

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

**Discipline : Chimie Physique**

---

**Caractérisation physico-chimique des films  
multicouches de polyélectrolytes à base de  
polysaccharides et de polypeptides en vue  
d'applications dans le domaine des biomatériaux**

*Soutenue publiquement le 29 Octobre 2009  
par*

**Hajare MJAHEB**

---

**JURY**

<i>Directeur de Thèse</i>	<b>M. Jean-Claude VOEGEL</b> <i>Directeur de Recherche, INSERM U 977, Strasbourg</i>
<i>Rapporteur Interne</i>	<b>M. Guy SCHLATTER</b> <i>Professeur, Université de Strasbourg</i>
<i>Rapporteurs Externes</i>	<b>M. Patrick MENU</b> <i>Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy</i>
	<b>M. Janos VÖRÖS</b> <i>Professeur, Ecole polytechnique de Zürich (ETH), Suisse</i>
<i>Examineurs</i>	<b>Mme Fouzia BOULMEDAIS</b> <i>Chargée de Recherche, CNRS UPR 22, Strasbourg</i>
	<b>M. Pierre SCHAAF</b> <i>Professeur, Université de Strasbourg</i>

---

---

---

*“Le bonheur est une décision que nous prenons d’être heureux quoi qu’il arrive”*

*André Maurois*

A mes parents qui m'ont soutenue,

A ma sœur *Mounia* et mon frère *Yassine*,

A la famille *Schneider-Dietrich*,

A la famille *Grombacher*,

Et à tous mes amis,

---

---

## **Remerciements**

---

Ce travail a été effectué dans les laboratoires suivants : l'Unité INSERM 977, "Biomatériaux et Ingénierie Tissulaire" et l'Institut Charles Sadron, UPR 22 CNRS. Je tiens tout particulièrement à remercier les directeurs Jean-Claude Voegel et Pierre Schaaf de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires respectifs.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse Monsieur Jean-Claude Voegel, Directeur de Recherche à l'INSERM (977, Strasbourg), de m'avoir accueillie dans son équipe et confié ce thème de recherche. Je le remercie pour les discussions riches que nous avons eues, sa disponibilité et sa patience. Je n'oublierai pas son soutien.

Je remercie énormément Monsieur Pierre Schaaf, Professeur à l'Université de Strasbourg (Institut Charles Sadron, Strasbourg), qui a participé activement à la réalisation de ce travail. Je le remercie également pour sa disponibilité tout au long de mon travail, son soutien, son encouragement et son aide toujours précieuse.

Je suis très sensible à l'honneur que me font :

Monsieur Patrick Menu, Professeur à l'Université Henri Poincaré à Nancy.

Monsieur Guy Schlatter, Professeur à l'Université de Strasbourg.

Monsieur Janos Vörös, Professeur à l'Ecole Polytechnique de Zürich (ETH).

Je leur adresse mes sincères remerciements.

Un immense merci à Fouzia Boulmedais, Chargée de Recherche au CNRS (UPR 22, Institut Charles Sadron), pour m'avoir encadrée et suivie de très près depuis le début. Merci pour les conditions excellentes de travail que tu m'as offertes. Ton encouragement et ta présence sont précieux. Toujours du temps à me consacrer même durant tes vacances pour la rédaction. J'ai appris énormément grâce à toi. Tu as toute ma reconnaissance ma très chère amie!

Je tiens à remercier très vivement Vincent Ball, l'encyclopédie ambulante, qui répond toujours présent pour me donner un coup de main et m'expliquer les phénomènes physico-chimiques. Cela malgré ton emploi du temps bien chargé. Je te remercie pour ta participation active et ton implication dans mon travail surtout la dernière partie qui m'a beaucoup enrichie sans oublier les répétitions.

J'aimerais témoigner ma profonde reconnaissance à Bernard Senger pour son aide dans le traitement des données de FRAP, son écoute et sa gentillesse. Merci pour ta participation dynamique dans mon travail et surtout ton soutien lors des répétitions. Le schéma de l'entropie, je ne l'oublierai pas, quelle pédagogie !

Je tiens à remercier Jérôme Mutterer et Mathieu Erhardt, Ingénieurs de Recherche à l'IBMP, Philippe Laval, Chargé de Recherche (Inserm 977), pour leurs précieux conseils en microscopie confocale. Merci pour votre patience !

Je remercie également Madame Nadia Jessel-Benkirane, d'avoir soutenu ma candidature et d'être la première à m'accueillir au laboratoire.

Je souhaiterais remercier Alex Zelikin, pour son amitié et tout ce que j'ai pu apprendre durant son séjour dans notre laboratoire.

Je remercie amicalement Dominique Vautier pour sa disponibilité, son aide et son écoute.

A mes compagnons de bureau, je suis très heureuse d'avoir passé du temps ces dernières années en leur compagnie. Armelle, ma chère amie, je te remercie de m'avoir appris la culture cellulaire avec patience et enthousiasme, je n'oublierai pas non plus nos séances « spray ». Ta participation à mon travail. Merci de m'avoir fait découvrir ton coiffeur, c'est mon médecin maintenant (vive les boucles). Je te remercie également pour ta présence, nous en avons passés des moments difficiles. Alae, je suis ravie de te connaître et de t'avoir comme ami, ton soutien et ton écoute son précieux. Mathias, je t'ai suivi à l'ICS, nos pauses « Kfé gratos à 10h » et nos discussions me réjouissent. Christian, toujours à partager ses confiseries, merci pour ta gentillesse.

Je souhaiterais remercier Christiane, pour ses conseils et sa sagesse et ses services. Merci de m'avoir facilité les tâches administratives (commandes, congrès.....).

Falk, merci de me faire danser la salsa. Cédric (j'attends de goûter tes plats), Nadia L., Laurent, Grégory, contente de vous connaître. Un clin d'œil à Leyla (bon courage pour la rédaction !), Sandra (merci pour nos discussions et tes conseils), Isabelle (merci pour l'appart), Christine, Xin, Carlos, Thirou, Florian, François, Adnane, Florent (de retour !!), Marie-Chantal, Sabine Bopp, Hervé, Mathieu, Monsieur Fluck (merci pour votre aide pour la construction des films), Joseph Hemmerlé, Ludovic (merci pour l'AFM), Youri, Erell, Maria (Cinéchita : plus jamais, mais ça nous fait un souvenir unique), René, Olivier (j'ai fait un carton avec la danse des nains), Cosette (la cuisson des légumes est plus facile maintenant, merci), je te remercie également pour toutes les manip faites en e, Yves Cam (merci pour les discussions et les poèmes de Canada), Delphine (on en a vécu des choses !!), Riadh ( arrête tes moqueries sur mon dialecte). Merci à vous tous, j'ai passé des moments inoubliables!

Un grand merci à Géraldine (gégé), toujours là pour montrer les techniques. Merci pour ta gentillesse et ton amitié. Sabine, ma très chère « Sabinen », tellement ravie de notre amitié et toujours disponible pour rendre service. Tu m'as véhiculé le virus de la Salsa.

Je n'oublie pas Claudine qui m'a transmis son savoir lors de mon arrivée.

Un Chaleureux merci à mon chère ami Damien. Ton soutien, ton aide et ta présence m'ont été précieux. Ravie de ton amitié!

Un grand merci à mes amis que j'ai rencontrés lors de mon Master 2 : Isa, Soph, Vincent, Estelle, Alban, Tarak, Marc-André, Luc. Je n'oublie pas le soutien du Professeur Bousquet et du Professeur Monassier.

Je tiens à remercier toute l'équipe ICAPS et plus particulièrement Mohammed Ouja, grâce à qui j'ai pu trouver du travail et financer mes études.

A l'ICS, j'ai rédigé ma thèse. C'était également l'occasion pour rencontrer des gens formidables : Johanna, Patricia, Frédéric, Tam (le bus de 23h va me manquer), Rémy, Diana, Ali (je te dois combien déjà ?), Céline, Soury (super massage), Sanguita, Na, Eric Gontier, Gaultier (les crêpes miam, prête à recommencer l'expérience), Emmanuelle (rando ??), Christelle, Kat (plz sans oignons), Emek (Mme turk?).

Je souhaiterais témoigner ma reconnaissance à Loïc d'avoir pris sur son temps pour corriger ma thèse et de m'avoir plusieurs fois écoutée et conseillée et remontée le moral lors des répétitions. Merci pour ta gentillesse et ta générosité (papa Noël).

Merci à toi Audrey pour ton soutien et ton amitié, les joyeux mots du sud. Merci pour tout le temps que tu m'as consacré pour m'écouter et conseiller lors des répétitions.

J'arrive à Lara : j'ai découvert une personne généreuse, aimante, adorable et disponible. Tu m'as été d'un soutien hors paire durant ces derniers moments. Je te souhaite beaucoup de chance pour la rédaction. Quel délire ! Merci de me faire rire et d'être mon ami !

Merci à toi Andréas de m'avoir cédé ton bureau, tu m'as montré comment faire le café pour séduire Fouzia et la persuader de me garder. Sauf que je n'ai pas été douée pour cela. Quant au téléphone, j'ai fait beaucoup de progrès mais pas assez pour me faire engagée.

Avec l'équipe de foot de l'ICS, nous avons partagé la joie de jouer et de gagner la 2<sup>ème</sup> place au tournoi : Guillaume K., Philippe, Hervé, Jean-Louis, Adeline, Gaby, Pierric (argneux), Franck, Thibault, Aziz, Mohammed et Zacharia, merci à vous tous.

Sportivement.

J'ai également eu la chance de faire partie du groupe de musique de l'ICS : Natalia, Gaby, Manu, Guillaume F., Philippe et André.

Musicalement.

Je voudrai remercier ma famille de m'avoir toujours soutenue et permis de venir en France : mon père de m'avoir transmis l'amour des sciences. Ma mère, ma sœur et mon frère, merci de me rassurer et d'être là à tous les moments.

Sans son aide, je n'aurai peut être pas été là. Une pensée à M. Dietrich Bernard, qui a été pour moi comme un deuxième père. Merci pour la confiance que vous aviez pour moi. Merci de m'avoir appris les échecs et surtout de m'avoir laissée gagner. Vous avez toute ma reconnaissance et mon admiration. Caroline, Guy et Guillaume, merci pour votre confiance et amitié et votre présence à tous moments, n'est ce pas normal entre famille? Le hasard fait bien les choses.

Je remercie chaleureusement la famille Grombacher. Une belle histoire de famille a commencé depuis le jour où j'ai gardé "Blaxy". Je suis si fière et heureuse de vous avoir!

J'aimerai témoigner ma reconnaissance à Philippe Dietrich, qui m'avait soutenue et beaucoup aidée.

Aminatou, ma soeurette, toujours là pour moi. Quelle chance de te connaître ! Tu m'as appris beaucoup de choses. La positive attitude ! Je n'oublierai jamais comment tu m'avais aidée à surmonter mes moments difficiles où j'ai failli abandonner le combat. Tu m'as poussée et ça a marché. Je te suis très reconnaissante.

Un grand merci à Thomas qui est toujours là pour m'aider, merci pour la mise en page !

Un "*laisse tomber*".

# TABLES DES MATIERES

Remerciements .....	5
Tables des Matières.....	9
Abréviations et symboles .....	13
Introduction Générale .....	15

## Chapitre I :

### Revue Bibliographique

<b>I.1 Biomatériaux et ingénierie tissulaire.....</b>	<b>18</b>
I.1.1 Biomatériaux .....	18
I.1.2 Ingénierie tissulaire .....	19
I.1.3 Les hydrogels dans l'ingénierie tissulaire .....	21
I.1.4 Hydrogel d'alginate.....	22
I.1.4.1 Alginate de sodium.....	22
I.1.4.2 Composition chimique de l'alginate.....	23
I.1.4.3 Formation du gel d'alginate et ses propriétés physiques .....	24
I.1.4.4 Propriétés physiques du gel d'alginate .....	25
I.1.4.5 Stabilité et dégradation du gel d'alginate .....	27
I.1.4.6 Applications de l'hydrogel d'alginate dans l'ingénierie tissulaire .....	28
<b>I.2 Les films multicouches de polyélectrolytes .....</b>	<b>31</b>
I.2.1 Historique des films multicouches .....	31
I.2.2 Construction des films multicouches de polyélectrolytes .....	33
I.2.2.1 Principe du dépôt couche par couche .....	33
I.2.2.2 Différentes méthodes de dépôts.....	34
I.2.2.3 Nature du substrat.....	35
I.2.2.4 Interactions mises en jeu lors de la construction du film .....	36
I.2.2.4.1 Interactions électrostatiques .....	36
I.2.2.4.2 Liaisons hydrophobes.....	38
I.2.2.4.3 Liaisons hydrogènes.....	38
I.2.3 Propriétés physico-chimiques des films multicouches de polyélectrolytes.....	39
I.2.3.1 Mode de croissance linéaire : le modèle des trois zones.....	40
I.2.3.2 Mode de croissance exponentielle et transition croissance exponentielle/ linéaire .....	42
I.2.3.3 Paramètres influençant le mode de croissance des films multicouches .....	44
I.2.3.3.1 Influence de la force ionique .....	44
I.2.3.3.2 Influence de la densité de charge des polyélectrolytes.....	46
I.2.3.3.3 Influence du contre-ion .....	47
I.2.3.3.4 Influence de la température.....	48
I.2.3.4 Mobilité des polyélectrolytes dans les films multicouches .....	49
I.2.3.5 Les Complexes de polyélectrolytes : solution versus films multicouches .....	51
I.2.4 Vers des architectures multicompartimentés de films multicouches .....	54
I.2.5 Films multicouches répondants à différents stimuli externes.....	55
I.2.5.1 Films répondant au pH.....	56
I.2.5.1.1 Dissolution des films multicouches .....	56
I.2.5.1.2 Perméabilité des films multicouches .....	57
I.2.5.1.3 Membranes à sélectivité ionique bi-polaire .....	58
I.2.5.2 Films répondant à la température.....	58

1.2.5.2.1 Par transition de phase.....	58
1.2.5.2.2 Utilisation de copolymères blocs hydrophiles-hydrophobes .....	60
1.2.5.3 Films répondant à la force ionique et au contre-ion .....	60
1.2.5.4 Films répondant à des stimuli mécaniques.....	61
1.2.5.4.1 Des surfaces hydrophiles aux surfaces hydrophobes .....	61
1.2.5.4.2 Formation de nano-valves.....	62
1.2.5.5 Films répondant à des stimuli électriques.....	65
1.2.5.5.1 Dissolution des films multicouches .....	65
1.2.5.5.2 Gonflement et dégonflement des films multicouches.....	66
1.2.6 Applications et fonctionnalisation des films multicouches dans le domaine des biomatériaux .....	68
1.2.6.1 Comportement des films de polyélectrolytes vis-à-vis du milieu de culture .....	69
1.2.6.1.1 Adsorption de protéines .....	69
1.2.6.1.2 Adhésion cellulaire.....	70
1.2.6.2 Fonctionnalisation des films multicouches par des molécules actives .....	71
1.2.6.2.1 Insertion de protéines par simple dépôt .....	72
1.2.6.2.2 Insertion de peptides par couplage covalent.....	73
1.2.6.2.3 Insertion d'autres molécules actives .....	74
1.2.6.2.4 Fonctionnalisation par des enzymes : les bioréacteurs .....	75
<b>I.3 Références bibliographiques.....</b>	<b>77</b>

## Chapitre II :

### Matériel et Méthodes

<b>II.1 Matériel.....</b>	<b>102</b>
II.1.1 Les polyélectrolytes .....	102
II.1.2 Alginate de sodium .....	104
II.1.2.1 Structure de l'alginate.....	104
II.1.2.2 Gélification de l'alginate .....	105
II.1.2.3 Préparation d'une solution d'alginate de sodium.....	106
II.1.3 Polyélectrolytes fluorescents .....	106
II.1.3.1 Protocole de marquage du HA à la FITC : (HA <sup>FITC</sup> ) .....	107
II.1.3.2 Protocole de marquage du PSS à la Rhodamine (PSS <sup>Rho</sup> ) .....	107
II.1.3.3 Récapitulatif des polyélectrolytes fluorescents utilisés .....	108
<b>II.2 Préparation des échantillons .....</b>	<b>108</b>
II.2.1 Les substrats utilisés .....	109
II.2.2 Procédés de construction des films multicouches.....	109
II.2.2.1 Méthode de trempage.....	109
II.2.2.2 Méthode de nébulisation .....	111
II.2.3 Procédés de construction des architectures microstratifiés.....	113
<b>II.3 Méthodes de caractérisation et d'analyse .....</b>	<b>113</b>
II.3.1 Microscopie confocale à balayage laser.....	113
II.3.1.1 Phénomène de fluorescence et sondes fluorescentes.....	113
II.3.1.2 Principe de la microscopie confocale à balayage laser.....	115
II.3.1.3 Reconstitution des images.....	116
II.3.1.4 Déroulement d'une expérience.....	117
II.3.2 Microbalance à cristal de quartz .....	117
II.3.2.1 Principe général.....	117
II.3.2.2 Fonctionnement de la QCM-D.....	119
II.3.2.3 Déroulement d'une expérience.....	121
II.3.3 Fluorimétrie .....	122
II.3.3.1 Fonctionnement du fluorimètre.....	122
II.3.3.2 Protocole expérimental .....	123

II.3.3.3 Calcul de la fluorescence cumulée.....	124
II.3.4 Spectroscopie UV-visible .....	124
II.3.4.1 Principe.....	124
II.3.4.2 Déroulement d'une expérience.....	126
<b>II.4 Références bibliographiques .....</b>	<b>127</b>

Chapitre III :

"Etude des complexes de polyélectrolytes :  
Solution *versus* films multicouches"

<b>III.1 Résumé.....</b>	<b>130</b>
<b>III.2 Projet Article 1.....</b>	<b>131</b>

Chapitre IV :

"Effet de la variation de la force ionique sur le comportement des films  
multicouches préformés"

<b>IV.1 Résumé.....</b>	<b>156</b>
<b>IV.2 Article 2.....</b>	<b>159</b>
<b>IV.3 Article 2 (Supporting information) .....</b>	<b>167</b>
<b>IV.4 Projet d'Article 3.....</b>	<b>171</b>

Chapitre V :

"Construction d'un biomatériau multi-stratifié par pulvérisation alternée de  
films multicouches et de gels d'alginate"

<b>V.1 Résumé .....</b>	<b>188</b>
<b>V.2 Article 4 .....</b>	<b>189</b>
<b>V.3 Article 4 (Supporting information).....</b>	<b>196</b>
<b>V.4 Résultats complémentaires .....</b>	<b>199</b>

<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>205</b>
---	------------

---

## Abréviations et symboles

---

### **Polymères:**

HA	acide hyaluronique
PAA	poly(acide acrylique)
PAH	poly(allylamine)
PAH-g-PEG	copolymère greffé constitué d'un squelette de PAH et de chaînes latérales de PEG
PDL	poly(D-lysine)
PEG	poly(éthylène glycol)
PEI	poly(éthylène imine)
PGA	acide poly(L-glutamique)
PGA-g-PEG	copolymère greffé constitué d'un squelette de PGA et de chaînes latérales de PEG
PLL	poly(L-lysine)
PLL-g-PEG	copolymère greffé constitué d'un squelette de PLL et de chaînes latérales de PEG
PSS	poly(styrène sulfonate)

### **Polyélectrolytes fluorescents:**

HA <sup>FITC</sup>	acide hyaluronique greffé à l'isothiocyanate de fluorescéine
PLL <sup>FITC</sup>	poly(L-lysine) greffée à l'isothiocyanate de fluorescéine
PLL <sup>Rho</sup>	poly(L-lysine) greffée à la rhodamine succinimidylester
PSS <sup>MRho</sup>	poly(4-styrène sulfonate de sodium) greffé à la methacryloxyéthyl-thiocarbamoyl rhodamine B

### **Protéines et enzymes**

GA	glucoamylase
GOD	glucose oxydase
$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -mélanocortine
TNF $\alpha$	facteur de nécrose de tumeurs
BMP-2	protéine de la morphogenèse osseuse

**Réactifs et solvants utilisés :**

SDS	sodium dodecyl sulfate
HCl	acide chlorhydrique
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl) pipérazine éthane sulfonique
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
Rho	rhodamine succinimidylester

**Appareils et techniques utilisés :**

QCM	Microbalance à cristal de quartz
CLSM	Microscopie confocale à balayage laser

**Variables physiques**

$f_0$	fréquence fondamentale du cristal de quartz
$M$	masse du cristal de quartz
$m_0$	masse du dépôt sur le cristal de quartz
$\alpha$	angle d'incidence du faisceau lumineux
$\Delta D$	changement de la dissipation du cristal de quartz de la microbalance
$\Delta f$	changement de fréquence de résonance du cristal de quartz de la microbalance correspondant à l'harmonique $i$ de la fréquence fondamentale $f_1$ (Hz)
$\lambda$	longueur d'onde de la lumière (nm)
$\zeta$	potentiel zêta (mV) mesuré au niveau du plan de cisaillement d'une

## Introduction Générale

---

Une simple coupe histologique révèle que les tissus biologiques, comme par exemple la peau ou le cartilage, sont hautement organisés et stratifiés. Ils sont constitués de différents types cellulaires, organisés de manière adéquate afin de remplir une fonction bien définie et interagir avec leur matrice extracellulaire. Un des objectifs de l'ingénierie tissulaire est le développement de substituts biologiques qui vont restaurer, maintenir ou améliorer la fonction tissulaire. De manière générale, l'ingénierie tissulaire implique l'utilisation de biomatériaux tridimensionnels appelés « *scaffolds* », capables de créer un environnement favorable à la prolifération, la différenciation et à la conservation du phénotype cellulaire. Ainsi, pour leurs diverses propriétés, les hydrogels semblent être des candidats potentiels dans le domaine de l'ingénierie tissulaire comme « *scaffolds* ». Cependant, les méthodes développées jusqu'à nos jours, ne permettent pas une distribution spatiale précise des différents types cellulaires afin de mimer l'architecture stratifiée du tissu à remplacer. Actuellement, des « *scaffolds* » de nouvelle génération sont en cours de développement et consistent en la réalisation de matériaux bioactifs. L'activité biologique peut être conférée au matériau en modifiant en général ses propriétés surfaciques. Ceci a conduit à la mise au point de nouveaux procédés de traitements des surfaces. Certains sont basés sur l'adsorption ou le couplage covalent de molécules actives, d'autres sur les monocouches auto-assemblées. Ces méthodes sont, en général, difficiles à mettre en œuvre et ne peuvent être adaptées à tous les types de surfaces ou à toutes les géométries. Une autre voie de fonctionnalisation des biomatériaux basée sur le concept de multicouches de polyélectrolytes a été introduite plus récemment. Il s'agit de recouvrir les matériaux par un film de polyélectrolytes, en les exposant alternativement à des solutions de polyanions et de polycations. Les interactions entre les polyélectrolytes sont essentiellement d'origine électrostatique, mais des interactions de type hydrogène ou hydrophobe peuvent également jouer un rôle. Depuis plus de 10 ans, l'Unité INSERM 977 à Strasbourg a focalisé ses efforts sur le développement et l'application de ce concept pour la fonctionnalisation des biomatériaux. Ainsi, plusieurs travaux ont démontré le potentiel des films multicouches comme réservoirs de molécules, en particulier de principes actifs qui conservent leurs activités biologiques. La fonctionnalisation de ces films multicouches a déjà été réalisée par insertion de protéines, de peptides, de lipopolysaccharides, d'oligonucléotides, d'ADN ou encore de médicaments.

