions. *Nanostruct Mater*, 1999, B12 : 789-796.

Kumar A., Biebuyck H.A., Whitesides G.M. Patterning self-assembled monolayers: applications in materials science. *Langmuir*, 1994, 10 : 1498-1511.

Kumar A., Whitesides G.M., Patterned condensation figures as optical diffraction gratings. *Science*, 1994, 263 : 60-62.

Ladhari N., Hemmerlé J., Haikel Y., Voegel J.C., Schaaf P., Ball V. Stability of embossed PEI-(PSS-PDADMAC)₂₀ multilayer films versus storage time and versus a change in ionic strength. *Applied Surface Science*, 2008, 255 : 1988-1995.

Ladhari N., Hemmerle J., Ringwald C., Haikel Y., Voegel J.C., Schaaf P., Ball V. Stratified PEI-(PSS-PDADMAC)₂₀-PSS-(PDADMAC-TiO₂)_n multilayer films produced by spray deposition. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2008, 322 : 142-147.

Ladam G., Schaaf P., Voegel J.C., Schaaf P., Decher G., Cuisinier F. In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers. *Langmuir*, 2000, 16 : 1249-1255.

Lam M.T., Sim S., Zhu X., Takayama S. The effect of continuous wavy micropatterns on silicone substrates on the alignment of skeletal muscle myoblasts and myotubes. *Biomaterials*, 2006, 27 : 4340-4347.

Lavalle P., Gergely C., Cuisinier F.J.G., Decher G., Schaaf P., Voegel J.C., Picart C. Comparison of the structure of polyelectrolytes multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime : An in situ atomic force microscopy study. *Macromolecules*, 2002, 35 : 4458-4465.

Laugel N., Betscha C., Winterhalter M., Voegel J.C., Schaaf P., Ball V. Relationship between the growth regime of polyelectrolyte multilayers and the polyanion/polycation complexation enthalpy. *J Phys Chem B*, 2006, 110 : 19443-19449.

Laugel N., Hemmerlé J., Ladhari N., Arntz Y., Gonthier E., Haikel Y., Voegel J. C., Schaaf P., Ball V. Composite films of polycations and TiO₂ nanoparticles with photoinduced superhydrophilicity. *J Colloid Interface Sci*, 2008, 324 : 127-133.

Laugel N., Hemmerlé J., Porcel C., Voegel J.C., Schaaf P., Ball V. Nanocomposite silica/polyamine films prepared by a reactive layer-by-layer deposition. *Langmuir*, 2007, 23 : 3706-3711.

Lavalle P., Gergely C., Cuisinier F.J.G., Decher G., Schaaf P., Voegel J.C., Picart C. Comparison of the structure of polyelectrolytes multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: An in situ atomic force microscopy study. *Macromolecules*, 2002, 35 : 4458-4465.

Lösche M. Protein monolayers at interfaces. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 1997, 2 : 546-556.

Lu Y., Chen X., Hu W., Lu N., Sun J., Shen J. Room-temperature imprinting poly(acrylic acid)/poly(allylamine hydrochloride) multilayer films by using polymer molds. *Langmuir*, 2007, 23 : 3254-3259.

Lvov Y., Ariga K., Ichinose I., Kunitake T. Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic layer-by-layer adsorption. *J Am Chem*, 1995, 117 : 6117-6123.

Lvov Y., Ariga K., Ichinose I., Kunitake T. Formation of ultrathin multilayers and hydrated gel from montmorillonite and linear polycations. *Langmuir*, 1996, 12 : 3038-3044.

Lvov Y., Ariga K., Ichinose I., Kunitake T. Molecular film assembly via layer-by-layer adsorption of oppositely charged macromolecules (linear polymer, protein and clay) and concavalin A and glycogen. *Thin Solid Films*, 1996, 284/285 : 797-801.

Maoz R., Netzer L., Gun J., Sagiv J. Self-assembling monolayers in the construction of planned supramolecular structures and as modifiers of surface properties. *J Chem Phys*, 1988, 85 : 1059-1065.

McAloney R.A., Sinyor M., Dudnik V., Goh M.C. Atomic force microscopy studies of salt effects on polyelectrolyte multilayer film morphology. *Langmuir*, 2001, 17 : 6655-6663.

Mjahed H., Voegel J.C., Senger B., Chassepot A., Ball V., Schaaf P., Boulmedais F. Ionic strength increase induces cavitation in exponentially growing polyelectrolyte multilayer films. Soumis pour publication.

Müller R., Köhler K., Weinkamer R., Sukhorukov G.B., Fery A. Melting of PDADMAC/PSS capsules investigated with AFM Force Spectroscopy. *Macromolecules*, 2005, 23 : 9766-9771.