Le travail de thèse que j'ai effectué, porte sur l'étude physico-chimique de films multicouches à base de polypeptides et de polysaccharides en vue d'applications dans le domaine des biomatériaux. Mon travail a comporté trois volets principaux :

- Il s'agissait, tout d'abord d'essayer d'établir une corrélation entre la complexation des polyélectrolytes en solution et la construction des films multicouches pour différents couples polycation/polyanion. Deux paramètres ont été étudiés, le rapport ( $f$ ) du nombre de moles de monomères cationiques sur le nombre de moles de monomères anioniques et la concentration en sel. (Chapitre III)
- D'autre part, nous avons étudié le comportement du film multicouche PLL/HA suite à l'augmentation ou à la diminution de la force ionique du surnageant. Nous nous sommes également intéressés à la restructuration du film multicouche suite à divers chocs osmotiques. (Chapitre IV)
- Enfin, dans la dernière partie de mon travail, j'ai déterminé les conditions physico-chimiques permettant la construction d'un biomatériau stratifié et fonctionnalisé par alternance de films multicouches et de gels d'alginate. (Chapitre V)

Le chapitre I sera consacré à l'état des travaux et des connaissances rassemblés depuis quelques années dans le domaine des multicouches de polyélectrolytes. Le chapitre II donnera une description des différentes techniques utilisées lors de nos travaux, ainsi que toutes les informations pertinentes sur les produits utilisés au cours de ces études. Enfin, dans la conclusion générale, nous donnerons des perspectives de ce travail et, plus généralement, de l'utilisation des multicouches dans le domaine des biomatériaux.

Chapitre 1 :  
Revue Bibliographique

---

<b>I.1 Biomatériaux et ingénierie tissulaire .....</b>	<b>18</b>
I.1.1 Biomatériaux .....	18
I.1.2 Ingénierie tissulaire .....	19
I.1.3 Les hydrogels dans l'ingénierie tissulaire .....	21
I.1.4 Hydrogel d'alginate .....	22
<b>I.2 Les films multicouches de polyélectrolytes .....</b>	<b>31</b>
I.2.1 Historique des films multicouches .....	31
I.2.2 Construction des films multicouches de polyélectrolytes.....	33
I.2.3 Propriétés physico-chimiques des films multicouches de polyélectrolytes .....	39
I.2.4 Vers des architectures multicompartimentés de films multicouches .....	54
I.2.5 Films multicouches répondants à différents stimuli externes .....	55
I.2.6 Applications et fonctionnalisation des films multicouches dans le domaine des biomatériaux .....	68
<b>I.3 Références bibliographiques .....</b>	<b>77</b>

---

## **I.1 Biomatériaux et ingénierie tissulaire**

### **I.1.1 Biomatériaux**

La perte ou le dysfonctionnement d'un organe ou d'un tissu sont parmi les problèmes de santé publique les plus dévastateurs et coûteux (Langer and Vacanti, 1993). Les biomatériaux ont été développés pour préserver l'intégrité et le confort de vie des personnes souffrant de déficiences fonctionnelles ou victimes de blessures ou de brûlures.

Selon la définition retenue par la Conférence de la Société Européenne des Biomatériaux à Chester en 1986, « les biomatériaux sont des matériaux non vivants, utilisés dans un appareil médical, et conçus pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'ils participent à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle ». Depuis les dispositifs médicaux à usage unique jusqu'aux prothèses implantées à demeure, une grande variété de produits impliquent l'utilisation de biomatériaux. Les biomatériaux ne se définissent pas par une nature particulière mais par l'usage auquel ils sont destinés. Ils regroupent aussi bien des matériaux issus du génie de l'homme (métaux, alliages métalliques, céramiques, matières plastiques) que des matériaux d'origine naturelle (collagène et cellulose), mais aussi des matériaux d'un nouveau type associant un des matériaux précités à une matrice biologique.

Lors de l'implantation d'un biomatériau, il est important de contrôler l'adhésion protéique et l'adhésion cellulaire afin de palier aux événements néfastes tels que des réactions inflammatoires chroniques, les réactions allergiques, les infections bactériennes, ou encore les thromboses dans le cas des implants vasculaires. Une réaction inflammatoire chronique se traduit par une nécrose nécessitant la dépose de l'implant. Les efforts de la recherche actuelle dans le domaine des biomatériaux consistent, dans un premier temps, à élaborer des composés possédant des propriétés mécaniques et structurales adaptées à leur future fonction. Ensuite, les biomatériaux développés doivent interagir de façon active avec le milieu « *vivant* » environnant tel que les tissus avoisinants le site d'implantation du matériau. Des réponses contrôlées sont recherchées à partir du biomatériau pour minimiser les réactions vis-à-vis de ce corps étranger, et moduler l'activation des cellules du système immunitaire (Ratner, 1996; Ratner and Bryant, 2004). Ces nouveaux biomatériaux développés sont donc constitués de composés bioactifs capables d'interagir avec les cellules et d'induire une réponse spécifique des tissus environnant.

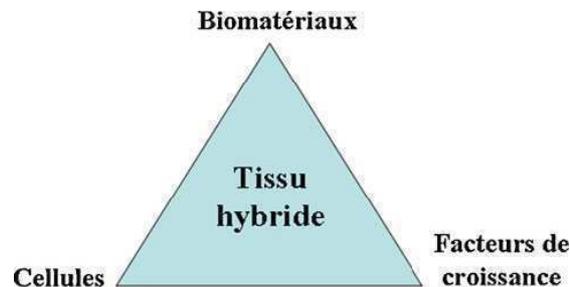
Une des caractéristiques indispensable des biomatériaux est leur biocompatibilité et leur inertie lors de leur intégration dans le corps humain, ceci afin d'éviter les phénomènes de rejet. Une évolution récente est l'élaboration de composés sont biodégradables. De tels composés sont destinés à des applications thérapeutiques nécessitant une présence limitée dans le temps comme les stents biorésorbables (Zilberman and Eberhart, 2006), les fils de suture synthétiques résorbables tels que le *Vicryl*<sup>®</sup> rapide ou le *Dexon*<sup>®</sup>, les membranes biodégradables pour la cicatrisation des plaies (Christian Jürgens and Seide, 2006), ou encore les éponges pour la régénération du tissu osseux (Freed *et al.*, 1993; Ishaug *et al.*, 1997).

Cependant, les limitations inhérentes à l'emploi des biomatériaux (détérioration à long terme des propriétés structurales et des interfaces, difficultés à trouver des substituts pour remplacer certains types tissulaires) ont entraîné le développement de l'ingénierie tissulaire qui s'efforce de reproduire les principales propriétés des tissus et de contrôler leur comportement dans le temps.

### **I.1.2 Ingénierie tissulaire**

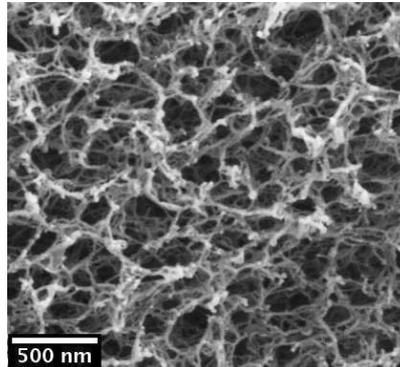
L'ingénierie tissulaire, au carrefour des sciences du vivant et des sciences de l'ingénieur, a pour but de remplacer, maintenir ou améliorer la fonction de tissus humains (Langer and Vacanti, 1993), grâce à des substituts tissulaires incluant des éléments vivants. Il s'agit donc d'élaborer des tissus artificiels, en faisant appel aux cultures de cellules (cellules différenciées, ou plus souvent cellules souches de la moelle osseuse), à des biomatériaux (matériaux poreux à architecture contrôlée, mais également ciments), à des facteurs de croissance (comme les *bone morphogenetic proteins*), aux protéines intervenant dans l'adhésion cellulaire (telles que la fibronectine, ou les séquences reconnues par les sous unités d'intégrine), ou encore à la thérapie génique des cellules (notamment en utilisant des cellules-souches transfectées). Leur association est un biomatériau hybride (Fig. 1.1). En outre, la voie de l'ingénierie tissulaire présente l'avantage de s'affranchir des problèmes comme le manque de donneurs et le risque de transmission virale. Les applications sont nombreuses et recouvrent la reconstitution aussi bien de la peau (MacNeil, 2007), du foie (Bhandari *et al.*, 2001), de la cornée (Hu *et al.*, 2005; Rimmer *et al.*, 2007), mais également d'appareil locomoteur (Hardouin *et al.*, 2000; MacIntosh *et al.*, 2008; Tuli *et al.*, 2003). Plusieurs de ces tissus sont déjà en cours d'application clinique (greffe de la peau (Eaglstein and Falanga, 1997), du cartilage et de l'os (Roberts *et al.*, 2008). Cette approche thérapeutique est actuellement considérée comme innovante en médecine régénérative à côté des deux principales thérapies que

sont la transplantation d'organes et la chirurgie prothétique (Lavik and Langer, 2004; Vacanti and Langer, 1999).



**Figure 1.1 :** Le concept d'ingénierie tissulaire. L'ingénierie tissulaire est basée sur le triptyque cellules/biomatériaux/facteurs biologiques dans le but de générer un tissu hybride. (Merceron *et al.*, 2008)

L'ingénierie tissulaire implique en général l'utilisation des "*scaffolds*", littéralement échafaudage en anglais, qui sont des architectures sophistiquées tridimensionnelles, formant des motifs précis. Un « *scaffold* » doit satisfaire aux critères suivants (Hutmacher, 2001): (1) il doit être hautement poreux avec des pores interconnectés et présentant une taille appropriée afin de favoriser l'intégration et la vascularisation du nouveau tissu, la diffusion des nutriments et l'évacuation des déchets, (2) il doit être construit à partir de matériaux biocompatibles et dont la biodégradabilité est contrôlée, (3) il doit favoriser l'adhésion, prolifération et la différenciation cellulaire, (4) il doit assurer à la fois le rôle de support mécanique lors de la transplantation et le rôle de trame temporaire mimant la matrice extracellulaire des cellules afin de guider la reconstruction tissulaire, (5) il ne doit pas induire une réponse inflammatoire, et (6) il doit être facilement modulable en forme et en taille. Les « *scaffolds* » peuvent être fabriqués à partir de matériaux inorganiques (Hench and Polak, 2002) comme le phosphate de calcium (LeGeros, 2002), utilisé dans la régénération des tissus minéralisés (le tissu osseux), ou de matériaux organiques comme les polymères naturels ou synthétiques (Drury and Mooney, 2003; Shin *et al.*, 2003). Parmi les polymères naturels utilisés dans l'ingénierie tissulaire, les hydrogels à base de biopolymères, comme l'alginate (Fig. 1.2) et le chitosan sont particulièrement attractifs. En effet, ils présentent une structure proche de celle des macromolécules composant les tissus humains (Falcone *et al.*, 2006; Lee and Mooney, 2001), une faible cytotoxicité, une bonne biocompatibilité et un coût relativement bas.



**Figure 1.2. :** Microphotographie réalisée par microscopie électronique à balayage d'une section verticale d'un gel d'alginate (scaffold). Site internet : <http://home.phys.ntnu.no>.

### I.1.3 Les hydrogels dans l'ingénierie tissulaire

Les hydrogels sont des polymères très hydratés, 30% de leur masse est constituée d'eau (Drury and Mooney, 2003). Leur principale caractéristique est leur capacité à gonfler en présence d'eau. Ils sont composés de chaînes polymériques hydrophiles pouvant être soit synthétiques soit naturelles. Les hydrogels synthétiques incluent : le poly(alcool vinylique) (PVA), Le poly(oxyéthylène) (PEO) et le poly(acide acrylique) (PAA). Les hydrogels naturels sont habituellement des biopolymères, tels que l'alginate, le collagène, la gélatine, la fibrine, la chitosan, l'agarose et l'acide hyaluronique (Lee and Mooney, 2001). Suivant la nature des pontages mis en jeu dans le réseau, il est possible de distinguer les hydrogels «chimiques» et les hydrogels «physiques» (Hoffman, 2001; Hoffman, 2002). Dans les hydrogels chimiques, des liaisons covalentes assurent la cohésion du gel et, l'équilibre de gonflement est, en grande partie, relié au taux de réticulation. Les hydrogels «physiques» présentent, quant à eux, des pontages ioniques, des interactions de type Van der Waals ou des interactions électrostatiques.

Les hydrogels doivent répondre aux critères cités précédemment pour être utilisés en tant que « *scaffold* » dans l'ingénierie tissulaire. De plus, le mécanisme de gélation doit être pris en compte. La réticulation à l'aide de contre-ions multivalents est une méthode simple pour obtenir des gels. Cependant, ces contre-ions peuvent s'échanger avec d'autres molécules ioniques dans un environnement aqueux, conduisant à une détérioration des propriétés initiales de l'hydrogel (LeRoux *et al.*, 1999). La formation de gel basée sur des liaisons covalente peut provoquer, quant

à elle, une cytotoxicité provenant de la molécule de réticulation mais également rendre le gel non biodégradable, aspect défavorable pour l'ingénierie tissulaire (Lee and Mooney, 2001).

## I.1.4 Hydrogel d'alginate

### I.1.4.1 Alginate de sodium

Les alginates représentent l'ensemble des polysaccharides appartenant à la famille des copolymères constitués des résidus de l'acide D-mannuronique et de l'acide L-guluronique, dans des proportions et des arrangements séquentiels différents. L'alginate de sodium est un polysaccharide linéaire, polyanionique, naturel, extrait des algues brunes (Fig. 1.3). Au niveau industriel, il est essentiellement issu de certaines espèces d'algues brunes : *Macrocystis pyrifera* aux Etats-Unis, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea* ou encore *Ascophyllum nodosum* en Europe. L'alginate est le polysaccharide le plus abondant de ces organismes, constituant plus de 40% de leur poids sec.



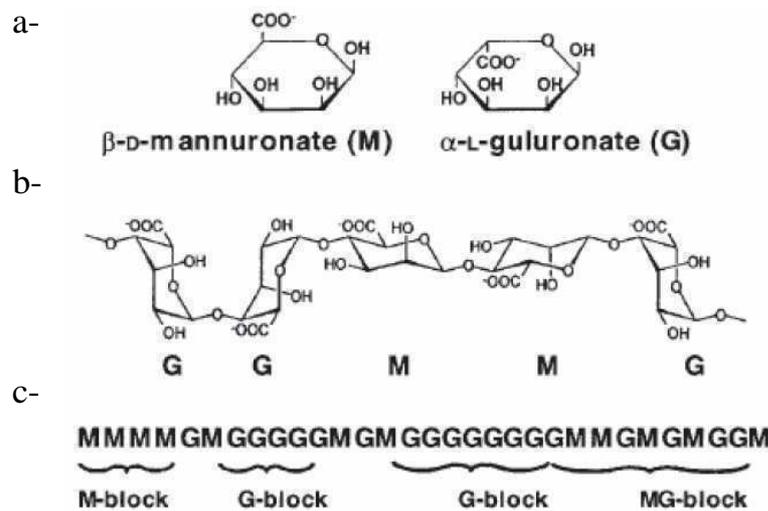
**Figure 1.3 :** De gauche à droite : *Macrocystis pyrifera* (a), *Laminaria hyperborea* (b) et *Laminaria digitaria* (c). (Illustrations : sites internet oceanlight, lebrusc, sb-roscoff)

Des bactéries telles que la bactérie aérobique fixatrice d'azote *Azotobacter vinelandii* et la bactérie pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* produisent également de l'alginate. Cependant, seules les bactéries *A. vinelandii* produisent des alginates présentant des structures de type copolymères en blocs. Généralement, le prix de l'alginate issu des algues brunes est inférieur à celui d'origine bactérienne mais la production du premier est soumise aux conditions climatiques et à la pollution, c'est pourquoi la commercialisation d'alginate bactérien issu d'*A. vinelandii* se développe (Saude *et al.*, 2002). Par ailleurs, certaines applications requièrent une parfaite maîtrise de la structure de la chaîne polymère, qui a été rendue possible par les récents progrès en génomique sur les bactéries *A. vinelandii* (Ertesvag and Valla, 1998).

L'alginate de sodium est utilisé comme gélifiant ou viscosifiant dans un large domaine d'applications industrielles. L'alginate est également utilisé dans l'industrie agroalimentaire. Il est fréquemment employé pour l'encapsulation des cellules ou des enzymes.

### I.1.4.2 Composition chimique de l'alginate

L'acide alginique est un polysaccharide constitué de deux unités acides uroniques (Haug and Larsen, 1962; Haug *et al.*, 1967; Martinsen *et al.*, 1989) : l'acide D-mannuronique (M) et son épimère en C5, l'acide L-guluronique (G) liés par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -(1-4) et  $\alpha$ -(1-4), selon un enchaînement régulier de trois types de blocs (Ertesvag and Valla, 1998) (Fig. 1.4 a) :



**Figure 1.4 :** a) monomères mannuronate M et guluronate G ; b) poly-guluronate GG et polymannuronate MM; c) exemple d'enchaînement des blocs GG, blocs MM ou blocs alternés MG dans une chaîne d'alginate (Draget *et al.*, 2002).

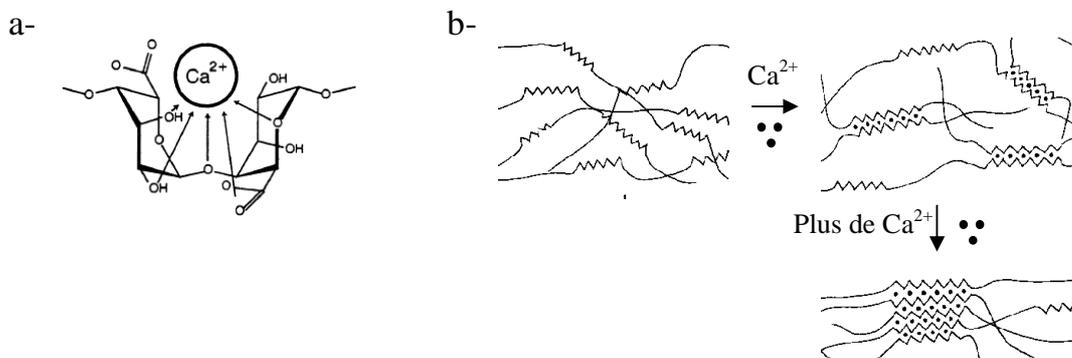
- des blocs homopolymères de résidus d'acide mannuronique, notés –M-M-M-
- des blocs homopolymères de résidus d'acide guluronique, notés –G-G-G-
- des blocs de résidus d'acides mannuronique et guluronique, notés –M-G-M-G-

Il a été montré que les propriétés physiques de l'alginate dépendent de la proportion relative des 3 types de bloc (Smidsrod *et al.*, 1973). La présence et la teneur en unités uroniques sont déterminées par l'origine des algues dont l'alginate est extrait (Saude *et al.*, 2002). Le ratio M/G peut être modifié par un traitement à l'épimérase (Haug and Larsen, 1971).

Comme le montre la figure 1.4 b et c, il existe des différences structurales importantes entre les différents types de blocs. Les blocs -M-G- sont les plus flexibles et les plus solubles pour des valeurs faibles comparés aux deux autres types de blocs (Smidsrod *et al.*, 1973).

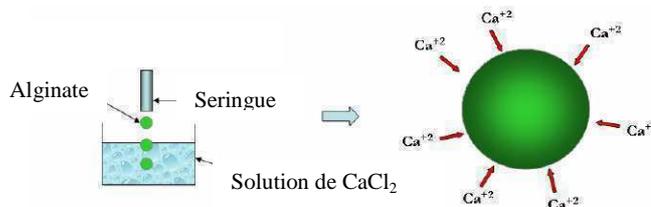
### I.1.4.3 Formation du gel d'alginate et ses propriétés physiques

L'alginate est un polysaccharide chargé négativement, ayant la capacité de former un hydrogel en présence de cations divalents ou trivalents. Cette méthode de gélification, dite ionotropique, met en jeu des interactions entre les charges des cations et les fonctions carboxylates portées par les monomères M ou G des chaînes d'alginate. Généralement, le sel de cation divalent le plus souvent utilisé pour la gélification de l'alginate est le chlorure de calcium qui est très soluble dans l'eau et qui offre une bonne disponibilité des ions calcium. Il a été montré que 90% des ions sodium contenus dans une solution d'alginate de sodium peuvent être facilement déplacés par des ions calcium (Seely and Hart, 1974). Cette gélification est induite par un processus dans lequel sont impliqués les blocs de résidus guluroniques (poly-G). Un réseau tridimensionnel se forme, du fait des enchaînements réguliers de type « egg-box » reliés entre eux par des segments poly-M ou poly-M-G- (Fig. 1.5) (Grant *et al.*, 1973). L'alginate se transforme alors en alginate de calcium qui gélifie.



**Figure 1-5 :** Représentation schématique de la formation d'egg-box. a) site de liaison des ions  $Ca^{2+}$  dans les monomères guluroniques (G) (Draget *et al.*, 2002). b) formation des « egg-boxes » au niveau des monomères guluroniques (G) en présence des ions calcium ( $Ca^{2+}$ ) ([www.fao.org](http://www.fao.org)).

Deux types de mécanismes de gélification sont possibles : la gélification par diffusion ou par dialyse et la gélification interne (Neiser *et al.*, 1999). Dans le cas de la gélification par diffusion, les ions calcium diffusent au sein de la solution d'alginate ou bien à travers une membrane à dialyse (cette dernière voie est notamment appliquée pour la mise en forme de gels de plus grande taille). La gélification par diffusion est utilisée pour l'obtention de billes (Fig. 1.6), fibres et films d'alginate, lorsque le gel est employé dans l'immobilisation cellulaire ou dans des applications liées à la restructuration des aliments. La gélification interne est, quant à elle, fréquemment employée dans l'industrie alimentaire. Dans ce cas, une forme inactive de l'ion calcium est mélangée à la solution d'alginate, ainsi qu'un agent retardateur. L'agent retardateur libère des ions  $H^+$  qui permettent d'activer le cation chélatant au sein même du mélange de polymère, d'où l'appellation gélification interne (Draget *et al.*, 1997).

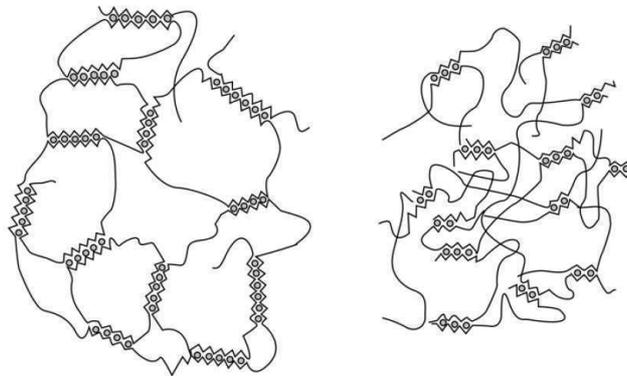


**Figure 1.6** : La formation des billes d'alginate par diffusion (Fundueanu *et al.*, 1999; Velings and Mestdagh, 1995): une solution de sel d'alginate est introduite goutte à goutte à l'aide d'une seringue dans une solution contenant le réticulant, ici le  $Ca^{2+}$ . La réaction rapide entre l'alginate et le réticulant à la surface permet de figer la forme sphérique de la goutte au sein de la solution. Le volume interne de la goutte gélifie par la suite au fur et à mesure de la diffusion du réticulant au travers de la surface de la bille en formation.

#### I.1.4.4 Propriétés physiques du gel d'alginate

Lorsque l'alginate est utilisé sous forme de gel, les paramètres physico-chimiques d'importance sont, bien évidemment, la rigidité du gel, mais également, la densité du réseau, les phénomènes de gonflement/rétrécissement. Les propriétés des gels d'alginate dépendent de la nature de l'ion divalent, du rapport M/G, de la masse moléculaire de l'alginate et sa concentration (Clark and Ross-Murphy, 1991; De Boisseson *et al.*, 2004; Martinsen *et al.*, 1989; Stabler *et al.*, 2001; Stokke *et al.*, 1991; Stokke *et al.*, 1993). Concernant l'influence du type d'ion divalent, l'affinité des alginates pour les différents ions est variable. Les ions peuvent être classés dans

l'ordre décroissant suivant leur affinité :  $Pb^{2+} = Cd^{2+} > Ba^{2+} > Ca^{2+} = Sr^{2+} \gg Mg^{2+}$  (Seely and Hart, 1974). L'influence de la composition de l'alginate a également été mise en évidence. En effet, Haug et Smidsrod ont montré en 1965 que l'affinité pour l'ion calcium varie avec les types d'alginate (Haug and Smidsrod, 1965). Les alginates riches en acide guluronique ont une affinité supérieure à ceux riches en acide mannuronique. Les blocs G-G sont caractérisés par la formation d'une liaison sélective et forte avec les ions calcium (Rokstad *et al.*, 2003). En revanche, les autres types de blocs ont une sélectivité moindre pour le calcium, et n'établissent pas de liaison forte avec cet ion (Smidsrød, 1974). Par ailleurs, les gels obtenus à partir d'alginate riche en résidus guluroniques présentent les propriétés rhéologiques les plus élevées et les vitesses de diffusion de solutés les plus grandes (Martinsen *et al.*, 1992). Une explication de ce comportement est que le taux important d'acide guluronique, avec de longs blocs poly-G et de courts segments élastiques est responsable de la formation d'un réseau ouvert, rigide et statique, par rapport à un réseau contenant un faible taux de résidus guluroniques, avec de longs segments élastiques et caractérisé par des enchevêtrements et une structure dynamique (Fig. 1.7).



**Figure 1.7 :** Modèles de structures proposées pour des réseaux de gels formés à partir d'alginate possédant des blocs d'acide guluronique de longueur différente : à gauche, taux de G élevé ; à droite, taux de M élevé. (Wong, 2004).

La « flexibilité » des polymères d'alginate en solution dépend de la nature de leur séquence et peuvent être classés dans l'ordre décroissant suivant :  $MG > MM > GG$  (Smidsrod *et al.*, 1973). Un gel contenant un taux élevé de G sera rigide et cassant, tandis qu'un gel contenant un faible taux de G sera plus élastique (Chapman and Chapman, 1970; Smidsrod *et al.*, 1972; Smidsrod and Painter, 1973). La stabilité du gel a été confirmée dans un intervalle de température allant de 0

à 100°C, et ce malgré la diminution du module de rigidité qui accompagne l'augmentation de la température (Gacesa, 1988). Les propriétés mécaniques du gel d'alginate peuvent être contrôlées en modifiant les facteurs physiques comme le taux de réticulation ionique, le type du cation bivalent, la polydispersité des chaînes polymériques et la modification chimique du polymère (Augst *et al.*, 2006). L'augmentation de la concentration du polymère, surtout dans le cas des masses molaires élevées, induit un gel plus rigide (LeRoux *et al.*, 1999). Les conditions de gélification peuvent également affecter les propriétés mécaniques. En effet, la température de gélification peut influencer le temps de gélification. Une basse température induit à une diminution de la diffusion des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , ce qui conduit à une gélification beaucoup plus lente et une structure tridimensionnelle plus ordonnée et par conséquent des propriétés mécaniques plus importantes (Drury *et al.*, 2004).

#### **I.1.4.5 Stabilité et dégradation du gel d'alginate**

Un gel d'alginate de calcium est insoluble dans l'eau pure (Sriamornsak and Kennedy, 2006). Cependant, la dissolution du gel est envisageable par déplacement des ions calcium à l'aide d'agents chélateurs comme l'EDTA (l'acide éthylène diamine tetra acétique), le lactate, le citrate et les phosphates ou encore par des concentrations très élevées de  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  (Sutherland, 1991). En effet, le départ de  $\text{Ca}^{2+}$  réduit la réticulation du gel qui devient instable. Les gels d'alginate peuvent également se dégrader et précipiter dans une solution tampon de phosphate à 0.1 M et complètement se dissoudre dans un tampon de citrate de sodium à 0.1 M à un pH= 7.8 (Kwok *et al.*, 1991). Cependant, il est possible de prévenir cette dégradation en conservant le gel de calcium dans un milieu contenant des ions  $\text{Ca}^{2+}$  libres, avec un ratio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  inférieur à 25/1, notamment dans le cas d'un taux élevé de G. Dans le cas inverse, un ratio de 3/1 est suffisant (Martinsen *et al.*, 1991). Il a également été montré que l'alginate peut être dégradé par une hydrolyse acide. Il s'agit d'une hydrolyse dépendante du temps, du pH et de la température (Haug and Larsen, 1962; Haug and Larsen, 1963; Haug *et al.*, 1963; Haug *et al.*, 1967). A des pH acide, les chaînes polymériques de l'alginate sont coupées ce qui conduit à une dégradation plus rapide du gel d'alginate (Gombotz and Wee, 1998).

Le gel d'alginate de calcium forme de forts complexes avec les polycations comme le chitosan, la polylysine et le polyéthylèneimine. La complexation a lieu entre les groupements amines des polycations et les groupements carboxylates de l'alginate. Ces complexes ne se

dissocient pas en présence des chélateurs de  $\text{Ca}^{2+}$ . Par conséquent, l'utilisation de ces polycations permet de mieux stabiliser le gel (Smidsrod *et al.*, 1973). Ainsi, des billes d'alginate ont été recouvertes d'une couche de poly(L-lysine) (PLL). La PLL déplace le calcium à la surface du gel, forme un complexe d'alginate/PLL plus stable et crée ainsi une membrane rigide semi-perméable (Lim and Sun, 1980). En effet, l'interaction ionique entre l'alginate et la PLL dépend de la composition chimique de l'alginate. Puisque les ions  $\text{Ca}^{2+}$  ont une affinité plus spécifique pour les blocs G, l'association ionique entre les alginates à forte teneur en acide mannuronique et la PLL est plus forte que celle des alginates riches en acide guluronique (Strand *et al.*, 2001; Vandenbossche *et al.*, 1993a; Vandenbossche *et al.*, 1993b). En 1996, Thu a montré que l'association ionique entre l'alginate et la PLL augmente avec la concentration en PLL et le temps de contact et varie en fonction du poids moléculaire de la PLL. Selon cette étude, le poids moléculaire idéal pour former une membrane stable serait de l'ordre de 18 KDa (Thu *et al.*, 1996).

#### **I.1.4.6 Applications de l'hydrogel d'alginate dans l'ingénierie tissulaire**

Les biomatériaux utilisés dans l'ingénierie tissulaire doivent répondre à différents critères dont la biocompatibilité et la biodégradabilité. Ils doivent également présenter un faible degré de cytotoxicité, une bonne stabilité mécanique et servir comme guide dans la régénération tissulaire tridimensionnelle. Le gel d'alginate, un hydrogel non toxique et qui présente une inertie immunologique, constitue un candidat potentiel comme « *scaffold* » dans le domaine de l'ingénierie tissulaire (Hara *et al.*, 2001). L'alginate est principalement utilisé comme vecteur de délivrance ou comme matrice de support dans l'encapsulation cellulaire (Shoichet *et al.*, 1996). La microencapsulation des cellules à l'aide de l'alginate représente actuellement une des approches les plus favorables dans les études menées chez l'animal mais également sur le plan des essais cliniques. En effet, l'immunoisolation et le maintien à long terme de la fonction de l'implant sont des fonctions bien remplies par cet hydrogel (Leinfelder *et al.*, 2003). Dans le domaine de l'encapsulation, plusieurs groupes ont montré qu'il est possible, via différentes techniques, de produire des billes d'alginate aux dimensions bien contrôlées (Sugiura *et al.*, 2005). L'utilisation de l'alginate, dans l'encapsulation des cellules, nécessite un gel pur et stérile. Les techniques de filtration sont utilisées pour atteindre ce but (Zimmermann *et al.*, 1992). La dégradation de l'alginate n'est pas assurée par une digestion cellulaire mais par la diffusion lente

des ions calcium hors du gel. Par la suite, les molécules d'alginate sont excrétées de l'organisme dans les urines (Novikov *et al.*, 2002). L'alginate a été largement utilisé dans la culture des chondrocytes, des hépatocytes et des cellules Schwann pour la régénération des nerfs (Dausse *et al.*, 2003; Dvir-Ginzberg *et al.*, 2003; Marijnissen *et al.*, 2000; Mosahebi *et al.*, 2002; Mosahebi *et al.*, 2003; Stevens *et al.*, 2004; van Osch *et al.*, 2001). Cependant, il présente l'inconvénient de ne pas interagir de façon spécifique avec les cellules. En effet, les cellules ne possèdent pas de récepteurs reconnaissant l'alginate, ce qui empêche leur adhésion (Augst *et al.*, 2006). Pour cela, l'alginate est modifié covalamment par des peptides impliqués dans l'adhésion cellulaire. La présence des groupements carboxylates permet d'envisager le greffage de ces peptides (Simmons *et al.*, 2004). Parmi ces derniers, nous pouvons citer la laminine, la fibronectine et le collagène (Dhoot *et al.*, 2004; Mosahebi *et al.*, 2003). Néanmoins, le couplage est difficile à contrôler et peut conduire à des interactions non spécifiques (Rowley *et al.*, 1999). Une variété de séquences courtes d'acides aminés ont été découvertes. Elles peuvent remplacer la molécule d'adhésion totale et intervenir dans l'accroissement de l'adhésion cellulaire. Ainsi, la séquence peptidique, arginine-glycine-acide aspartique (RGD), dérivée de la fibronectine, est largement caractérisée et utilisée (Augst *et al.*, 2006). Genes *et al.* ont ainsi modifié l'alginate en le fonctionnalisant à l'aide de sites RGD. Ils ont ainsi montré que l'adhésion et la morphologie des chondrocytes dépendent des propriétés mécaniques de l'hydrogel modifié (Genes *et al.*, 2004). Dans le cas des myoblastes cultivés sur ce gel, elles sont capables d'adhérer, de proliférer et de fusionner entre elles. D'autre part, la densité des sites RGD et la composition du gel (le ratio M/G par exemple) permettent de contrôler le phénotype des myoblastes (Rowley and Mooney, 2002).

Dans le but d'augmenter ses propriétés biologiques, l'alginate a été mélangé avec d'autres types de biomatériaux comme le chitosan (Becheran-Maron *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005). Le chitosan est un polysaccharide provenant de la chitine des crustacés (Welsh *et al.*, 2002). Du fait de son faible degré de cytotoxicité, sa biocompatibilité, sa structure proche des glycosaminoglycanes naturelles et sa dégradation par des enzymes comme la chitosanase et le lysozyme, il est très utilisé dans le domaine biomédical. Ainsi, Ribeiro *et al.* ont montré que les protéines encapsulées dans des billes d'alginate étaient plus stables et diffusaient de façon contrôlée lorsque ces billes étaient recouvertes d'une couche de chitosan (Ribeiro *et al.*, 2005). L'alginate peut également être mélangé à l'hydroxyapatite pour former un composite ostéoconducteur (Dos Santos *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 2004; Sotome *et al.*, 2004; Sugiyama *et*

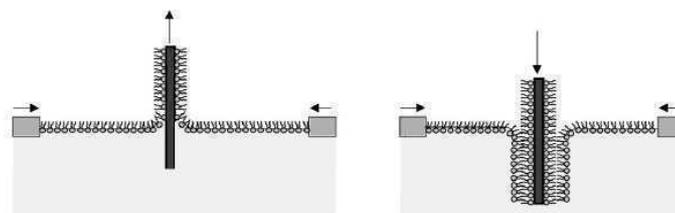
*al.*, 2004). Tampieri *et al.* ont réalisé des tests *in vitro* sur différents ratios hydroxyapatite/alginate et ont montré que lorsque les MG63, des ostéoblastes, sont cultivées sur ces composites, leur prolifération augmente ainsi que la conservation de leur phénotype (Tampieri *et al.*, 2005).

## I.2 Les films multicouches de polyélectrolytes

La surface d'un matériau est le lieu privilégié des interactions avec le milieu qui l'entoure. Ces interactions peuvent être contrôlées en modifiant les propriétés de surface (la charge ou encore la topographie...). Cet aspect est essentiel dans le domaine des biomatériaux où le challenge consiste à maîtriser les interactions cellule-matériau. Les films minces de type multicouches de polyélectrolytes constituent une nouvelle méthode de fonctionnalisation des biomatériaux et de modification de leurs surfaces. A travers ce chapitre, nous aborderons brièvement quelques aspects liés aux films multicouches et nous ferons le point sur l'état actuel des connaissances.

### I.2.1 Historique des films multicouches

Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, Irving Langmuir et Katherine Blodgett décrivent la possibilité d'obtenir des films minces nano-structurés. Ces films communément appelés films de « Langmuir-Blodgett » (LB) consistent à construire un film monocouche par le dépôt de molécules tensioactives ou amphiphiles, à une interface air/eau. Cette monocouche est ensuite transférée sur un support solide par trempage de celui-ci dans la sous-phase (Fig. 1.8) (Blodgett, 1934; Blodgett and Langmuir, 1937).



**Figure 1.8 :** Méthode de Langmuir-Blodgett. Adsorption d'une monocouche lipidique sur une surface solide par passage du matériau au travers d'une monocouche lipidique créée à une interface air-eau.

L'adsorption est basée sur des interactions de type hydrophile/hydrophobe. Comme l'illustre la figure 1.8, une lame immergée dans la cuve et dont la surface est hydrophobe peut être délicatement retirée, permettant le transfert de la monocouche. Une deuxième immersion de

la lame conduit à l'adsorption d'une seconde couche. La méthode peut être répétée plusieurs fois et des espèces différentes peuvent être utilisées à chaque étape de dépôt. L'épaisseur de ces films peut varier de quelques Angströms à plusieurs nanomètres. La méthode LB est principalement exploitée dans le but d'étudier les bicouches lipidiques, dont un des intérêts concerne la possibilité de mimer la paroi des cellules.

Cependant, cette méthode présente de nombreux inconvénients, notamment l'instabilité des films, les restrictions de la topographie liées au substrat, ainsi que des réactions parasites non contrôlées entre les solvants et les molécules contenues dans le film. De plus, d'un point de vue énergétique, après le dépôt de seulement quelques couches de tensio-actifs, la désorption devient plus favorable que l'adsorption.

Dans les années 1980, d'autres méthodes d'auto-assemblage ont été développées pour former des films organiques structurés. Ainsi, la chimie de coordination des systèmes métal/phosphonate (Guang *et al.*, 1992) et la chimie covalente (Netzer and Sagiv, 1983) ont constitué les premières alternatives à la technique LB. Ces méthodes sont cependant restreintes à certaines molécules et ne permettent pas d'obtenir des films de grande qualité. De plus, il est difficile d'obtenir des rendements de 100% avec les réactions chimiques ce qui limite les possibilités de conserver les densités de groupes fonctionnels d'une couche à l'autre. Un problème de reproductibilité dans les caractéristiques des films se pose également.

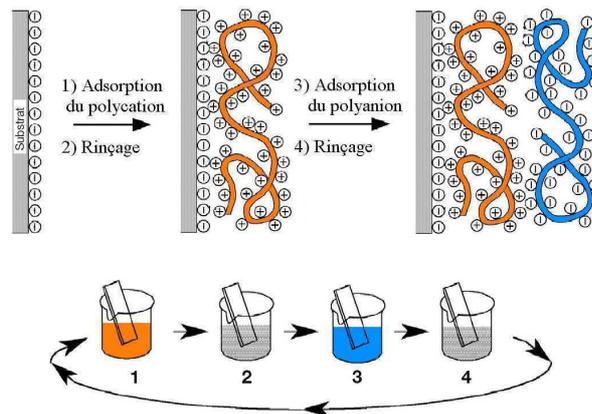
Un autre concept d'élaboration des films nano-structurés basé sur les interactions électrostatiques a été décrit dès 1966 par Iler (Iler, 1966). Cette approche simple a consisté à utiliser des particules colloïdales anioniques et cationiques interagissant via des forces électrostatiques pour créer des films multicouches. Cette idée est tombée dans l'oubli, sans doute à cause du manque de techniques expérimentales nécessaires pour caractériser ces assemblages. Par ailleurs, il était admis que le dépôt de substances de charges opposées s'arrêtait dès que les charges des espèces cationiques avaient exactement compensé celles des espèces anioniques ou l'inverse. Au début des années 80, des publications font état de travaux appliquant ce concept à l'adsorption de protéines (Fromherz, 1980; Gölander *et al.*, 1982) ou de colloïdes métalliques (Gaines Jr, 1983). Au début des années 1990, 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, 1997; Decher *et al.*, 1992; Decher and Schmitt, 1992). La technique "couche par couche" (LbL, layer-by-layer) appliquée aux polyélectrolytes conduit à la

formation de films appelés multicouches de polyélectrolytes, présentant une architecture nanostructurée.

## I.2.2 Construction des films multicouches de polyélectrolytes

### I.2.2.1 Principe du dépôt couche par couche

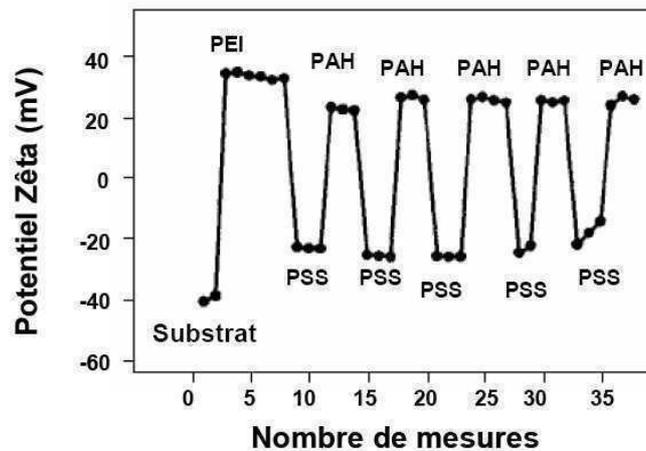
Différents types de molécules chargées peuvent être utilisées pour la réalisation des films multicouches (Bertrand *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 2005; Decher and Schlenoff, 2003; Kotov, 1999; Sukhishvili, 2005). Les polyélectrolytes sont les plus fréquemment utilisés pour la réalisation de ce type d'architecture. Le principe de la méthode de dépôt couche par couche, "Layer-by-Layer" (LbL) est décrit très schématiquement dans la figure 1.9.



**Figure 1.9 :** Schéma simplifié de la construction d'une multicouche de polyélectrolytes par adsorptions successives de polycations et de polyanions par répétition cyclique des deux étapes représentées (Decher, 1997).