Nolte M., Fery A. Microstructuring of polyelectrolyte coated surfaces for directing capsule adhesion. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 2004, 3 : 22-26.

Onda M., Lvov Y., Ariga K., Kunitake T. Sequential reaction and product separation on molecular films of glucoamylase and glucose oxidase assembled on an ultrafilter. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1996, 82 : 502-506.

Picart C., Lavallo P., Hubert P., Cuisinier F.J.G., Decher G., Schaaf P., Voegel J.C. Buildup mechanism for poly(L-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface. *Langmuir*, 2001, 17 : 7414-7424.

Picart C., Mutterer J., Richert L., Luo Y., Prestwich G.D., Schaaf P., Voegel J.C., Lavallo P. 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*, 2002, 99 : 12531-12535.

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

Ramsden J.J., Lvov Y.M., Decher G. Determination of optical constants of molecular films assembled via alternate polyion adsorption. *Thin Solid Films*, 1995, 254 : 246-251.

Ruths J., Essler F., Decher G., Riegler H. Polyelectrolytes I: Polyanion/Polycation Multilayers at the Air/Monolayer/Water interface as elements for quantitative polymer adsorption studies and preparation of hetero-superlattices on solid surfaces. *Langmuir*, 2000, 16 : 8871-8878.

Sadrzadeh N., Glembourtt M.J., Stevenson C.L. Peptide drug delivery strategies for treatment of diabetes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007, 96 : 1925-1954.

Salloum D.S., Schlenoff J.B. Protein adsorption modalities on polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules*, 2004, 5 : 1089-1096.

Salomäki M., Vinokurov I.A., Kankare J. Effect of temperature on the buildup of polyelectrolyte multilayers. *Langmuir*, 2005, 21 : 11232-11240.

Sarmiento B., Ribeiro A.J., Veiga F., Ferreira D.C., Neufeld R.J. Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginate ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation. *J Nanosci Nanotechnol*, 2007, 7 : 2833-2841.

Schlenoff J.B., Dubas S.T., Graul T.W., Ly H. Surface- and bulk-charge distribution in the control of polyelectrolyte multilayer buildup. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 2000, 219 : U511-U511.

Shi X., Y., Cassagneau T., Caruso F. Electrostatic interactions between polyelectrolytes and a titania precursor: Thin film and solution studies. *Langmuir*, 2002, 3 : 904-910.

Shiratori S.S., Rubner M.F. pH-Dependent thickness behavior of sequentially adsorbed layers of weak polyelectrolytes. *Macromolecules*, 2000, 33 : 4213-4219.

Schwinté P., Voegel J.C., Picart C., Haikel Y., Schaaf P., Szalontai B. Stabilizing effects of various polyelectrolyte multilayer films on the structure of adsorbed/embedded fibrinogen molecules: An ATR-FTIR study. *Journal of Physical Chemistry B*, 2001, 105 : 11906-11916.

Seo J., Lutkenhaus J.L., Kim J., Hammond P.T., Char K. Effect of the layer-by-layer (LBL) deposition method on the surface morphology and wetting behavior of hydrophobically modified PEO and PAA LBL films. *Langmuir*, 2008, 24 : 7995-8000.

Srivastava S., Ball V., Podsiadlo P., Lee J., Ho P., Kotov N.A., Reversible loading and unloading of nanoparticles in “exponentially” growing polyelectrolyte LBL films. *J Am Chem Soc*, 2008, 130 : 3748-3749.

Sukhishvili S.A., Granick S. Polyelectrolyte adsorption onto an initially-bare solid surface of opposite electrical charge. *J Chem Phys*, 1998, 109 : 6861-6868.

Sukhorukov G.B., Möhwald H., Decher G., Lvov Y. M. Assembly of polyelectrolyte multilayer films by consecutively alternating adsorption of polynucleotides and polycations. *Thin Solid Films*, 1996, 284/285 : 220-223.

Sumerel J.L., Yang W., Kisailus D., Weaver J.C., Choi J.H., Morse D.E: Biocatalytically templated synthesis of titanium dioxide. *Che. Mater*, 2003, 25 : 4804-4809.

Thierry B., Kujawa P., Tkaczyk C., Winnik F.M., Bilodeau L., Tabrizian M. Delivery platform for hydrophobic drugs: prodrug approach combined with self-assembled multilayer. *J Amer Chem Soc*, 2005, 127 : 1626-1627.

Tokudome H., Miyauchi M. Titanate nanotube thin films via alternate layer deposition. *Chem. Commun*, 2004, 958-959.

Vodouhê C., Le Guen E., Mendez Garza J., Francius G., Déjugnat C., Ogier J., Schaaf P., Voegel J.C., Lavalle P. Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials*, 2006, 27 : 4149-4156.