Un substrat chargé négativement est d'abord mis au contact d'une solution de polyion de charge opposée (polycation) pendant un temps donné (5 à 20 min) (Advincula *et al.*, 1996; Hoogeveen *et al.*, 1996; Ramsden *et al.*, 1995). Les polycations s'adsorbent sur la surface et l'excès est éliminé par simple rinçage (Caruso *et al.*, 1998a; Lvov *et al.*, 1999). Après rinçage, la surface n'est pas neutre mais chargée positivement: il y a surcompensation de charge lors de l'adsorption (Caruso *et al.*, 1998b; Ladam *et al.*, 2000). Lorsque ce substrat est ensuite exposé à une seconde solution, contenant des polyanions, ceux-ci peuvent également interagir électrostatiquement et s'adsorber sur la surface. Cette adsorption est à nouveau suivie d'une étape

de rinçage à l'issue de laquelle la surface est chargée négativement en raison d'une surcompensation de charges négatives. La surcompensation de charge après chaque dépôt a été mise en évidence par des mesures du potentiel zêta (Fig. 1.10) (Caruso *et al.*, 1999; Hoogeveen *et al.*, 1996; Ladam *et al.*, 2000) et constitue la force motrice de la construction des films multicouches.



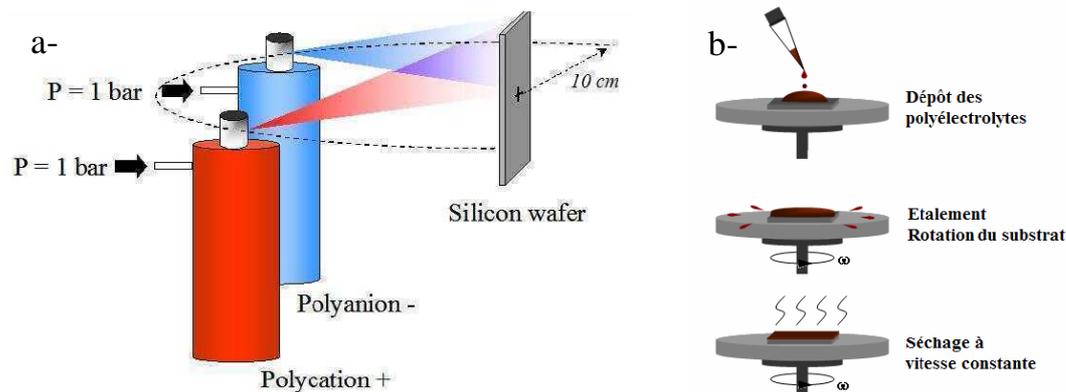
**Figure 1.10 :** Evolution du potentiel Zêta pendant la construction d'un film PEI-(PSS/PAH)<sub>n</sub> (Ladam *et al.*, 2000). PEI : poly(éthylène imine); PSS : poly(styrène sulfonate); PAH : poly(allylamine).

### I.2.2.2 Différentes méthodes de dépôts

Le trempage ou « dipping » a été pendant longtemps la technique classiquement utilisée pour le dépôt des films multicouches. Proposée par G. Decher *et al.* (Decher *et al.*, 1992), cette technique consiste à tremper le substrat alternativement dans les solutions de polycations et de polyanions. Les temps de dépôts généralement employés sont de l'ordre de 10 minutes.

D'autres procédés ont été développés, en particulier pour réduire les temps de construction. Les polyélectrolytes peuvent être déposés à l'aide d'un aérosol, c'est la méthode dite par « spray » (Fig. 1.11 a). Cette méthode permet de déposer très rapidement de manière alternée les polyélectrolytes sur un substrat. Ainsi, des films épais sont construits en peu de temps. Des mesures par spectroscopie infrarouge, par AFM (microscopie à force atomique) et par ellipsométrie ont montré que les films réalisés par nébulisation ou « spray » sont identiques aux films construits par trempage ou « dipping », par exemple les films

poly(diallyldiméthylammonium) (PDADMA)/ poly(styrène sulfonate) (PSS) (Schlenoff *et al.*, 2000), Cependant, une étude comparative (Izquierdo *et al.*, 2005) de ces deux méthodes de construction, a montré, sous certaines conditions que la nébulisation permet de réaliser des films poly(allylamine) PAH/PSS plus homogènes et moins rugueux par rapport au trempage. Plus récemment, Porcel *et al.* ont montré qu'il était possible de réaliser certains films par « spray » simultané (Porcel *et al.*, 2005), ce qui permet encore de réduire la durée de construction du film.



**Figure 1.11 :** a) Schéma représentant un dispositif de nébulisation pour la construction d'un film multicouche de polyelectrolytes (Porcel *et al.*, 2005). b) Schéma représentant la méthode de dépôt par "Spin-coating".

La troisième méthode est le procédé de dépôt par la méthode de la « tournette » ou « spin-coating » qui consiste à déposer une gouttelette de polyelectrolyte à la surface d'un substrat en rotation. Les polyelectrolytes sont dissous dans un solvant très volatile et sont étalés sur le substrat par la force centrifuge (Fig. 1.11 b). Cette méthode réduit également le temps de construction de manière importante (quelques secondes par dépôt), et permet de réaliser sans rinçage, un film ayant une stratification très régulière (Chiarelli *et al.*, 2001).

### 1.2.2.3 Nature du substrat

Les supports les plus souvent utilisés sont des surfaces planes ou des particules sphériques colloïdales dont la nature et les dimensions dépendent des applications envisagées et des techniques de caractérisation employées (Tableau 1.1). Pour de nombreux substrats organiques non chargés en surface, des interactions de type Van der Waals ou/et hydrophobe assurent l'adsorption de la première couche de polyelectrolytes sur ce support.

<i>Nature chimique du substrat</i>	<i>Surfaces planes</i>	<i>Particules sphériques</i>
<i>Minérale</i>	<i>Lame de verre (Decher, 1997)</i> <i>Quartz (Lvov et al., 1997)</i>	<i>Carbonate de calcium (Sukhorukov et al., 2004)</i>
<i>Métallique</i>	<i>Titane fritté (Vautier et al., 2003)</i> <i>Or (Caruso et al., 1997)</i> <i>Silicium (Dubas and Schlenoff, 2001a)</i>	<i>Nanobilles d'or (Schneider and Decher, 2004)</i>
<i>Organique</i>	<i>Polyéthylène (Green and Sadrameli, 2004)</i> <i>Téflon (Seo et al., 2008)</i> <i>Polyéthylène téréphtalate (Rinckenbach et al., 2008)</i>	<i>Microsphères de polyester (Muller et al., 2003)</i>

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

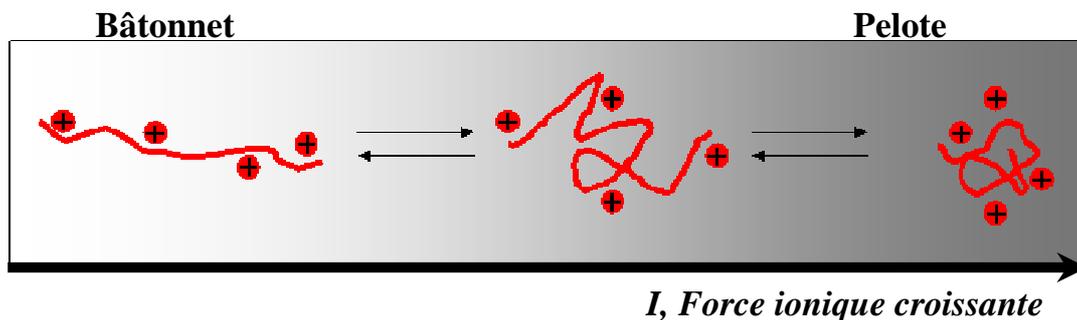
#### **I.2.2.4 Interactions mises en jeu lors de la construction du film**

Plusieurs types d'interactions peuvent être impliqués dans la construction des films multicouches : les interactions électrostatiques, les liaisons hydrophobes et les liaisons hydrogènes. La nature de ces interactions dépend du type de molécules adsorbées et définit les forces impliquées.

##### **I.2.2.4.1 Interactions électrostatiques**

Dans le cas des polyélectrolytes, la construction des films multicouches met principalement en jeu les forces électrostatiques entre les polyions. Les propriétés du film sont liées à la nature et à la conformation des chaînes des polyélectrolytes. La nature du polyélectrolyte dépend des groupements ioniques qu'il comporte et sa conformation est déterminée par la densité et la distribution de ces groupements ioniques le long de sa chaîne.

La conformation d'une chaîne de polyélectrolyte résulte d'un équilibre entre les forces électrostatiques de répulsion favorables à l'élongation (minimisation des interactions entre monomères) et les forces élastiques qui s'opposent aux précédentes (maximisation de l'entropie de configuration). La présence des charges le long de la chaîne change sa flexibilité. Le rôle des contre-ions dans la configuration d'une chaîne de polyélectrolyte est donc essentiel (Ariel and Andelman, 2003). En effet, la longueur de Debye est définie par la force ionique de la solution dans laquelle le polyélectrolyte a été dissous. Ainsi, plus la force ionique est importante, plus la longueur de Debye est faible, plus l'écrantage est efficace. La chaîne polymérique adopte alors une conformation en pelote. Au contraire, plus la force ionique est faible, plus l'écrantage est faible également et par conséquent confère à la chaîne polymérique une conformation en bâtonnets (Fig. 1.14). L'espace occupé par une pelote est plus important. Ainsi les épaisseurs déposées augmentent avec la force ionique des solutions. Ce phénomène a été observé pour des films de PAH/PSS. Une loi de puissance empirique a même été déterminée dans ce cas entre les quantités adsorbées et la concentration saline (Ladam *et al.*, 2000).



**Figure 1.12 :** Evolution de la conformation de la chaîne polymérique en fonction de la force ionique,  $I$ , cas présenté d'un polycation.

Des informations complémentaires sur le rôle des interactions électrostatiques ont été fournies grâce à l'utilisation de polyélectrolytes faibles tels que les polyacides et des polybases faibles. Pour de tels polyélectrolytes, la densité de charges le long de la chaîne est dépendante du pH. La densité de charge d'un polyacide faible augmente avec le pH, puisque ses groupements acides perdent progressivement un proton  $H^+$ . De même, les polybases faibles deviennent neutres avec l'augmentation du pH, puisque leurs groupements ioniques perdent un proton. Pour de tels systèmes, l'étude de l'influence de l'écrantage et de la densité de charge sur l'épaisseur et la stabilité des films est possible par simple variation de pH. Ainsi, il a été démontré (Mendelsohn

*et al.*, 2000; Shiratori and Rubner, 2000; Yoo *et al.*, 1998) que la modification des interactions électrostatiques par l'intermédiaire du pH, influençaient non seulement les épaisseurs déposées par cycle mais également la structure du film.

Les contre-ions des chaînes de polyélectrolytes jouent un rôle primordial dans les interactions électrostatiques. La réaction de complexation entre un polycation et un polyanion induit une libération de ces contre-ions, il s'agit d'un phénomène d'échange d'ions (Stuart *et al.*, 1994). De ce fait, la contribution entropique dans la construction des films est aussi importante (von Klitzing, 2006). Schlenoff *et al.* (Farhat and Schlenoff, 2001; Schlenoff and Dubas, 2001) ont ainsi défini précisément la nature de l'appariement des charges polyélectrolytiques au sein des films multicouches. Il s'agit de différencier les charges dans les films soit en charges intrinsèques (portées par les polyélectrolytes) ou extrinsèques (apportées par les contre-ions de la solution). Il est possible de décrire le lien se formant entre deux sites de polyélectrolytes de charge opposée  $Pol^+$  et  $Pol^-$  et le relargage connexe des contre-ions associés  $C^-$  et  $C^+$  par la réaction :



#### I.2.2.4.2 Liaisons hydrophobes

Les polyélectrolytes possèdent souvent des régions aliphatiques. Les forces hydrophobes contribuent donc parfois de manière considérable à leur conformation dans les films. Les travaux menés par Kotov ont montré que la contribution des interactions hydrophobes est indispensable lors du phénomène d'adsorption (Kotov, 1999). Les polyélectrolytes à caractère hydrophobe se présentent sous forme associée en solution et en se rapprochant de la surface chargée du substrat, ils se séparent pour s'y adsorber et former un film stable (Cochin and Laschewsky, 1999). Il est même possible dans certains cas d'utiliser une surface non-chargée, elle même hydrophobe, pour promouvoir l'adsorption (Delcorte *et al.*, 1996; Delcorte *et al.*, 1997).

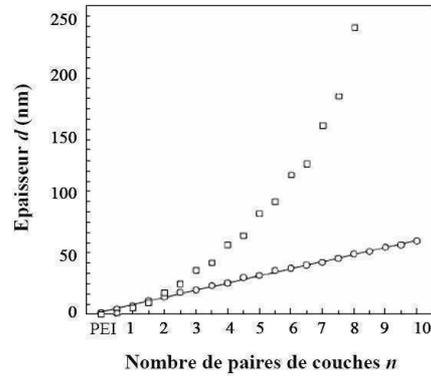
#### I.2.2.4.3 Liaisons hydrogènes

Dès 1997, l'équipe de Rubner a montré la possibilité de construire des films multicouches en alternant des polymères neutres interagissant par le biais de liaisons hydrogènes. Les premiers systèmes étudiés ont été obtenus en couplant la polyaniline à des polymères hydrosolubles tels que le poly(oxyéthylène) (PEO), la poly(acrylamide) (PAA) ou poly(N-vinylpyrrolidone)

(PVPON). A la même période, Wang *et al.* ont décrit la construction de films de type PAA/poly(4-vinyl-pyridine) à faible pH. Ils ont démontré que ces films multicouches sont basés sur des liaisons de type hydrogène. Ces liaisons étant très faibles et extrêmement sensibles au pH, il devient envisageable de construire le film à un pH tel que ces liaisons en assurent la stabilité (Wang *et al.*, 1997). En modifiant le pH, les ponts hydrogènes peuvent être rompus et entraîner la dissolution du film (Sukhishvili and Granick, 2002). Des films poly(vinyle pyrrolidone)/PAA construits à faible pH restent stables jusqu'à pH 6.9. Au-delà de ce pH, les films sont rapidement détruits. Cette destruction est corrélée à l'augmentation du taux d'ionisation des groupes carboxyliques au sein du film qui conduit à une répulsion entre les charges négatives du PAA dans le film. Le même résultat a été observé pour d'autres systèmes comme le poly(acide méthacrylique)/PAA. Pour augmenter la stabilité de ces films sur une large gamme de pH, des copolymères blocs constitués de PAA-poly(diméthylallylamonium) ont été utilisés (Kharlampieva and Sukhishvili, 2003). A faible pH la stabilité est assurée par les liaisons hydrogènes, puis par les interactions électrostatiques lorsque le pH augmente.

### **I.2.3 Propriétés physico-chimiques des films multicouches de polyélectrolytes**

La construction de films multicouches de polyélectrolytes peut être suivie à l'aide de différentes techniques : réflectométrie, microbalance à cristal de quartz, ellipsométrie, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, spectroscopie optique par guide d'onde. A partir des mesures réalisées avec ces différents appareillages, deux modes de croissance des films ont été mis en évidence : la croissance dite linéaire et la croissance dite exponentielle. La croissance est définie comme la variation de l'épaisseur ou de la masse déposée avec le nombre de couches adsorbées (Fig. 1.13).

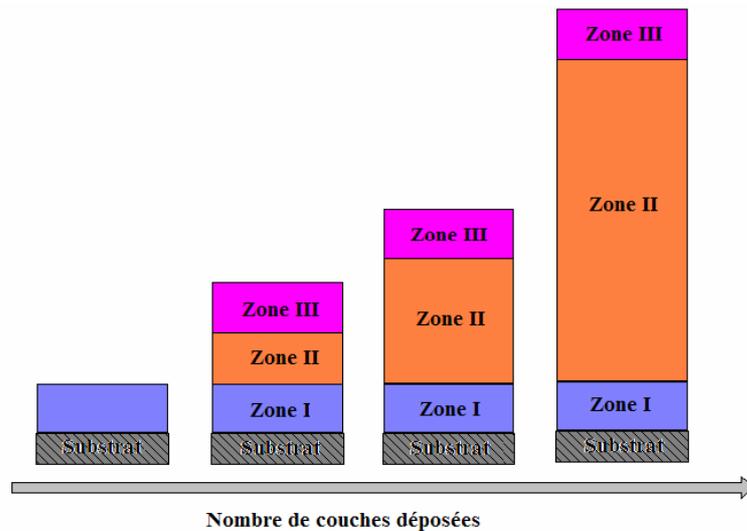


**Figure 1.13 :** Evolution de l'épaisseur  $d$  d'un film (□) PEI-( PLL/PGA)<sub>n</sub> et d'un film (O) PEI-( PAH/PSS)<sub>n</sub> en fonction du nombre de paires de couches  $n$  déposées suivie par spectroscopie optique par guide d'onde (Lavalle *et al.*, 2002). PEI : poly(éthylène imine), PGA : poly(acide L-glutamique), PLL : poly(L-lysine), PSS : poly(styrène sulfonate) et PAH : poly(allylamine).

### I.2.3.1 Mode de croissance linéaire : le modèle des trois zones

Un film multicouche est qualifié de linéaire lorsque son épaisseur ou sa masse croît proportionnellement avec le nombre de couches déposées. Il a été montré que lorsqu'un couple de polycation/polyanion possède une enthalpie de complexation négative (réaction exothermique), le film croît linéairement (Laugel *et al.*, 2006). Dans ce type de films, les polyélectrolytes de la solution n'interagissent qu'avec les polyélectrolytes de charge opposée constituant la surface externe du film (Decher, 1997) et ne peuvent pas diffuser vers l'intérieur du film. Le système PAH/PSS est l'exemple le plus largement étudié. Des analyses par réflectométrie des rayons X et réflectivité des neutrons, réalisées sur des films construits avec des polyélectrolytes deutérés, ont mis en évidence l'existence d'une structure stratifiée (Decher, 1997; Lösche *et al.*, 1998). En effet, les résultats ont montré que dans les films PAH/PSS, les couches de polyélectrolytes ne pénètrent que les couches adjacentes constituant ainsi une structure pseudo-stratifiée avec un désordre local baptisé « *fuzzy layers* » par Gero Decher (Decher, 1997). Ce qui confère au film une certaine homogénéité de structure et de distribution de charge (Decher *et al.*, 1994; Korneeva *et al.*, 1995; Schmitt *et al.*, 1993). De plus, il existe une stœchiométrie 1 : 1 entre les groupes anioniques et les groupes cationiques au sein de ces films à l'image des complexes obtenus en solution (Dautzenberg *et al.*, 1996).

Dans le but de décrire le mécanisme de croissance linéaire des films multicouches composés de deux polyélectrolytes simples (c'est-à-dire homo-polyélectrolyte cationique et anionique), un modèle simple a été proposé par Ladam *et al.* (Ladam *et al.*, 2000). Ce modèle consiste à séparer le film multicouches en trois zones différentes, la zone I à l'interface substrat/film et son voisinage, la zone III à l'interface film/solution et son voisinage et la zone II séparant les deux autres (Fig. 1.14).



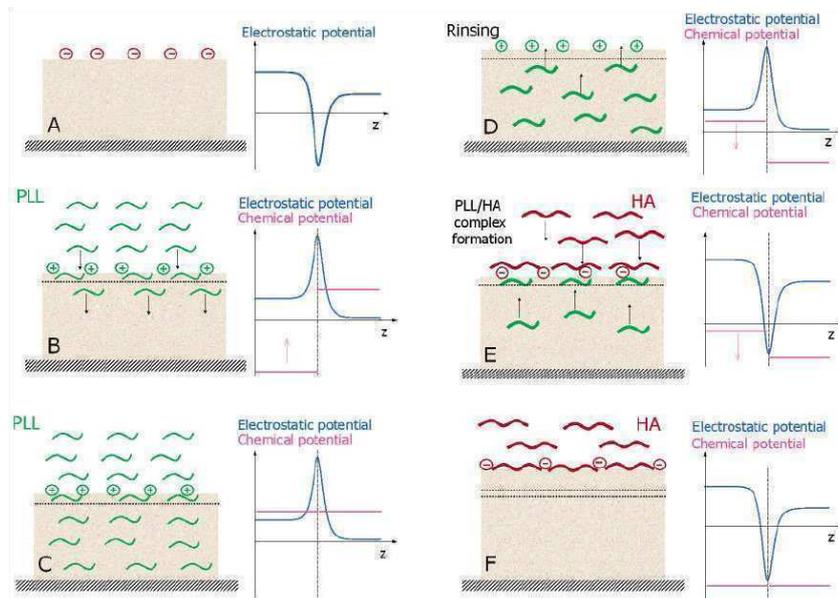
**Figure 1.14 :** Représentation de l'évolution des trois zones au cours de la construction d'une multicouche (Decher and Schlenoff, 2003). La construction de la multicouche par addition de couches de polyélectrolytes est représentée de gauche à droite. Lorsque les trois zones sont formées, seule la zone II s'étend par addition de couches (Ladam *et al.*, 2000).

La zone I dite « zone précurseur » et la zone III dite « zone externe » sont composées d'une ou plusieurs couches de polyélectrolytes, respectivement proches du substrat et proches de la surface du film. Elles sont fortement influencées, par le substrat pour la zone I et par la solution ou l'air pour la zone III. Cependant, la zone intermédiaire (zone II) représente la majeure partie du film et n'est pas influencée par les interfaces. Les frontières entre les zones I et II et les zones II et III sont diffuses. Le nombre précis de couches composant les zones I et III n'est pas connu, mais il dépend vraisemblablement du substrat, de la structure chimique des polyélectrolytes utilisés, ainsi que des conditions d'adsorption. Le modèle des trois zones n'est valable qu'à partir d'un nombre suffisant de couches déposées sur le substrat. Au cours de la construction, une situation transitoire apparaît probablement et où les zones I et III n'ont pas atteint leurs épaisseurs

finales et où la zone II n'existe pas. Et à la suite de cette situation transitoire, les zones I et III conservent leurs épaisseurs et structures respectives, tandis que la zone II augmente en épaisseur. En effet, lorsqu'une nouvelle couche est adsorbée au sommet de la zone III, la couche la plus proche de l'interface (diffuse) entre la zone II et III s'éloigne de l'interface film/solution et n'est plus influencée par la solution : cette couche passe alors de la zone II à la zone III (Fig. 1.14).

### **I.2.3.2 Mode de croissance exponentielle et transition croissance exponentielle/ linéaire**

Il existe une deuxième catégorie de films multicouches dont la croissance est exponentielle avec le nombre de couches déposées. Ces films furent découverts à la fin des années 1990 avec l'utilisation des systèmes à bases de polypeptides et de polysaccharides, par exemple, les systèmes (poly(L-lysine)/Alginate (PLL/Alg) (Elbert *et al.*, 1999), PLL/poly(acide-L-glutamique) (PGA) (Lavalle *et al.*, 2002) et PLL/acide hyaluronique (HA) (Picart *et al.*, 2001). Des expériences de calorimétrie isotherme à titration (ITC) ont montré, qu'un processus de complexation polyanion/polycation endothermique conduit à des films ayant une croissance exponentielle du film multicouches (Laugel *et al.*, 2006). De tels films possèdent des caractéristiques physicochimiques proches de celles d'un hydrogel, notamment en raison de leur forte teneur en eau (Collin *et al.*, 2004; Richert *et al.*, 2004b). L'épaisseur de ces films peut atteindre un à plusieurs micromètres après le dépôt d'une vingtaine de paires de couches. De telles épaisseurs permettent d'utiliser la technique de microscopie confocale à balayage laser pour visualiser la section verticale des films après insertion d'un polyélectrolyte fluorescent lors de l'élaboration du film. Comparativement, un film de type PAH/PSS à croissance linéaire a une épaisseur de l'ordre d'une dizaine de nanomètres pour 15 paires de couches dans les mêmes conditions de pH et de force ionique. Le mécanisme conduisant à une croissance exponentielle est totalement différent de celui qui conduit à des films à une croissance linéaire. Ainsi, la croissance exponentielle a pu être expliquée par un phénomène de diffusion d'au moins un des polyélectrolytes au sein de toute la section du film (Picart *et al.*, 2002). Le mécanisme de construction associé à la diffusion a été décrit par Lavalle *et al.* (Lavalle *et al.*, 2004) et est schématisé sur la figure 1.15 dans le cas du système PLL/HA.



**Figure 1.15 :** Mécanisme de construction d'un film multicouche à base de poly(L-lysine) (PLL) et d'acide hyaluronique (HA) qui suit un régime de croissance exponentielle. (Richert *et al.*, 2004c).

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

En première approximation, cette quantité est proportionnelle à l'épaisseur du film, ce qui conduit à une croissance de type *exponentiel*.

Depuis quelques années, des travaux ont montré une transition de croissance du régime exponentiel vers un régime linéaire. Hübsh *et al.* ont été les premiers à observer ce phénomène de transition (Hubsch *et al.*, 2004). Les auteurs de ce travail ont étudié la croissance d'un film multicouche basé sur un polycation, le PAH, et un mélange binaire de polyanions, le PGA et le PSS. Ces polyanions ont été choisis car l'un, le PGA induit une croissance exponentielle avec le PAH et l'autre, le PSS induit une croissance linéaire avec le PAH. D'autres expériences plus approfondies ont également décrit cette transition dans le cas du système PLL/HA. Dans ce dernier cas, la transition a été systématiquement observée après 12 bicouches déposées et lorsque l'épaisseur des films se situe entre 150 et 200 nm à sec, quel que soit le procédé de construction (nébulisation ou trempage) (Porcel *et al.*, 2006). Ce phénomène de transition s'établirait quand le film atteint une épaisseur critique pour laquelle les polyélectrolytes libres ne diffusent plus à l'intérieur et à l'extérieur du film. Il y aurait une restructuration de la multicouche, au fur et à mesure de la construction, conduisant à une densification du film qui, par conséquent, empêcherait la diffusion des polyélectrolytes libres. Après le dépôt d'un grand nombre de couches, une structure comportant les 3 zones du modèle linéaire serait obtenue. La zone II représenterait alors une zone de restructuration où les molécules libres ne diffuseraient plus et la zone III correspondrait à la zone de diffusion (Salomaki *et al.*, 2005).

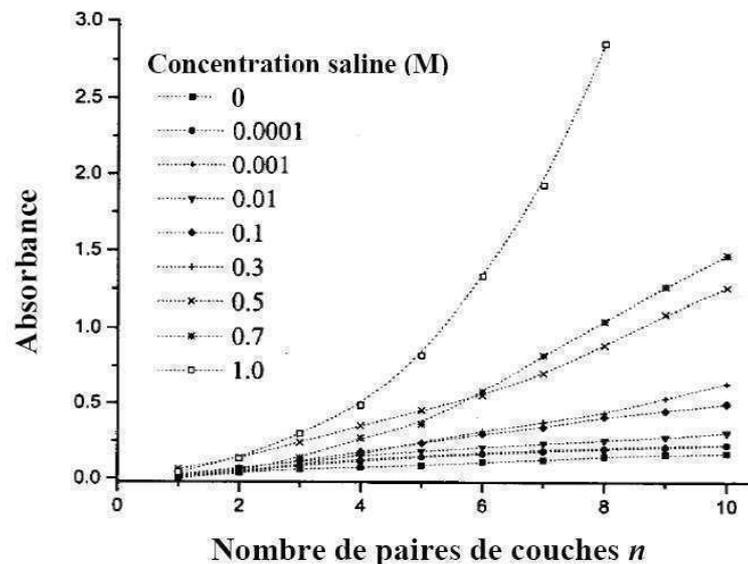
### **I.2.3.3 Paramètres influençant le mode de croissance des films multicouches**

A la lumière des résultats dans le domaine des films multicouches de polyélectrolytes, il a été montré qu'un même couple de polyélectrolytes pouvait former des films à croissance soit exponentielle soit linéaire, selon les paramètres de construction, tels que le pH, la force ionique, la température et le type de contre-ion utilisé.

#### **I.2.3.3.1 Influence de la force ionique**

La force ionique a un effet très important sur le mode de croissance des films multicouches de polyélectrolytes. En général, l'augmentation de la concentration en sel conduit à des films plus épais (Decher and Schmitt, 1992; Ladam *et al.*, 2000; Lvov *et al.*, 1993). Cela provient de la forte

dépendance de la conformation des polyélectrolytes en solution vis-à-vis de la force ionique : à faible concentration saline, les chaînes de polyélectrolyte présentent une grande longueur de persistance en raison des répulsions entre ses propres charges, alors qu'à forte concentration saline, l'écrantage de ses charges lui confère une conformation plus repliée. Cette propriété reste en particulier valable lors de la construction des multicouches, expliquant leur plus grande épaisseur lorsqu'elles sont construites à une force ionique élevée. L'épaisseur des films PDADMA/PSS illustrent particulièrement bien l'influence de la force ionique. Certains auteurs ont ainsi observé par microscopie à force atomique une différence significative de morphologie, d'épaisseur, et de rugosité pour des films PDADMA/PSS à différents taux de sel. La croissance de tels films passe notamment d'une croissance linéaire, à une croissance qualifiée de *super linéaire* jusqu'à atteindre une croissance réellement exponentielle sous l'augmentation de la force ionique (McAloney *et al.*, 2001) (Fig. 1.16).



**Figure 1.16 :** Evolutions de l'absorbance à  $\lambda = 217$  nm (maximum d'absorption de PSS) par spectrophotométrie UV/visible lors de la construction d'un film (PDADAMA/PSS)<sub>n</sub> pour différentes concentrations molaires en NaCl (McAloney *et al.*, 2001).

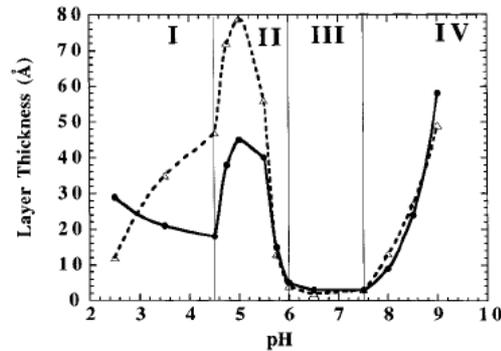
Richert *et al.* ont également montré l'influence du taux de sel pour le système (chitosan : (CHI)/HA)<sub>n</sub> (Richert *et al.*, 2004c). Les auteurs ont observé qu'à pH 7.4, ces films croissent exponentiellement en présence de 0.15 M de NaCl et linéairement en présence de  $10^{-4}$  M de NaCl. Une précédente étude sur le système PAH/PSS (Ladam *et al.*, 2000) a permis de mettre en

évidence une loi empirique (loi de puissance) reliant la quantité adsorbée en polyélectrolytes et la concentration en sel de la solution: plus la concentration en sel est importante, plus la masse déposée par bicouche est grande.

#### I.2.3.3.2 Influence de la densité de charge des polyélectrolytes

Le processus de construction des films multicouches est essentiellement gouverné par les interactions électrostatiques entre les charges opposées (Bertrand *et al.*, 2000; Steitz *et al.*, 2001; Voigt *et al.*, 2003a; Voigt *et al.*, 2003b). De ce fait, il est fortement dépendant de la densité de charge des polyélectrolytes. L'influence de la densité de charge a fait l'objet de plusieurs études. Ce paramètre a été d'abord étudié pour des films multicouches à base de polyélectrolytes faibles dont le degré d'ionisation dépend du pH. Le changement de pH influence le degré d'ionisation et donc la densité de charge, par conséquent la conformation des chaînes polymériques en solution est modifiée. Cet effet est similaire à celui induit par la variation de la force ionique. Shiratori et Rubner (Shiratori and Rubner, 2000) ont montré que pour le système PAH/PAA, la variation de pH fait varier l'incrément de l'épaisseur à chaque dépôt de polyélectrolyte. A pH=7, les chaînes polymériques sont très ionisées et présentent une conformation allongée du fait de la forte répulsion conduisant à des films moins épais (Fig. 1.17). De plus, il a été montré qu'il est possible de modifier la composition même de ce film, la mouillabilité de sa surface (Yoo *et al.*, 1998) et sa rugosité (Shiratori and Rubner, 2000) par simple variation du pH. Cependant, la densité de charge des polyélectrolytes faibles est difficile à contrôler. En effet, le degré d'ionisation est dépendant de la concentration locale en protons qui peut varier suivant la distance par rapport au substrat. De plus, le pKa apparent des polyacides diffère selon que les polyélectrolytes sont présents en solution ou adsorbés (Bohmer *et al.*, 1990). La diminution du pKa apparent a pour conséquence d'accroître le degré d'ionisation afin de neutraliser au mieux la surface du substrat hautement chargé (Blaakmeer *et al.*, 1990). Cet effet complique la compréhension de l'influence de la densité de charge dans le processus de l'assemblage électrostatique. Pour cela, les polyélectrolytes forts, dont la charge ne dépend pas du pH, semble être plus facile à interpréter. Dans ce cas, la densité de charge des polyélectrolytes est modifiée chimiquement. Ainsi pour le système PDADMA/PSS, le polycation PDADMA a été modifié par copolymérisation statistique avec un monomère neutre. L'étude de ce système par réflectivité au rayon X, montre que la formation d'un film stable nécessite une densité de charge entre 50 % et

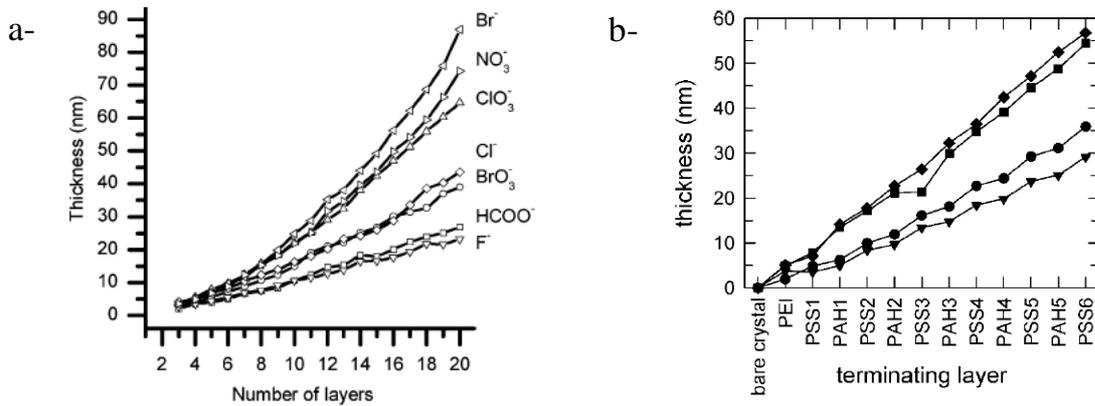
75 % (Steitz *et al.*, 2001) avec une épaisseur et une rugosité du film maximales avec 75 % de charge (Voigt *et al.*, 2003a).



**Figure 1.17** : Epaisseur d'une couche de PAH (pointillés) ou de PAA (ligne continue) en fonction du pH des solutions (Shiratori and Rubner, 2000).

#### I.2.3.3.3 Influence du contre-ion

Les contre-ions jouent un rôle important dans la croissance des films multicouches. Habituellement, les ions sont choisis suivant la série de Hofmeister (Hofmeister, 1888; Hofmeister, 1890), classés en fonction de leur capacité à précipiter les protéines (Cacace *et al.*, 1997). Leontidis a résumé les propriétés des ions de cette série en fonction de leur polarité, leur champ électrique et leur entropie d'hydratation. Les ions cosmotropes présentent une faible polarité, un fort champ électrique et une grande sphère d'eau d'hydratation contrairement aux ions chaotropes. En général, l'effet Hofmeister des anions est plus important que celui des cations (Leontidis, 2002). L'épaisseur des films multicouches construits dans différents types de sels augmentent dans l'ordre suivant :  $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+$  et  $\text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^-$  (Fig. 1.18) (Dubas and Schlenoff, 1999; Salomaki *et al.*, 2004). Ces résultats montrent que plus la sphère d'eau d'hydratation est petite plus l'interaction entre les ions et les polyélectrolytes est grande. Dans le cas d'un contre-ion très faiblement hydraté, l'écrantage des charges est assez efficace pour réduire les répulsions intra-chaînes polymériques qui adoptent donc une conformation en pelote. Cette conformation conduit à l'augmentation de l'épaisseur et de la rugosité du film. Cet effet est semblable à l'augmentation de la force ionique ou à la diminution de la densité de charge.

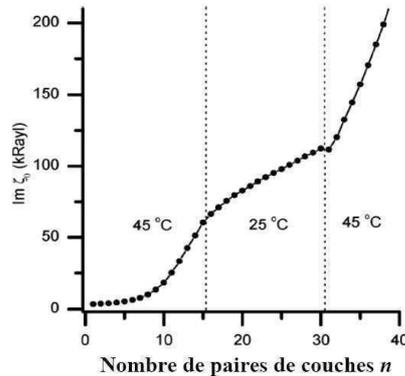


**Figure 1.18 :** a) Epaisseur du film PDADMA/ PSS mesurée par ellipsométrie. Film PDADMA/ PSS construit dans différents sels de sodium à 0.1 M (Salomaki *et al.*, 2004). b) Epaisseur du film PAH/PSS suivie par QCM-D (El Haitami *et al.*, 2009). Sur le graphique, sont représentés les anions des sels utilisés.

De plus, Salomaki *et al.* ont montré que le régime de croissance des films multicouches PDADMA/PSS passe de linéaire à exponentielle en passant d'un contre-ion cosmotrope à un contre-ion chaotrope. Une étude comparable a été réalisée sur le système PAH/PSS. Ce film multicouche est deux fois plus épais pour des contre-ions chaotropes que cosmotropes. Dans les deux cas, la croissance linéaire du film est conservée (El Haitami *et al.*, 2009).

#### I.2.3.3.4 Influence de la température

L'influence de la température sur la croissance des films multicouches de polyélectrolytes a également été étudiée. Les travaux de Büscher *et al.* (Büscher *et al.*, 2002), ont montré que l'épaisseur du film multicouches PAH/PSS augmente avec la température imposée durant la construction. Cette tendance a été confirmée pour le système PDADMA/PSS où l'épaisseur augmente approximativement de manière linéaire en fonction de la température dans un intervalle de 10°C à 70°C. Le mécanisme proposé pour expliquer ce phénomène est similaire à celui décrit pour la force ionique. A température élevée, les polyélectrolytes adopteraient une conformation en pelote, ce qui explique l'augmentation de l'épaisseur et de la rugosité du film. L'effet de la température est dépendant du type de polyélectrolytes utilisés (Tan *et al.*, 2003). Plus récemment, Salomäki *et al.* ont montré que le changement de la température au cours de la construction du film PDADMA/ PSS induit un changement de régime de croissance.



**Figure 1.19 :** Evolution de la croissance d'un film (PDADMA/PSS)<sub>n</sub> suivie par microbalance à cristal de quartz en fonction de la température des solutions de polyélectrolytes. Le graphique représente l'évolution de la partie imaginaire de l'onde acoustique, représentative de l'incrément de masse de polyélectrolytes après le dépôt de chaque nouvelle paire de couche n (Salomaki *et al.*, 2005).

En effet, à 45°C ce film présente une croissance exponentielle avec le nombre de couches déposées mais lorsque la température est descendue à 25°C, le régime devient linéaire. Si la température repasse à 45°C, le régime redevient exponentiel (Fig. 1.19) (Salomaki *et al.*, 2005). D'autres facteurs, non détaillés ici, influencent la croissance des films multicouches à savoir entre autres : la concentration des polyélectrolytes, leur masse moléculaire (Porcel *et al.*, 2007) ainsi que leur temps de dépôt (Dubas and Schlenoff, 1999).

#### I.2.3.4 Mobilité des polyélectrolytes dans les films multicouches

Au sein des films multicouches, les chaînes de polymères ne sont pas figées par l'attraction électrostatique mais présentent un certain degré de mobilité qui dépend de la nature de l'assemblage (le type de polyelectrolyte et les conditions de préparations des films). De nombreux travaux ont rapporté des mesures de coefficients de diffusion des chaînes de polyélectrolytes dans les films à croissance linéaire et exponentielle. La mobilité latérale peut être mesurée par recouvrement de la fluorescence après photoblanchiment (FRAPP : Fluorescence Recovery After Pattern Photobleaching) (Jourdainne *et al.*, 2008; Picart *et al.*, 2005b). La dynamique moléculaire des chaînes de polyélectrolytes résulte notamment de la compétition énergétique entre les interactions électrostatiques et l'agitation thermique.

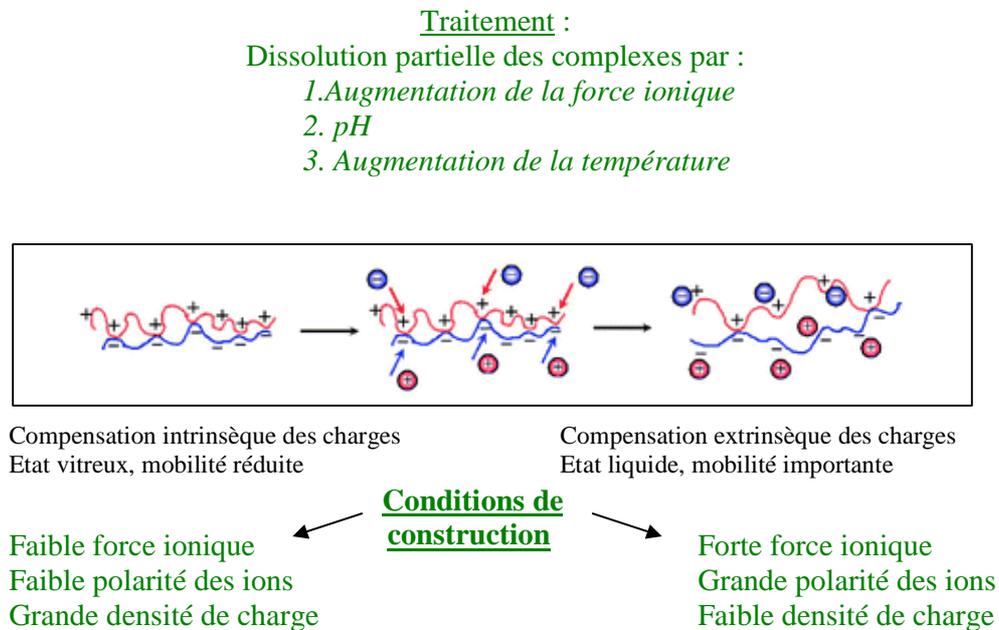
Laugel *et al.* ont mis en évidence une relation entre le mode de croissance des films multicouches de polyélectrolytes et l'enthalpie de complexation relative à la formation des

complexes polycation/polyanion. Ainsi, des films à croissance linéaire, comme PAH/PSS, présentent un processus de complexation fortement exothermique traduisant une forte attraction électrostatique entre les chaînes polymériques. Le coefficient de diffusion pour ce film a été estimé à moins de  $10^{-14} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (von Klitzing, 2006) indiquant son état vitreux et une très faible mobilité de ses chaînes. En général, les polyélectrolytes synthétiques, dans les films multicouches, présentent un coefficient de diffusion très faible (Dubas and Schlenoff, 2001b; von Klitzing, 2006). Le coefficient de diffusion peut également varier dans les différentes zones, au sein du film multicouches, définies par Ladam *et al.* (Ladam *et al.*, 2000). En effet, pour le film multicouches PDADMA/PSS, la mobilité des chaînes de polyélectrolytes est plus importante près de l'interface film/solution qu'à l'intérieur même du film (Nazaran *et al.*, 2007), ce qui confirme que les couches les plus externes (Zone III) sont moins denses.

Les films à croissance exponentielle sont souvent obtenus avec des polyélectrolytes naturels comme les polypeptides et les polysaccharides. Ces films se caractérisent par un processus de complexation endothermique, conséquence d'une faible attraction électrostatique (Laugel *et al.*, 2006), et un coefficient de diffusion plus élevé. Par exemple, pour le film PLL/HA, le coefficient de diffusion a été estimé à des valeurs comprises entre  $10^{-8}$  et  $10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (Picart *et al.*, 2005b; Richert *et al.*, 2004a). Une étude très récente par FRAPP a montré qu'après le dépôt de la solution de polycations sur le film PLL/HA, celui-ci contient trois populations de PLL<sup>FITC</sup> (PLL greffée à l'isothiocyanate de fluorescéine) associées à des coefficients de diffusion différents. La première population a un coefficient de diffusion très faible et correspondrait selon les auteurs à des chaînes de PLL<sup>FITC</sup> fortement liées aux chaînes de HA de la surface du film. Ces chaînes de PLL<sup>FITC</sup> sont considérées immobiles. La fraction mobile lente et la fraction mobile rapide des chaînes de PLL<sup>FITC</sup> forment les deux autres populations (Jourdainne *et al.*, 2008).