Vörös J., Blättler T., Textor M. Bioactive patterns at the 100-nm scale produced using multifunctional physisorbed monolayers. *MRS BULLETIN*, 2005, 30 : 202-206.

Walboomers X.F., Jansen J.A. Cell and tissue behavior on micro-grooved surfaces. *Odontology*, 2001, 89 : 2-11.

Wang L.Y., Cui S.X., Wang Z.Q., Zhang X., Jiang M., Chi L.F., Fuchs H. Multilayer assemblies of copolymer PSH and PVP on the basis of hydrogen bonding. *Langmuir*, 2000, 16 : 10490-10494.

Wang R., Hashimoto K., Fujishima A., Chikuni M., Kojima E., Kitamura A., Shimohigoshi M., Watanabe T. Light-Induced amphiphilic surfaces. *Nature*, 1997, 388 : 431.

Wang G., Liu Y., Hu N. Comparative electrochemical study of myoglobin loaded in different types of layer-by-layer assembly films. *Electrochimica Acta*, 2007, 53 : 2071-2079.

Wautelet M., Lehn J.M. *Les Nanotechnologies*. Éd Dunod, 2e éd., Universciences. 2003.

Xia Y., Whitesides G.M. Soft lithography. *Angew Chem*, 1998, 37 : 550-575.

Yoo D., Shiratori S.S., Rubner M.F. Controlling bilayer composition and surface wettability of sequentially adsorbed multilayers of weak polyelectrolytes. *Macromolecules*, 1998, 31 : 4309-43318.

Liste des publications et communications

Publications

1. **Ladhari N.**, Hemmerlé J., Haikel Y., Voegel J.C., Schaaf P., Ball V.

Stability of embossed PEI-(PSS-PDADMAC)₂₀ multilayer films versus storage time and versus a change in ionic strength. [Stabilité temporelle et résistance au changement de force ionique de films multicouches PEI-(PSS-PDADMAC)₂₀, après microimpression]. Applied Surface Science (Etats-Unis). 255 : 1988-1995. 2008.

2. **Ladhari N.**, Hemmerlé J., Ringwald C., Haikel Y., Voegel J.C., Schaaf P., Ball V.

Stratified PEI-(PSS-PDADMAC)₂₀-PSS-(PDADMAC-TiO₂)_n multilayer films produced by spray deposition. [Films multicouches stratifiés PEI-(PSS-PDADMAC)₂₀-PSS-(PDADMAC-TiO₂)_n produits par nébulisation couche par couche]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects (Etats-Unis). 322: 142-147. 2008.

3. Laugel N., Hemmerlé J., **Ladhari N.**, Arntz Y., Gonthier E., , Haikel Y., Voegel J.C., Schaaf P., Ball V.

Composite films of polycations and TiO₂ nanoparticles with photoinduced superhydrophilicity. [Formation de films composites contenant des polycations et des nanoparticules de TiO₂ et présentant des propriétés de superhydrophilie photoinduite]. Journal of Colloid Interface Science (Etats-Unis). 324 :127-133. 2008.

Brevet européen

Ball V., Voegel J.C., Schaaf P., **Ladhari N.**, Hemmerlé J.

Brevet européen n°07 290 160.6 déposé le 8 février 2007. *Dépôt couche par couche par nébulisation alternée d'espèces réagissant entre elles et en particulier de polycations et d'alkoxydes métalliques.*

Laboratoire du Dr J-C. Voegel, Unité Inserm U-595.

Faculté de Médecine. Université Louis Pasteur (Strasbourg I).

Communications

- **Communications orales**

1. **Ladhari N.**

Microimpressions on polyelectrolyte multilayers films. [Microimpressions sur des films multicouches de polyélectrolytes]. Rencontre scientifique avec le groupe du Pr J. Vörös. Albé. France. 11 mai 2007 – 20 mn – **En anglais.**

2. **Ladhari N.**

Microimpressions sur des films multicouches de polyélectrolytes. Rencontre annuelle des Utilisateurs d'AFM de VEECO. Strasbourg. France. 7 novembre 2007 – 20 mn – **En français.**

- **Communications par affiches**

1. **Ladhari N.,** Haikel Y., Voegel J.C., Hemmerle J., Ball V.

Microimpressions sur des films multicouches de polyélectrolytes. XXXI^{èmes} Journées du Collège National des Enseignants en Prothèse Odontologique (CNEPO). Brest. 14-15 septembre 2007. (Présentation fondamentale). 2^{ème} Prix de Poster.

2. **Ladhari N.,** Haikel Y., Voegel J.C., Hemmerle J., Ball V.