Différents facteurs influent sur la mobilité des chaînes dans un film multicouches de polyélectrolytes. Ainsi, la diffusion inter-chaînes entre les couches d'un film pseudo-stratifié PDADMA/PSS sous l'effet de la force ionique a été mise en évidence par réflectivité des neutrons (Jomaa and Schlenoff, 2005). La force ionique permet notamment de contrôler le degré d'association entre les chaînes de polyélectrolytes. En effet, plus le taux de sel est important et plus les contre-ions ont tendance à écranter les charges des chaînes de polyélectrolytes. La force des interactions électrostatiques entre les polycations et les polyanions sont réduites et par conséquent la mobilité des chaînes de polyélectrolytes est augmentée. Le contrôle de la densité de

charge des polyélectrolytes et du type du contre ion peuvent conduire à des systèmes plus ou moins mobiles (Fig. 1.20) (von Klitzing, 2006).



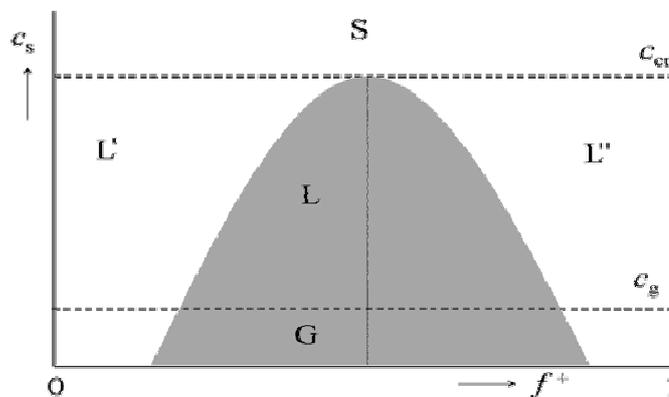
**Figure 1.20** : Résumé des différents paramètres influant sur la mobilité des chaînes dans les films multicouches de polyélectrolytes. Les signes (-) et (+) représentent les polyélectrolytes chargés. Les cercles avec les signes (-) et (+) représentent les contre-ions provenant des polyélectrolytes ou d'un ajout de sel (von Klitzing, 2006).

### I.2.3.5 Les Complexes de polyélectrolytes : solution versus films multicouches

Les interactions entre des polyélectrolytes de charges opposées conduisent à la formation de complexes (PECs : polyelectrolytes complexes). Du fait de leurs nombreuses applications potentielles, les PECs présentent un intérêt considérable (Kabanov, 1994a; Philipp *et al.*, 1989; Tsuchida and Abe, 1982). Les PECs peuvent prendre la forme de films multicouches (Decher, 1997), de complexes solubles (Kabanov, 1994a; Tsuchida and Abe, 1982), de précipités solides (Michaels and Miekka, 1961) ou de coacervats liquides (Burke *et al.*, 2007). La nature des interactions mises en jeu et les propriétés des PECs dépendent de plusieurs paramètres : le ratio des charges, la force ionique, le pH, la température, la concentration des polymères, la densité de charge et la structure des polymères (Hubbe *et al.*, 2005; Kabanov, 1994a; Philipp *et al.*, 1989; Sukhishvili *et al.*, 2006; Tsuchida and Abe, 1982). Le recouvrement d'une surface à l'aide des PECs peut être obtenu par la méthode d'assemblage couche par couche introduite par Decher

(Decher, 1997). Cette méthode implique l'adsorption séquentielle des polyanions et des polycations sur une surface chargée et permet un excellent contrôle de l'épaisseur et de la composition de l'architecture (Sukhishvili, 2005; Sukhishvili *et al.*, 2006). Cependant, d'un point de vue thermodynamique, la construction des films multicouches est en contradiction avec les connaissances dans le domaine de la complexation des polyelectrolytes en solution (Izumrudov *et al.*, 2004; Kabanov, 1994b). En effet, durant les cycles d'adsorption, les films multicouches sont exposés à un large excès de polyélectrolytes, dont la charge est opposée à celle de la couche la plus externe du film. Ces conditions sont donc plus favorables, du point de vue entropique, à la formation de PECs solubles en solution. Les études menées sur les PECs en solution ont montré que la force ionique et le ratio des charges (calculé comme le ratio des concentrations en unité monomère du polycation sur celui du polyanion) sont des paramètres critiques dans le diagramme de phase du système (Kabanov, 1994b). Dans la majorité des systèmes étudiés, les PECs solubles en solution se forment en présence d'un large excès de charge. Lorsque cet excès de charge est réduit, une séparation de phase se produit et se manifeste par un phénomène de précipitation. Il est donc possible de s'attendre, sur la base des arguments thermodynamique, à une inhibition de la croissance des films multicouches dans le cas où les conditions seraient plus favorables à la formation de PECs solubles. La désorption de polyélectrolytes adsorbés sur les films multicouches lors des cycles de dépôts, inhibant la croissance en épaisseur des films, a été déjà décrite (Hoogeveen *et al.*, 1996; Kovacevic *et al.*, 2003; Sui *et al.*, 2003). Par conséquent et suivant les conditions de construction, le processus de dépôt des couches peut être soit favorable à l'adsorption ou à la désorption (Dubas and Schlenoff, 2001a). Dans le but de pouvoir prédire et contrôler la transition entre une croissance stable des films multicouches et la désorption des polyélectrolytes, plusieurs études comparatives entre les PECs en solution et les films multicouches ont été réalisées. Différentes expériences ont montré que les films multicouches présentent une structure similaire à celle des PECs en solution. La proximité des charges opposées dans les films multicouches et la nature de la complexation des polyions ressemblent fortement aux caractéristiques décrites pour les PECs en solution (Dautzenberg *et al.*, 1994; Rodriguez *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2003). Cette observation montre que le comportement des polyelectrolytes dans les multicouches est gouverné par les mêmes lois physiques que celles correspondant aux complexes de polyélectrolytes en solution. Ce résultat est en accord avec les résultats de Boulmedais *et al.* (Boulmedais *et al.*, 2002), qui ont montré que pour le système

PLL/PGA, les PECs, se formant à la fois en solution et sous forme de films multicouches, présentent une structure secondaire similaire. Des conclusions similaires ont été rapportées par Arys *et al.* (Arys *et al.*, 2001), indiquant que l'organisation interne des films multicouches est intimement liée à ce celle de la formation des PECs en solution. La corrélation entre le comportement des PECs en solution et dans les films multicouches a été soulignée par Cohen Stuart *et al.* (Kovacevic *et al.*, 2002). Ces auteurs ont établi un diagramme de phase des PECs en solution (Fig. 1.21), dont les paramètres sont la fraction  $f^+$  du polycation dans le mélange polycation/polyanion ( $f^- = 1 - f^+$ ) ( $f^-$  est la fraction de charge négative du polyanion) et la force ionique.



**Figure 1.21** : Représentation schématique du diagramme de la stabilité des films multicouches. L'axe horizontal représente la fraction du polycation contenu dans le mélange polycation/polyanion en solution. L'axe vertical représente la force ionique ou la concentration du sel. Les régions L et G indiquent, respectivement, l'état liquide et vitreux des multicouches. Les régions L' et L'' représentent les complexes de polyélectrolytes solubles. La région S est la partie du diagramme où aucune complexation entre les polyélectrolytes ne se produit. (Kovacevic *et al.*, 2002).

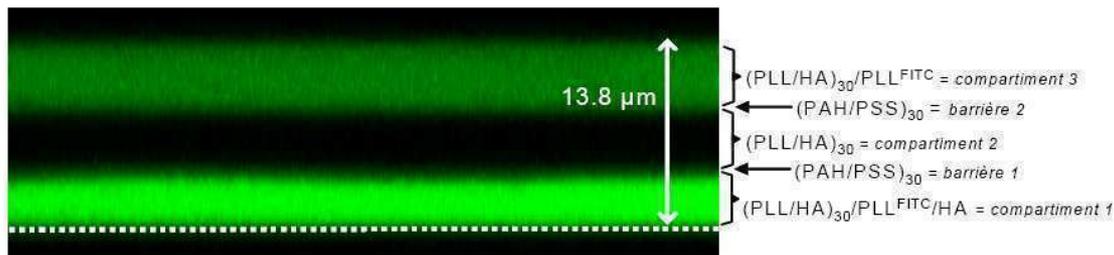
Ce diagramme de phase résume le comportement des PECs en solution. Il indique que la phase soluble ou insoluble des PECs dépend de la force ionique et de la fraction  $f^+$ . Ainsi, la transition dissolution/croissance stable des multicouches est dictée par le comportement des PECs en solution. Lorsque la force ionique est supérieure à une valeur critique (la région S), aucune complexation entre les polyelectrolytes ne se produit, que ce soit en solution ou dans les films multicouches. L'écrantage des charges le long des chaînes polymériques inhibent fortement l'attraction coulombienne. Les petits ions du sel entrent en compétition avec les interactions polycation/polyanion. Ce constat confirme les résultats de Dubas *et al.* (Dubas and Schlenoff,

2001a), qui ont montré que le film multicouche à base de PDADMA/PAA se dissout complètement à une concentration de 0.6 M en NaCl. En dessous de cette valeur critique ( $C_{cr}$ ) de force ionique, la complexation des polyélectrolytes se produit. Ainsi, nous distinguons les deux régions L' et L" qui correspondent, respectivement, à la formation de PECs solubles négatives (dû à l'excès de polyanions) et positives (dû à l'excès de polycations). La formation de films multicouches correspond aux régions L et G où les PECs précipitent. La composition à l'intérieure de la région G, où la force ionique est inférieure à  $C_g$  (glassy concentration), conduit à la formation de films vitreux caractérisés par une mobilité réduite des polyélectrolytes. Par conséquent, lors de la construction aucun équilibre n'est possible. Pour une force ionique située entre  $C_g$  et  $C_{cr}$ , nous avons la région L où la mobilité des polyélectrolytes augmente avec la force ionique  $C_s$ . Le film passe alors un état vitreux à un état plus liquide. La mobilité des polyélectrolytes permet d'établir un équilibre entre les films et la solution. Cet équilibre reflète la possibilité d'une dissolution partielle du film au contact d'une solution contenant un large excès de polyanions. Cette érosion est d'autant plus importante que la force ionique augmente. Par ailleurs, l'obtention d'un film stable requière sa construction dans la région S (Kovacevic *et al.*, 2002). Des études par calorimétrie ont également été effectuées. Il a été démontré que lorsque l'enthalpie de complexation en solution de couple de polyélectrolytes de charge opposée est endothermique, les films multicouches à base de ce couple présentent une croissance exponentielle et structure plutôt gel-liquide. Inversement, lorsque l'enthalpie de complexation est exothermique, il en découle des films multicouches qui croient linéairement et qui présentent une structure plus dense voire vitreuse (Laugel *et al.*, 2006).

#### **I.2.4 Vers des architectures multicompartimentés de films multicouches**

Les films multicouches à croissance linéaire, plus durs et plus denses, ne permettent pas la diffusion des molécules, de ce fait, ils peuvent jouer le rôle d'une barrière. Par contre, les films à croissance exponentielle permettent la diffusion des polyélectrolytes, ceci permet de les charger par des principes actifs chargés. Ils peuvent dès lors jouer le rôle de réservoir. Ces propriétés peuvent être mises à profit pour réaliser des films à compartiments, en alternant des domaines à croissance linéaire et d'autres à croissance exponentielle. De telles architectures ont été réalisées en déposant par exemple des films PAH/PSS sur d'autres films de type PLL/HA (Garza *et al.*, 2004). Le film exponentiel sert de réservoir pour des principes actifs alors que le film linéaire

représente une barrière à la diffusion des polyélectrolytes entre deux compartiments successifs de même nature. Il a été constaté par microscopie confocale que la PLL<sup>FITC</sup>, insérée dans un compartiment réservoir, ne diffusait pas au travers de la couche barrière. Grâce à de tels films, des cascades de réponses cellulaires peuvent être contrôlées dans le temps (Jessel *et al.*, 2006) (Garza *et al.*, 2005)(Fig. 1.22).



**Figure 1.22 :** Observation en microscopie confocale de la section en z d'un film  $(PLL/HA)_{30}/PLL^{FITC}/HA/(PAH/PSS)_{30}/(PLL/HA)_{30}/(PAH/PSS)_{30}/(PLL/HA)_{30}-PLL^{FITC}$  (3 compartiments séparés par 2 barrières). La PLL<sup>FITC</sup> correspond à de la PLL couplée de façon covalente avec un marqueur vert fluorescent : la fluorescéine isothiocyanate (FITC). La ligne en pointillés blancs correspond à la position de la lamelle de verre (bas du film).

Les films multistrates peuvent aussi se composer de deux films multicouches exponentiels déposés l'un sur l'autre. Le deuxième film conserve un comportement exponentiel même s'il est construit sur un film préexistant composé de polyélectrolytes de nature différente. De plus, les polyélectrolytes du film supérieur pénètrent dans le film sous-jacent et le densifient. Cette densification bloque alors la diffusion des nouvelles chaînes de polyélectrolytes déposées et aboutit à une véritable barrière (Jourdainne *et al.*, 2007).

### 1.2.5 Films multicouches répondants à différents stimuli externes

La préparation et l'application de films multicouches adaptatifs répondant à différents stimuli est d'un intérêt fondamental. Les réponses induites sont caractérisées par des changements des propriétés physico-chimiques de ces films. Ainsi, le contrôle externe des fonctions comme la perméabilité ou les propriétés mécaniques des films multicouches peut dans certains cas s'effectuer par un simple changement du pH, de la force ionique et de la température.

### I.2.5.1 Films répondant au pH

Dans le cas des films multicouches à base de polyélectrolytes faibles, la distribution des charges à l'intérieur du film peut être modulée par le pH du milieu environnant. La fraction des groupements ionisables dans le film est déterminée lors de l'assemblage par le pH des solutions et les pKa des polyélectrolytes. Cette fraction détermine la « capacité » du film multicouche à s'adapter suite à un changement de pH après l'assemblage. Cette caractéristique d'adaptation est largement étudiée et utilisée pour contrôler les propriétés physico-chimiques des films multicouches.

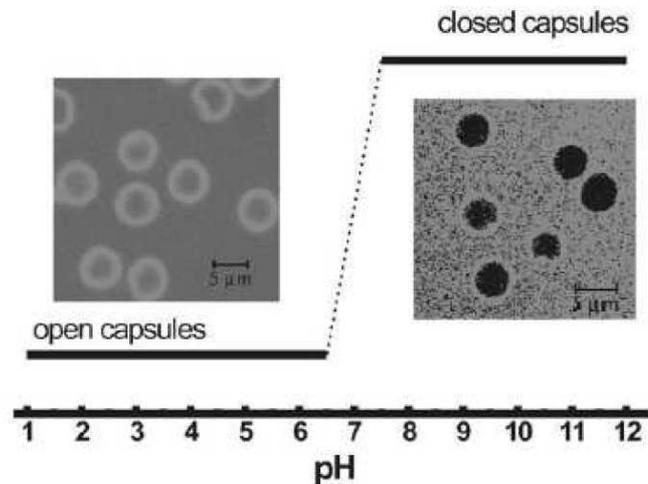
#### I.2.5.1.1 Dissolution des films multicouches par changement du pH

Une variation externe du pH, peut conduire à une dissolution complète des complexes au sein d'un film multicouches. Dans le cas des films à base de liaisons hydrogènes, l'ionisation des groupements acides de l'assemblage en fonctions carboxylates, entraîne l'effondrement du réseau des liaisons hydrogènes, construit à bas pH. Ainsi, des films constitués de PEO/poly(acide methacrylique (PMAA), de PVPON/PMAA et de PEO/PAA, commencent à se disloquer à des pH respectivement voisins de  $\text{pH} = 4.6$ ,  $\text{pH} = 6.9$  et  $\text{pH} = 3.6$ , puis se dissolvent complètement pour des pH supérieurs à ces valeurs (Sukhishvili and Granick, 2000; Sukhishvili and Granick, 2002). Le seuil critique de la dissolution peut être contrôlé en choisissant des combinaisons différentes des polymères. Dans le cas des films multicouches à base de polyélectrolytes faibles, les interactions électrostatiques peuvent facilement être contrôlées par variation du pH du milieu environnant. Ainsi, il est possible de construire des microcapsules répondant au pH à base de PAH/PSS (PAH est le polyélectrolyte faible dont le pKa est de 10.8). L'augmentation drastique du pH (au dessus de 11) réduit la densité de charge le long de PAH. Un excès de charges négatives provenant de PSS se créé. Les forces de répulsions et l'augmentation de la pression osmotique au sein du film provoque un gonflement irréversible puis une dissolution complète de la structure (Glinel *et al.*, 2007). Burke *et al.* ont montré que pour le film multicouche PAH/HA se détruit lorsqu'il est exposé soit à un pH acide (2.5-3) soit à un pH basique (10-10.5). Pour les autres valeurs de pH, la réponse de ce film est intimement liée aux paramètres physico-chimiques de la construction. Le taux de gonflement du film est dépendant de la valeur du pH de la solution de contact (Burke and Barrett, 2005). De manière générale, un film multicouche construit à base de polyélectrolytes faibles à pH acide se détruit au contact d'une solution à pH basique (Sui and

Schlenoff, 2004). L'effet du pH est essentiellement le produit de l'équilibre chimique du couple acide/base des groupements carboxylate et amine (Burke and Barrett, 2003).

#### I.2.5.1.2 Perméabilité des films multicouches par changement du pH

La dissolution partielle des complexes a été utilisée pour contrôler la perméabilité des films multicouches. La formation des pores induits par une variation de pH a été expérimentalement mise en évidence aussi bien pour les films multicouches de polyélectrolytes construits sur des supports plans (Mendelsohn *et al.*, 2000) que pour les capsules creuses. Ainsi, la nanoporosité induite réversiblement par le pH dans les parois des capsules à base de films PSS/PAH permet de concevoir des capsules à perméabilité contrôlée (Antipov *et al.*, 2002; Sukhorukov *et al.*, 2004). En effet, lorsque le pH est inférieur à 6.5, la paroi des capsules s'ouvre par augmentation de la taille des pores permettant la diffusion de macromolécules de dextrane à l'intérieur de la capsule. Les auteurs suggèrent que l'augmentation de la densité de charge de PAH induit des forces de répulsion et par conséquent à une fragilisation de la matrice. Lorsque le pH est supérieur à 8.2, les pores de la paroi se referment, empêchant le passage des macromolécules de dextrane (Fig. 1.23). L'existence d'une telle nanoporosité réversiblement contrôlée par le pH a été également démontrée pour des films PAH/PAA (Hiller *et al.*, 2002), initialement construits à pH = 8.5 pour PAH et à pH = 3.5 pour PAA. Ensuite, l'immersion du film dans une solution à pH = 1.8, provoque une séparation de phase à cause de la protonation des groupements carboxylates. Par conséquent, des micropores, de taille allant de 100 à 500 nm, se forment accompagnés d'un gonflement du film de 200%. Les auteurs ont prouvé que de tels assemblages nanostructurés utilisés comme revêtement de surface sur des verres optiques présentaient des propriétés anti-réfléchissantes remarquables réduisant la lumière réfléchie de 8% à 0.1%. Plus récemment, Lutkenhaus et al (Lutkenhaus *et al.*, 2008), ont montré qu'il est possible de contrôler le taille des pores pour le système LPEI/ PAA en variant les conditions du pH à la fois lors de l'assemblage et après la construction. Le contrôle de la perméabilité par variation du pH est largement étudié dans l'encapsulation et la libération de macromolécule (Chung and Rubner, 2002).



**Figure 1.23 :** Observations par microscopie confocale de la perméabilité de capsules creuses composées de  $(PSS/PAH)_4$  vis-à-vis de molécules de dextrane-FITC (masse molaire 77 000 g/mol). Ouverture à  $pH=3.5$  et fermeture à  $pH=10.0$  des capsules (Antipov *et al.*, 2002).

#### I.2.5.1.3 Membranes à sélectivité ionique bi-polaire

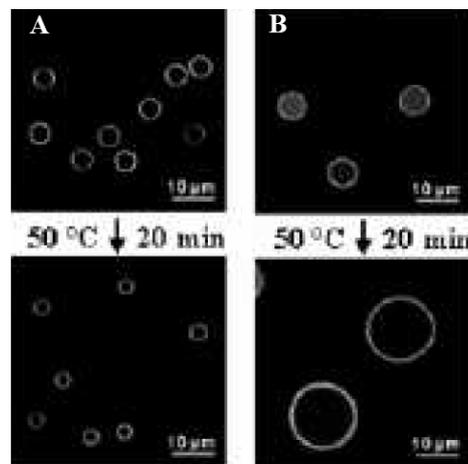
Park *et al.* ont montré que la construction de films multicouches à base de polyélectrolytes partiellement couplés à la benzophénone (BP), PAA-BP/PAH-BP, suivie d'une réticulation photochimique entre ces groupements benzophénone, permettait d'obtenir des membranes très résistantes et d'une grande stabilité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

### I.2.5.2 Films répondant à la température

#### I.2.5.2.1 Par transition de phase

La température influence les propriétés viscoélastiques des films multicouches. Par exemple, Mueller *et al.* ont montré que le module élastique des capsules creuses à base de multicouches PDADMA/PSS était divisé d'un facteur proche de 100 passant de 100 MPa à 1 MPa, par simple chauffage (Mueller *et al.*, 2005). En fait cette diminution importante du module d'Young est attribuée à une transition de phase vitreuse se situant vers  $35^{\circ}C$  faisant passer le film

initialement vitreux à température ambiante à un état beaucoup plus mou pour des températures supérieures, se traduisant par une très forte augmentation de la mobilité des chaînes par agitation thermique moléculaire. De plus, la nature du polyélectrolyte déposé à la surface de la capsule influence énormément le comportement thermique (Kohler *et al.*, 2006). En effet, sous l'action de la chaleur, les capsules se terminant par PSS se contractent (le rayon diminue) avec une forte augmentation de l'épaisseur de la paroi, alors que les capsules se terminant par PDADMA se dilatent (Fig 1.24).



**Figure 1.24 :** Effets de la température sur des capsules creuses à base de films multicouches PDADMA/PSS. A) Capsules se terminant par PSS : effet de contraction, B) Capsules se terminant par PDADMA : effet de dilatation(Kohler *et al.*, 2006).

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

#### I.2.5.2.2 Utilisation de copolymères blocs hydrophiles-hydrophobes

Le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) est un polymère thermosensible soluble en milieu aqueux à basse température, mais insoluble au dessus d'une température critique (lower critical solution temperature LCST) vers 32°C. A cette température, le polymère subit une transition de phase réversible en expulsant les molécules d'eau solvant initialement les monomères. Des films multicouches de polyélectrolytes thermosensibles ont été fabriqués à partir de copolymères chargés contenant le PNIPAM : PSS-co-PNIPAM et PAH-co-PNIPAM. L'étude de la quantité d'eau dans le film en fonction de la température a mis en évidence l'existence de deux transitions de phase, microscopique et macroscopique respectivement à 33°C et 45°C (Jaber and Schlenoff, 2005). Sous l'action du chauffage, près de 50% de la quantité d'eau contenue initialement dans le film est expulsée de façon réversible. Une application prometteuse de tels assemblages thermosensibles concerne la libération de médicaments par changement de température, par exemple en réalisant le chargement d'un principe actif dans le film à 20°C et en provoquant sa libération spontanée en le plaçant dans un milieu physiologique à 37°C. Ainsi, des microgels constitués de PNIPAM-co-PAA et de PAH ont été chargés par un médicament utilisé en chimiothérapie, la doxorubicine. Par déclenchement de pulses thermiques entre 20 et 50°C, ce médicament a pu être libéré de façon contrôlée (Serpe *et al.*, 2005).

#### I.2.5.3 Films répondant à la force ionique et au contre-ion

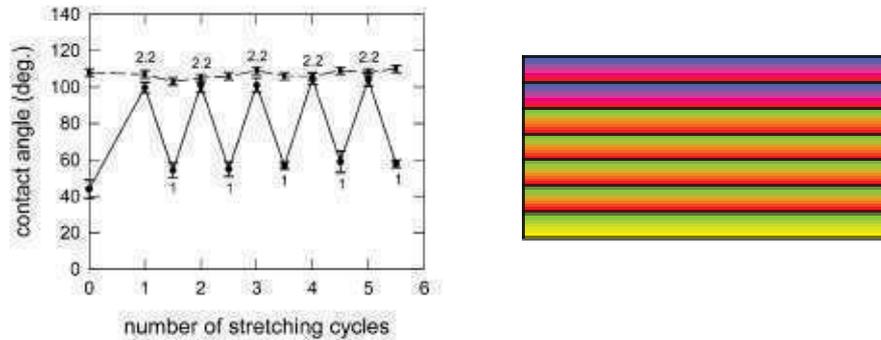
La force ionique joue un rôle décisif lors de la construction des films multicouches. Une fois le film formé, il est possible de changer la force ionique et le contre-ion de la solution environnante. La réponse du film multicouche dépendra du système de polyélectrolytes et du type de contre-ion. Dubas et Schlenoff ont étudié le comportement de trois systèmes de films multicouches vis-à-vis d'un changement de la force ionique du surnageant. Ils ont observé que le système PDADMA/PAA montrait un gonflement important suite à l'augmentation de la force ionique, le système PDADMA/PSS gonfle légèrement lorsque la concentration de NaCl est au-dessus de 1 M. Par contre, en dessous de cette concentration, ce même film se dégonfle légèrement. Pour ces deux systèmes les changements s'opèrent non seulement au niveau de l'épaisseur mais également au niveau de la rugosité du film. Concernant le film PAH/PSS, moins sensible, il ne répond qu'à des forces ioniques au dessus de 2 M (Dubas and Schlenoff, 2001b).

En effet, le système PAH/PSS commencent à gonfler à des forces ioniques très élevées et se dissout complètement aux environs de 4 M. La concentration minimale à partir de laquelle les films multicouches se dissolvent dépend fortement de la nature des polyélectrolytes, elle est de 0.3 M pour PDADMA/PAA et de 2 M pour PDADMA/PSS. Ce seuil augmente avec la densité de charge et diminue légèrement quand la solution de NaCl est remplacée par une solution de NaBr (Nazaran *et al.*, 2007). La forte interaction entre l'anion Br<sup>-</sup> et le polycation PDADMA renforce la décomposition. D'autre part, la force ionique pouvait contrôler la perméabilité des capsules à base de films multicouches. Cependant, contrairement au pH, la force ionique n'est pas sélective aux polyélectrolytes et ne peut qu'atténuer les interactions électrostatiques au sein des films multicouches. Dans cette optique, Antipov *et al.* ont montré que la perméabilité des capsules à base de PAH/PSS était fortement augmentée en présence de NaCl 0.5 M (Antipov *et al.*, 2002). Cette perméabilité aux molécules est réversible (Ibarz *et al.*, 2001). Pour les films déposés sur une surface plane, les variations de la force ionique peuvent également induire l'apparition de pores (Fery *et al.*, 2001).

#### **I.2.5.4 Films répondant à des stimuli mécaniques**

##### **I.2.5.4.1 Des surfaces hydrophiles aux surfaces hydrophobes**

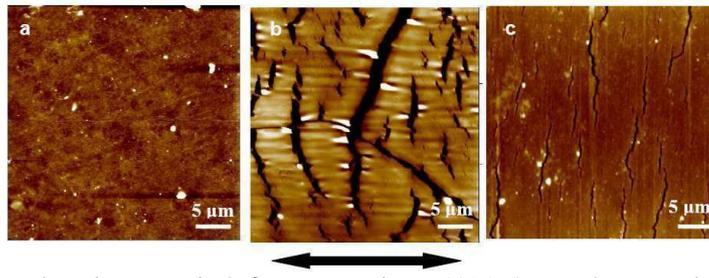
Une structuration basée sur le dépôt de multicouches de polyélectrolytes sur des feuilles de silicone, a permis de passer réversiblement d'un comportement surfacique hydrophile à une comportement surfacique hydrophobe, par simple étirement mécanique longitudinal du substrat de silicone (Hemmerle *et al.*, 2005). Un polyélectrolyte hydrophobe, le Nafion a été utilisé pour construire des assemblages formés de films multicouches PAH/Nafion (Naf) en tant que strate hydrophobe et PAH/PAA en tant que strate hydrophile. L'angle de contact d'un film PEI/(Naf/PAH)<sub>4</sub>/Naf/(PAH/PAA)<sub>2</sub> a été mesuré au cours de plusieurs cycles d'élongation/rétraction successifs et a conduit à des valeurs alternant réversiblement entre 57° et 100° lorsque l'on passe d'un état non-étiré à un état étiré (taux d'étirement de 2.2) (Fig. 1.25). Cette observation s'explique notamment par l'exposition en surface de la strate hydrophobe Naf/PAH sous étirement et son ré-enfouissement lors du retour à un état de repos (rétraction).



**Figure 1.25.** A gauche : Courbe représentant l'évolution de l'angle de contact durant les cycles d'élongation/rétraction pour une multicouche (PEI/Naf)/(PAH/Naf)<sub>4</sub>/(PAH/PAA)<sub>2</sub>. La valeur de 1 correspond à l'état non-étiré et la valeur de 2.2 à l'état étiré (d'un taux égal à 2.2 fois la longueur initiale du substrat de silicone). A droite : Schéma de la structure supposée stratifiée d'un tel film : les bandes vertes et jaunes correspondent à (PEI/Naf), les bandes rouges et vertes à (PAH/Naf) et les bandes rouges et bleues à (PAH/PAA)(Hemmerle *et al.*, 2005).

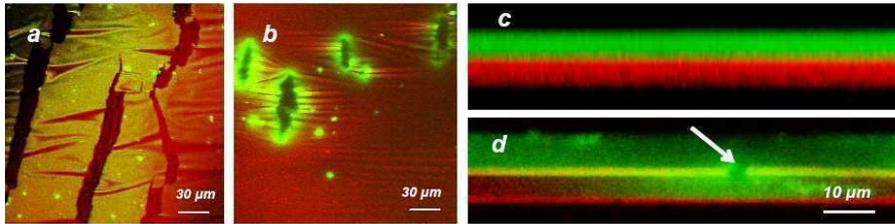
#### I.2.5.4.2 Formation de nano-valves

Mertz *et al.* ont étudié par microscopie confocale et par microscopie à force atomique, la réponse mécanique, sous un étirement longitudinal, de trois films multicouches différents: PLL/HA, PAH/PSS et PDADMA/PSS, directement déposés sur des feuilles de silicone. Sous étirement en phase liquide, alors que les films composés de 30 paires de couches PLL/HA et PDADMA/PSS ne présentent aucune fracture à leur surface indiquant leur caractère viscoélastique, les films (PAH/PSS)<sub>30</sub> montrent un comportement de type matériau vitreux fragile, avec l'apparition de microfractures à leur surface. Ces fractures apparaissent uniformément sur toute la surface et sont orientées en moyenne perpendiculairement à la direction de l'étirement (Fig. 1.26). Une fois les films (PAH/PSS)<sub>30</sub> ramenés à l'état non-étiré, elle se rapprochent mais ne cicatrisent pas.



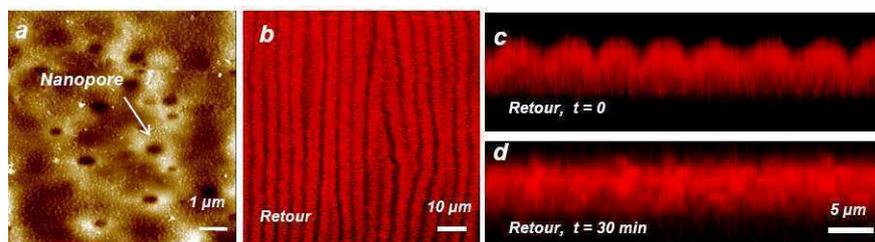
**Figure 1.26 :** Images de microscopie à force atomique (AFM) représentant le comportement d'un film  $(\text{PAH/PSS})_{30}$  sous un étirement mécanique de 100%, a) à l'état non étiré, b) à l'état étiré, c) au retour à l'état non étiré. La flèche noire indique la direction de l'étirement qui sera toujours identique par la suite (Mertz *et al.*, 2007).

Ces auteurs ont également étudié le comportement sous étirement mécanique, de systèmes multicouches de type « réservoir/barrière » obtenus par l'association de films jouant le rôle de réservoirs PLL/HA et de barrières (PAH/PSS ou PDADMA/PSS). Une barrière est soit déposée sur un réservoir PLL/HA ou soit enfouie entre deux réservoirs PLL/HA. Ils ont alors comparé le comportement sous étirement mécanique de ces deux types de barrières et deux réponses très différentes ont été observées. En ce qui concerne les barrières PAH/PSS, d'abord des systèmes réservoir/barrière de type  $(\text{PLL/HA})_n/(\text{PAH/PSS})_m$  ont été construits, puis des réservoirs « doubles » de type  $(\text{PLL/HA})_n/(\text{PAH/PSS})_m/(\text{PLL/HA})_n$ . Pour ces deux structures, dès l'application d'un faible étirement, la strate barrière se fissure comme un matériau vitreux avec la formation de fractures de taille micrométriques sur toute l'interface (Fig. 1.27). Une fois ces systèmes ramenés à l'état non-étiré, ces fractures se rapprochent mais ne se referment pas comme cela avait été observé pour les films PAH/PSS seul.



**Figure 1.27 :** A gauche (a et b), images (x,y) de microscopie confocale (CLSM) de systèmes  $(PLL/HA)_n/(PAH/PSS)_m$  (réservoir/barrière) sous un étirement mécanique de 30% représentant les fissures formées à la surface de la barrière. La diminution des temps de dépôts des polyélectrolytes de la barrière (PAH et PSS) permet d'obtenir des fissures moins étendues (b). A droite (c et d), sections (x,z) CLSM représentant un film  $(PLL/HA)_{30}/PLL^{Rho}/(HA/PLL)/(PSS/PAH)_{30}/(HA/PLL)_{30}/HA/PLL^{FITC}$  (deux réservoirs séparés par une barrière) (c) à l'état non étiré, (d) sous un étirement mécanique de 40%. La flèche blanche indique la diffusion de chaînes de  $PLL^{FITC}$  d'un réservoir à l'autre à travers une fissure.

Concernant le deuxième système réservoir/barrière de type  $(PLL/HA)_n/(PDADMA/PSS)_m$ , les observations en microscopie confocale et en microscopie à force atomique ont montré que les barrières PDADMA/PSS ne se fissuraient pas sous étirement comme les barrières PAH/PSS, mais qu'elles s'ouvraient en formant des nanopores dont les tailles varient de quelques dizaines à quelques centaines de nm (Fig. 1.28).



**Figure 1.28 :** a) Image AFM de nanopores formés sur la barrière d'un système réservoir/barrière  $(PLL/HA)_{30}/PLL/(PSS/PDADMA)_5$  sous un étirement de 100%, b) Image (x,y) CLSM représentant le phénomène de relaxation de la barrière d'un système réservoir/barrière  $(PLL/HA)_{30}/PLL^{Rho}/(HA/PLL)/(PSS/PDADMA)_5$  au retour à l'état non-étiré, c et d) sections verticales (x,z) CLSM illustrant la cinétique de relaxation des oscillations de la barrière entre  $t=0$  (c) et  $t=30$  min (d).

Ces nanopores se forment à des taux critiques d'étirement croissants avec le nombre de couches constituant la barrière. Par ailleurs, ce mécanisme est réversible, c'est-à-dire que les pores se referment et la barrière redevient imperméable lorsque le film est replacé à l'état non-étiré. De plus, il apparaît que la fermeture de ces nanopores est liée à un processus de relaxation

mécanique faisant intervenir des oscillations qui s'amortissent sur une certaine durée, au niveau des couches composant la barrière. Ainsi, ces propriétés indiquent la possibilité pour ces systèmes polymériques de jouer le rôle de nano-valves à commande mécanique.

### **I.2.5.5 Films répondant à des stimuli électriques**

Le potentiel électrique peut perturber les interactions polymère-polymère au sein d'un film multicouches au même titre qu'un changement externe du pH ou de la force ionique. Pour une étude électrochimique, les films sont construits sur un substrat conducteur qui est utilisé comme une électrode de travail. Ce film peut être, soit construit avec un des deux polymères présentant un couple oxydo réducteur (Laurent and Schlenoff, 1997), soit avec un des deux polymères fonctionnalisés par greffage d'un groupement rédox, par exemple le ferrocène (Liu *et al.*, 2003). Le film peut également contenir une molécule ayant des propriétés rédox, appelée sonde électrochimique qui se confine dans le film. Dans ce cas, le signal électrique mesuré sera sensible aux interactions entre la sonde et le film. Plusieurs sondes peuvent être utilisées, le couple ferrocyanure/ferricyanure (Hubsch *et al.*, 2005), des protéines rédox (Lu and Hu, 2006), la dopamine ou l'acide ascorbique (Koktysh *et al.*, 2002; Rmaile *et al.*, 2003). L'application d'un potentiel électrique conduit à une réaction d'oxydoréduction. Plusieurs publications traitent de l'étude des effets du stimulus électrique sur des films multicouches.

#### **I.2.5.5.1 Dissolution des films multicouches sous stimuli électrique**

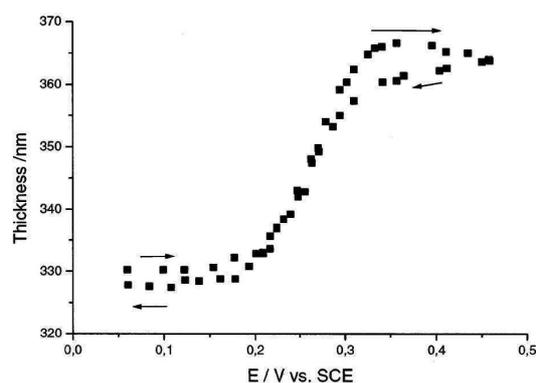
La dissolution d'un film multicouches à base de PLL et d'héparine PLL/HEP, a été décrite en appliquant un potentiel électrique de 1.8 V (Boulmedais *et al.*, 2006). La motivation de ce travail était la réalisation de systèmes à même de libérer de manière contrôlée une espèce, à vertu curative par exemple, en solution. Quand le potentiel est appliqué à 1.8 V au niveau de l'anode (le substrat de construction), l'électrolyse de l'eau prend place, produisant ainsi des protons  $H^+$ . Ceci induit l'acidification du milieu et par conséquent la protonation des groupements carboxylates et sulfate de l'héparine. L'entrée des électrolytes dans le film et le changement du pH fragilisent les interactions entre l'héparine et la PLL causant ainsi la dissolution du film. Il est à noter que durant la dissolution, des trous apparaissent au niveau du film mais n'atteignent pas toute son épaisseur. La taille de ces nanopores dépendent de la durée du potentiel, plus la durée

est importante plus la taille des trous est grande. La libération de l'héparine s'opère seulement sous potentiel électrique (1.8 V et au-delà), il s'agit d'un phénomène contrôlable. Diéguez *et al.* ont également étudié l'effet du courant électrique sur le film multicouches PLL/ acide désoxyribonucléique (ADN). Ces auteurs ont montré que quand ce film est construit à 0 V sur une électrode de type ITO (Indium Tin Oxide), sa dissolution est lente et partielle après application d'un potentiel de 1.9 V. Au contraire, quand une tension de 1.2 V est appliquée lors de la construction de ce même film, sa destruction est beaucoup plus rapide et presque totale à 1.9 V. Cet effet a été observé à différents taux de sel et aussi pour d'autres systèmes comme PAH/PSS. Pour expliquer cet effet, les auteurs suggèrent qu'au niveau de l'anode, il y a non seulement production de protons mais également de Cl<sub>2</sub> suite à l'application du potentiel. Le Cl<sub>2</sub> interagit avec l'eau pour donner HClO, connu pour réagir avec les amines, en l'occurrence les amines de la PLL. De ce fait, la PLL perd sa charge et diminue son habilité à interagir avec le polyanion (Dieguez *et al.*, 2009). En 2007, Hammond *et al.* ont montré que le film non toxique, construit sur une électrode ITO, à base de LPEI, de Bleu de Prusse (BP) et de <sup>14</sup>CDS se détruit quand un potentiel de 1.4 V est appliqué. La libération de <sup>14</sup>CDS, la biomolécule d'intérêt, dépend de la durée du stimulus, plus la durée est grande plus la libération est importante. Cette libération sous stimulus électrique reflète la destruction du film. En effet, l'oxydation du BP chargé négativement en Brun de Prusse (PX) neutre après application d'un potentiel de 1.4 V, induit un excès de charges positives dans le film. Par conséquent, les forces de répulsions entre les polycations augmentent et fragilisent le film (Wood *et al.*, 2008). Le groupe du Professeur Vörös a utilisé la propriété de certains films multicouches à se dissoudre sous stimulus électrique pour induire un détachement cellulaire. Aussi, les cellules sont cultivées sur un film fin de PLL/HA. Arrivées à confluence, le tapis cellulaire est détaché par dissolution du film PLL/HA sous potentiel électrique (Guillaume-Gentil *et al.*, 2008).

#### I.2.5.5.2 Gonflement et dégonflement des films multicouches sous stimuli électrique

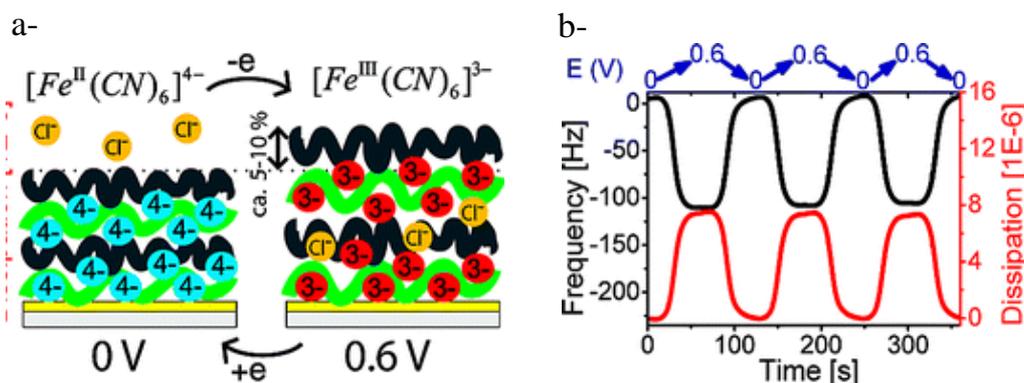
Une étude par ellipsométrie de films composés de l'enzyme glucose oxydase (GOx) et de la PAH modifiée par greffage d'un complexe d'osmium GOx/PAH-Os soumis à des cycles d'oxydation et de réduction a été rapportée par Forzani *et al.* (Forzani *et al.*, 2002). Les auteurs ont pu montrer que ces cycles s'accompagnaient du gonflement ou de l'amincissement du film (Fig. 1.30). Ils ont également discuté des origines de ces phénomènes en termes d'incorporation

ou de rejet de contre-ions et/ou de molécules d'eau issus de la solution électrolytique. Typiquement, une augmentation de 10% de l'épaisseur du film et une diminution de 3% de l'indice de réfraction sont enregistrées quand le film est complètement oxydé. Ces changements sont réversibles et proportionnels à la fraction oxydée d'osmium.



**Figure 1.30.** Epaisseur en fonction du potentiel appliqué d'un film multicouche dont l'un des polyélectrolytes possède des propriétés d'oxydoréduction, déterminée par ellipsométrie. Courbe issue de la référence (Forzani *et al.*, 2002).

Outre l'utilisation de polyélectrolytes portant des groupes rédox, il est possible de confiner une sonde électrochimique dans un film multicouche de polyélectrolytes. Grieshaber *et al.* ont étudié la réponse de deux films multicouches, par QCM-D couplée à l'électrochimie, en présence de ferrocyanure  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ , confiné dans ce film, suite à l'application d'un potentiel électrique par voltamétrie cyclique. Ces auteurs ont montré que le film multicouche PAH/PGA répondait à l'excitation électrique par un gonflement et un dégonflement respectivement lors de l'oxydation et de la réduction de la sonde électrochimique. Lors de l'oxydation le ferrocyanure perd un électron et se transforme ainsi en ferricyanure  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ , pour conserver l'électroneutralité au sein du film, les ions chlorure  $\text{Cl}^-$  et l'eau pénètrent dans le film conduisant à son gonflement (Fig. 1.31). Le phénomène inverse se produit durant la réduction. Les pics d'oxydation et de réduction sont proportionnels aux nombres des électrons transférés, plus le transfert est important plus la réponse du film est accentuée.