Microimpressions sur des films multicouches de polyélectrolytes. Assises Nationales de la Recherche en Odontologie (ANRO). Strasbourg. 19 octobre 2007.

3. Laugel N., Hemmerlé J., **Ladhari N.**, Voegel J.C., Schaaf P., Ball V.

Reactive layer by layer deposition of hybrid films made of polymers and oxyde nanoparticles. [Dépôts réactifs couche par couche de films hybrides construits à partir de polymères et de nanoparticules d'oxydes]. The 6th JSPS (Japan Society for Promotion of Science) Forum in France. Strasbourg. Livre des résumés 2007.

4. Laugel N., Hemmerlé J., **Ladhari N.**, Voegel J.C., Schaaf P., Ball V.

Reactive layer by layer deposition of hybrid films made of polymers and oxyde nanoparticles. [Dépôts réactifs couche par couche de films hybrides construits à partir de polymères et de nanoparticules d'oxydes]. 2^{ème} journée scientifique du Pôle Matériaux et Nanosciences d'Alsace (PMNA). Strasbourg. 18 septembre 2008.

5. **Ladhari N.**, Haikel Y., Voegel J.C., Hemmerlé J., Ball V.

Films multicouches stratifiés fonctionnalisés par du TiO₂. Journées communes du Collège National des Enseignants en Sciences Biologiques Odontologiques (CNESBO), du collège 58-03, du Forum des Jeunes Chercheurs en Odontologie (FJCO) et des Assises Nationales de la Recherche en Odontologie (ANRO). Brest. 2-3 octobre 2008.

Résumé. Les films multicouches de polyélectrolytes constituent un nouveau moyen de changer la nature de l'interface entre un matériau et son environnement. Notre travail a consisté à développer de nouvelles façons de structurer ces films selon trois orientations différentes.

Dans un premier temps, nous avons modifié la topographie de surface d'un film multicouche. Par une technique d'impression par compression nous avons transféré un motif microstructuré dans un film de (PDADMAC-PSS)₂₀, à partir d'un tampon en polydiméthylsiloxane. Les canaux longitudinaux et parallèles que nous y avons imprimés gardent leur morphologie et leur profondeur qu'ils soient conservés à sec ou dans une solution de NaCl à 0.15M. Ces films microstructurés pourraient servir à guider la croissance cellulaire ou pour des applications en microfluidique. Dans une deuxième partie nous avons construit un film structuré en deux compartiments et nous l'avons fonctionnalisé avec des nanoparticules de dioxyde de titane. Les films stratifiés (PDADMAC-PSS)₂₀-(PDADMAC-TiO₂)_n ont été obtenus par la méthode originale du dépôt réactif par nébulisation. Nos résultats montrent que des films hybrides riches en TiO₂ acquièrent des propriétés de superhydrophilie photoinduite ainsi qu'une capacité à filtrer les rayons UV. Enfin, nous avons chargé en insuline des films de natures différentes à partir d'une solution aqueuse contenant cette molécule biologique. Nos expériences permettent d'envisager la délivrance de ce médicament au contact d'une solution imitant la salinité des fluides biologiques.

Ces recherches ouvrent de nouvelles perspectives quant aux possibilités de « multifonctionnaliser » le revêtement d'un biomatériau.

Mots clés : multicouches de polyélectrolytes, micro et nanostructurations, lithographie douce, impression par compression, nanoparticules, chargement/déchargement.

Summary. Polyelectrolyte multilayer films bring a new opportunity to change the nature of interactions between a material and its environment. Our study consisted in developing new functionalizations of these films in three different aspects.

At first we modified the surface topography of a multilayer film. Through an embossing technique we transferred a microstructured pattern into a (PDADMAC-PSS)₂₀ film from a polydimethylsiloxane stamp. The parallel, lengthwise channels we printed in it keep their morphology and their depth when stored in the dry state or in a NaCl 0.15M solution. These microstructured films might be used for cellular guidance or for microfluidic applications.

In a second part we built up a two-compartment structured film and functionalized it with titane dioxide nanoparticles. The (PDADMAC-PSS)₂₀-(PDADMAC-TiO₂)_n stratified films were obtained by an original reactive spray deposition method. Our results showed that hybrid films, enriched in TiO₂, display photoinduced superhydrophilicity and exhibit a property to UV filtration. At last we loaded various kinds of films with insulin from a aqueous solution containing this biological molecule. Our experiments allowed us to expect drug release in a solution mimicking biological fluids.

This study opens the route for easy and versatile multifunctionalization methods of biomaterial coatings.

Key words: polyelectrolyte multilayers, micro and nanostructurations, soft lithography embossing, nanoparticles, loading/unloading.