**Figure 1.31 :** (a) Schéma représentatif d'un film PAH/PGA contenant la sonde électrochimique ferrocyanure  $[Fe(CN)_6]^{4-}$ . L'application d'un potentiel électrique induit à l'oxydation des ions  $[Fe(CN)_6]^{4-}$ , il en résulte une entrée des ions chlorure  $Cl^-$  et le film gonfle. Lors de la réduction les ions  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  se transforment en  $[Fe(CN)_6]^{4-}$ , les ions  $Cl^-$  sortent du film et le film se contracte. (b) La QCM-D couplée à l'électrochimie montre que l'application d'un potentiel de 600 mV provoque une diminution de la variation de la fréquence (gonflement du film) et une augmentation de la dissipation. La situation inverse se produit quand le potentiel est remis à 0V. (Grieshaber *et al.*, 2008).

Contrairement au système PAH/PGA, le film PLL/PSS répond très faiblement au potentiel et dans le seul cas où la sonde est présente en solution. En effet, la diffusion de  $[Fe(CN)_6]^{4-}$  au sein du film PLL/PSS est très limitée du fait de sa forte densité d'empilement. L'intérêt de ce travail est de montrer que les changements (gonflement et dégonflement) peuvent survenir très rapidement et pour des stimuli électriques très faibles ( $< 600$  mV), ce qui permet d'entrevoir de potentielles applications biomédicales.

## I.2.6 Applications et fonctionnalisation des films multicouches dans le domaine des biomatériaux

Depuis l'élaboration des premiers films multicouches (Decher, 1996), de nombreuses applications ont été développées. Un des avantages des multicouches de polyélectrolytes est la possibilité de modifier leurs propriétés en ajustant certains paramètres comme la nature des polyélectrolytes, la force ionique, le pH ou encore la température. Les propriétés modulables sont entre autres, l'épaisseur, la rugosité, la perméabilité, les propriétés mécaniques ou encore la charge de surface. La facilité de construction et la simplicité de mise en œuvre des films multicouches de polyélectrolytes ont généré une évolution rapide des connaissances dans ce

domaine ainsi que le développement d'une grande diversité de systèmes fonctionnels. Ces assemblages supramoléculaires permettent aujourd'hui d'envisager de nombreuses applications potentielles balayant un champ technologique très large allant des matériaux électroniques aux nanobiotechnologies.

### **I.2.6.1 Comportement des films de polyélectrolytes vis-à-vis du milieu de culture**

Avant de traiter les différentes voies de fonctionnalisation des films multicouches, il est intéressant de comprendre le comportement de ces films lorsqu'ils sont en contact avec le milieu biologique contenant des protéines et des cellules. De plus, la mise au point de surfaces ou d'interfaces qui résistent à l'adsorption protéique et/ou à l'adhérence cellulaire constitue un défi pour l'élaboration de matériaux destinés à être mis en contact avec le milieu sanguin, pour l'élaboration d'implants, ainsi que pour le développement de nouveaux biosenseurs.

#### **I.2.6.1.1 Adsorption de protéines**

Le contrôle de l'adsorption des protéines et de l'adhésion cellulaire à la surface des substrats constitue un objectif majeur dans le domaine biomédical. Les films multicouches de polyélectrolytes offrent la possibilité de modifier les propriétés de surfaces de manière simple, applicable à tous types de supports et à toutes les géométries. Des études d'adsorption de différentes protéines sur des films de type PAH/PSS ont montré que les quantités adsorbées dépendaient de la charge. En effet, lorsque la charge globale des protéines est inverse à celle de la multicouche, l'adsorption protéique est très élevée et due essentiellement aux interactions électrostatiques. Au contraire, les quantités adsorbées sont moindres mais non nulles lorsque les protéines sont de même signe que le film (Ladam *et al.*, 2001), dans ce cas ce sont les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes qui sont impliquées. Des films bio-inertes, résistant à l'adsorption protéique ont également pu être mis en évidence (Muller *et al.*, 2001). Il a également été montré dans le cas de polyélectrolytes faibles que l'adsorption des protéines est dépendante du type de polyanion, du pH et de la force ionique de la solution (Muller *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 1999).

#### I.2.6.1.2 Adhésion cellulaire

La modification des propriétés de surface peut également contrôler l'adhésion cellulaire. Les films multicouches permettent de rendre soit adhérentes ou non adhérentes les surfaces. La nature chimique de la dernière couche déposée semble particulièrement importante pour le comportement cellulaire à la surface. Ainsi, le PGA a été couplé de façon covalente avec le poly(éthylène glycol) (PEG) (PGA-g-PEG). Des surfaces recouvertes de films multicouches PLL/PGA et terminant par une ou plusieurs couches de PGA-g-PEG deviennent ainsi anti-adhérentes aux bactéries et aux protéines (Boulmedais *et al.*, 2004).

En 1999, Elbert *et al.* ont déposé des multicouches de type PLL/Alginate sur des supports solides de gélatine, de matrice extracellulaire produite par des fibroblastes et de collagène de type I (Elbert *et al.*, 1999). Ces films constituaient un premier exemple de multicouches à croissance exponentielle possédant des propriétés de bio-inertie (résistant à l'adhésion cellulaire) vis-à-vis de fibroblastes humains. En effet, la construction de ces multicouches sur une surface initialement "adhésive" permet d'obtenir une surface inerte vis-à-vis des cellules. D'autres multicouches à base de polysaccharides comme le système PLL/HA et chitosan (CHI)/HA, se sont depuis, également révélées non adhérentes vis-à-vis des cellules de chondrosarcomes (Richert *et al.*, 2002) ou d'ostéoblastes, du fait de leur forte hydrophilicité et leur comportement d'hydrogel. Cependant, une réticulation chimique après construction peut rigidifier le système et le rendre adhérent (Richert *et al.*, 2004a).

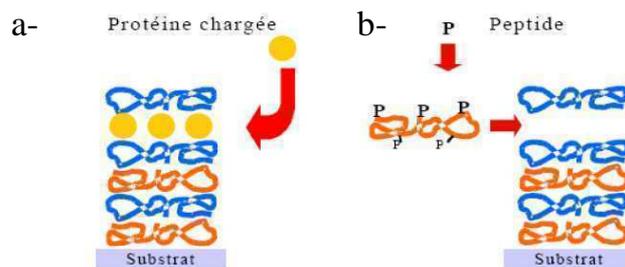
Les films multicouches peuvent aussi être utilisés pour promouvoir l'adhésion cellulaire. Boura *et al.* et Moby *et al.*, ont montré que l'adhésion des cellules endothéliales ombilicales humaines (HUVEC) pouvait être améliorée en modifiant la surface du substrat avec des films multicouches PAH/PSS ou poly(D-Lysine) (PDL)/ Copolymère d'acide lactique et glycolique (PLGA) (Boura *et al.*, 2003) ; (Moby *et al.*, 2007), la conservation du phénotype cellulaire a également été démontrée. Berthelemy *et al.* a montré que la culture cellulaire réalisée sur le film multicouche PAH/PSS accélère la différenciation des cellules progénitrices endothéliales en cellules endothéliales matures (Berthelemy *et al.*, 2008). En effet, il suffit de deux semaines de culture sur PAH/PSS au lieu de deux mois en culture normale pour aboutir cette différenciation. Des motoneurons de la moelle épinière de rat (Bataille *et al.*, 1998) ont été déposés sur

différentes architectures de polyélectrolytes en utilisant comme référence des surfaces recouvertes de la laminine. La laminine, qui est une protéine composante de la matrice extracellulaire, est connue pour présenter des propriétés d'adhésion vis-à-vis des cellules. Ils ont démontré que l'adhésion et la survie des motoneurones sur les multicouches construits à partir de polyélectrolytes de synthèse sont comparables et parfois supérieures à celles observées sur la surface de référence.

L'élaboration de multicouches non adhérentes constitue non seulement un objectif en soi mais s'inscrit aussi dans une stratégie qui consiste à fonctionnaliser ensuite sélectivement de telles surfaces pour induire l'adhésion d'un type cellulaire spécifique. Pour cela, la voie envisagée consiste à fonctionnaliser également des couches non adhérentes par des peptides d'adhésion spécifiques de certains types cellulaires.

### I.2.6.2 Fonctionnalisation des films multicouches par des molécules actives

Les films multicouches peuvent être fonctionnalisés dans le but de leur conférer une ou plusieurs propriété(s) spécifique(s), soit par simple insertion de molécules biologiques à différents niveaux de l'édifice lors de leur construction, soit par greffage covalent du facteur biologique sur une chaîne de polyélectrolyte (Fig. 1.32). Cependant, ces molécules biologiques doivent conserver une structure proche de celle de leur forme native et après insertion pouvoir interagir avec des cellules déposées au sommet du film.



**Figure 1.32 :** 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.*, 1996a), (b) soit par enfouissement d'un principe actif greffé sur une chaîne de polyélectrolyte (Chluba *et al.*, 2001).

Cependant, ces molécules biologiques doivent conserver une structure proche de celle de leur forme native et après insertion pouvoir interagir avec des cellules déposées au sommet du film.

Une grande variété de molécules actives peuvent être intégrées dans les films multicouches afin de les fonctionnaliser et d'obtenir un matériau bioactif, telles que des protéines (Ladam *et al.*, 2001), des médicaments tel que le piroxicam (Benkirane-Jessel *et al.*, 2004b), l'héparine (Thierry *et al.*, 2003), la lipopolysaccharide (LPS) (Jessel *et al.*, 2004; Leguen *et al.*, 2007), des virus (Dimitrova *et al.*, 2008; Lvov *et al.*, 1994), ou l'ADN (Jessel *et al.*, 2006; Vazquez *et al.*, 2002) pour la transfection cellulaire.

#### I.2.6.2.1 Insertion de protéines par simple dépôt

L'activité biologique des protéines insérées dans les films, nécessite d'éviter leur dénaturation. Des études réalisées à l'aide de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Schwinté *et al.*, 2002) ont montré qu'une protéine peut conserver une structure proche de la structure native. Il a été aussi montré que la structure secondaire de protéines (telles que le fibrinogène, l'albumine ou le lysozyme) insérées dans les architectures de polyélectrolytes par simple dépôt (Schwinté *et al.*, 2001) était conservée. Les enzymes, telles que la glucose isomérase, la glucosamylase, la glucose oxidase et la peroxydase (Onda *et al.*, 1996a; Onda *et al.*, 1996b), incluses dans les multicouches de polyélectrolytes, conservent toute leur activité enzymatique. De même, des IgG enfouies sous un petit nombre de couches de polyélectrolytes interagissent avec leurs antigènes (Caruso *et al.*, 1998b).

Un élément primordial dans la fonctionnalisation des films multicouches est l'accès des cellules aux protéines enfouies dans les films multicouches. Cet aspect a été étudié pour un système modèle (Jessel *et al.*, 2003). La protéine A est une molécule aux propriétés pro-inflammatoires. L'inclusion de la protéine A dans des architectures de type (PLL/PGA)<sub>n</sub>, a montré que la protéine ne peut diffuser verticalement dans le film. Néanmoins, les cellules peuvent interagir avec celle-ci. Ainsi des monocytes cultivés au contact de ces architectures produisent du TNF- $\alpha$  (Tumoral necrosis factor) en réponse à l'activation par la protéine A. Des dégradations locales du film apparaissent, probablement suite à l'action d'enzymes spécifiques sécrétées par les cellules susceptibles de couper les liaisons peptidiques des chaînes, PLL et PGA. Cette dégradation peut expliquer l'action de la protéine enfouie. L'accessibilité des protéines peut

être modulée en fonction du type de polyélectrolyte. Ainsi, Jessel *et al.* ont montré que l'utilisation de l'énantiomère D de la poly(lysine), non dégradable par les cellules, permet de moduler la réponse cellulaire (Benkirane-Jessel *et al.*, 2004a). La formation de pseudopodes au travers du film a également été décrite comme modèle pour l'interaction cellulaire avec les protéines (Chluba *et al.*, 2001). Les films multicouches peuvent jouer le rôle de réservoir puisque les molécules actives, une fois insérées, se maintiennent dans la multicouche malgré les multiples rinçages et l'ajout de multicouches en surface du film (Vodouhe *et al.*, 2006). Dans certains cas, les principes peuvent diffuser passivement dans le milieu. Le phénomène est alors dépendant de stimulus comme le pH (Wood *et al.*, 2006), la température (Serpe *et al.*, 2005), la force ionique (Antipov *et al.*, 2003), ou encore de la liaison spécifique d'une molécule de biotine à l'avidine (Inoue and Anzai, 2005). Lors de l'ensemencement de cellules en surface du film, les cellules seront donc directement en contact avec les molécules dans le surnageant.

#### I.2.6.2.2 Insertion de peptides par couplage covalent

Une autre voie de fonctionnalisation consiste à inclure dans l'architecture d'un film des polyélectrolytes modifiés par couplage covalent d'un peptide. Ce couplage n'affecte pas l'activité du peptide. D'autres études ont montré que sur un film PLL/PGA, la couche terminale de PGA peut être remplacée par une couche de PGA couplé de façon covalente au peptide RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique). Ce peptide est connu pour favoriser l'adhésion cellulaire via les intégrines. Lors de l'ensemencement d'ostéoblastes primaires sur ces films, il apparaît que le dépôt d'une couche PGA-RGD en surface du film multicouche améliore significativement leur adhésion (Picart *et al.*, 2005a). Le peptide RGD couplé au polyélectrolyte PAH et déposé sur un film multicouche de poly(acide acrylique)/PAA présente le même effet (Berg *et al.*, 2004).

L'implantation de biomatériaux dans l'organisme, peut déclencher une réponse inflammatoire massive. De nouvelles stratégies ont pour but de développer des recouvrements de surfaces contenant un anti-inflammatoire local. Une première étude a consisté à utiliser la PLL couplée de façon covalente au peptide anti-inflammatoire  $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ - Melanocyte Stimulating Hormone). L'activité de stimulation de la synthèse de mélanine par l' $\alpha$ -MSH a tout d'abord été testée. Ainsi, des mélanocytes murins (B16-F1), cultivés sur des films PLL/PGA fonctionnalisés par une couche terminale de PLL- $\alpha$ -MSH, synthétisent puis sécrètent de la mélanine de la même manière qu'en présence d' $\alpha$ -MSH libre dans le milieu de culture. Le délai de la réponse cellulaire

peut être modulé par insertion au sein du film PLL/PGA d'une couche de PLL- $\alpha$ -MSH plutôt qu'en couche terminale (Chluba *et al.*, 2001). Par la suite, l'activité anti-inflammatoire de l' $\alpha$ -MSH couplée au PGA et utilisée pour construire un film multicouche (PLL/PGA- $\alpha$ -MSH)<sub>n</sub> a été testé sur des monocytes humains (THP-1). Comme modèle d'étude *in vitro* de l'inflammation, une réponse inflammatoire est induite par la mise en contact des monocytes avec du LPS, une endotoxine bactérienne. En réponse au stimulus inflammatoire, les monocytes synthétisent du TNF- $\alpha$  (Tumoral Growth Factor- $\alpha$ ), une cytokine pro-inflammatoire. Lorsque le film est fonctionnalisé avec l' $\alpha$ -MSH, une diminution de la production de TNF- $\alpha$  est observée ainsi que la sécrétion d'une cytokine anti-inflammatoire, l'IL-10 (Interleukine 10). En comparaison avec le comportement cellulaire en présence d' $\alpha$ -MSH libre en solution, le fait d'insérer la molécule active dans le film aboutit à une action prolongée dans le temps de l'effet anti-inflammatoire. De plus, l'action anti-inflammatoire est anticipée puisque les monocytes synthétisent l'IL-10 au bout de 6 heures en présence de la molécule libre alors qu'ils réagissent à 4 heures si la molécule est insérée dans un film (Benkirane-Jessel *et al.*, 2004b).

#### I.2.6.2.3 Insertion d'autres molécules actives

Outre les protéines, d'autres bio-macromolécules comme l'ADN, peuvent être incorporées dans les films. En effet, l'ADN chargé négativement peut se substituer à un polyanion, qui en association avec la PLL, conduit à un film multicouche PLL/ADN (Sukhorukov *et al.*, 1996). Une telle surface permet une transfection directe de cellulesensemencées sur le film (Jessel *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2002).

A des fins de modulation de la réponse inflammatoire, un anti-inflammatoire non stéroïdien, le piroxicam, a aussi été intégré dans un film multicouche avec succès. Pour cela, il est tout d'abord mis sous forme de complexe avec une molécule de  $\beta$ -cyclodextrine pour réussir à le solubiliser. En effet, le piroxicam est une molécule hydrophobe. Il est difficile d'immobiliser des molécules hydrophobes à des interfaces surtout si le recouvrement se fait par voie aqueuse. Le piroxicam est donc encapsulé à l'intérieur de la cavité hydrophobe de la  $\beta$ -cyclodextrine pour former un complexe médicament-cage soluble. Grâce à cette molécule cage, il est mis en réserve dans le film PLL/PGA où il conserve sa structure, donc sa fonction. Ce complexe est alors déposé au sein du film multicouche. Le délai de réponse cellulaire au piroxicam dépend de la profondeur

d'enfouissement du complexe  $\beta$ -cyclodextrine-piroxicam dans le volume du film (Benkirane-Jessel *et al.*, 2004b).

Un autre exemple de fonctionnalisation est l'insertion de molécules thérapeutiques dans les films multicouches de polyelectrolytes. En effet, des films PLL/HA ont trouvé une application spécifique comme réservoir de molécules anticancéreuses (Vodouhe *et al.*, 2006). Le paclitaxel (ou Taxol) est une molécule utilisée en chimiothérapie pour son activité anti-proliférative dans le traitement du cancer du sein et des ovaires. Dans ce travail, les auteurs ont montré que la dose de Taxol insérée dans le film est complètement modulable et que l'activité de la molécule reste stable après son insertion. La viabilité de cellules cancéreusesensemencées en surface peut alors être réduite de 80 % indiquant l'efficacité de tels films à visée thérapeutique.

Les facteurs de croissance constituent la classe la plus courante de molécules insérées. L'intérêt est d'améliorer la croissance cellulaire et/ou de différencier le type cellulaireensemencé. Il est ainsi possible d'insérer un facteur de croissance neurotrophique comme le BDNF (brain-derived growth factor), ou une protéine, la sémaphorine 3A, dans des films PAH/PSS ou PLL/PGA afin de favoriser la formation et la croissance d'axones. Ces deux principes actifs conservent leur activité dans les films multicouches (Vodouhe *et al.*, 2005). Dierich *et al.* ont montré que l'insertion des facteurs BMP-2 (Bone morphogenetic protein 2) et TGF $\beta$ <sub>1</sub> (Transforming growth factor Bêta 1) dans les films multicouches PLL/PGA, induisent l'ostéogénèse à partir de cellules souches embryonnaires (Dierich *et al.*, 2007).

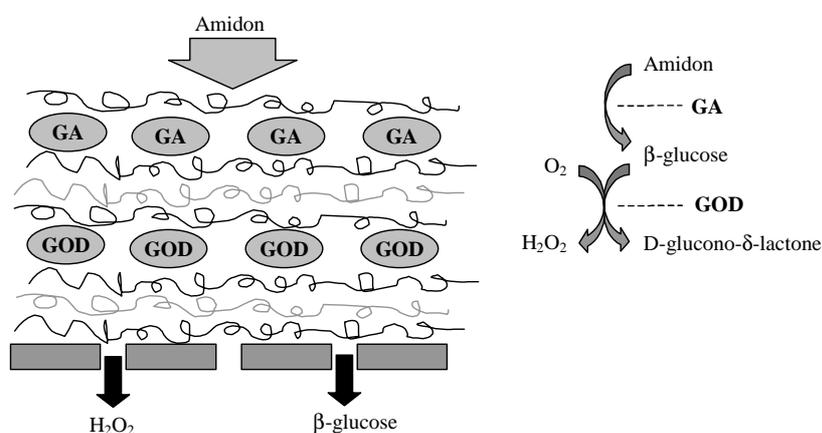
#### I.2.6.2.4 Fonctionnalisation par des enzymes : les bioréacteurs

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

L'activité catalytique des enzymes n'étant pas affectée par la présence des multicouches, elle pourrait être mise à profit dans le domaine de la séparation par des interactions bio-spécifiques (Graul and Schlenoff, 1999). En outre, l'incorporation d'enzymes dans les multicouches permet de construire de véritables réacteurs enzymatiques spécifiques. Des détecteurs spécifiques bio-optiques et bioélectroniques d'hydrogène, de glucose, d'amidon, de maltose, de fructose et de méthanol ont déjà été conçus à partir de films contenant des couches de peroxydase (Onda *et al.*,

1996a; Onda *et al.*, 1996b), de glucose oxydase (Narvaez *et al.*, 2000; Onda *et al.*, 1996b), de glucoamylase (Onda *et al.*, 1996a), de fructose déshydrogénase et d'alcool oxydase (Narvaez *et al.*, 2000).

Par exemple, Onda *et al.* ont préparé une multicouche d'enzyme, poly(éthylène imine) (PEI) et poly(styrène sulfonate) (PSS) sur une membrane d'ultrafiltration (Onda *et al.*, 1996a). Ils ont utilisé la glucose oxydase (GOD), qui catalyse l'oxydation du glucose en gluconolactone, et la glucoamylase (GA), qui catalyse la décomposition de l'amidon en glucose. L'architecture du film obtenue est [filtre-(PEI/PSS)<sub>4</sub>-(PEI/GOD)<sub>2</sub>-(PEI/PSS)<sub>10</sub>-(PEI/GA)<sub>2</sub>-PEI]. L'activité enzymatique de ce film a été testée en utilisant le schéma expérimental de la figure 1.34.



**Figure 1.34 :** Processus enzymatique séquentiel sur un film multicouche à base de glucose oxydase (GOD) et de glucoamylase (GA). (Decher and Schlenoff, 2003; Lvov *et al.*, 1996b).

Par contact du film avec une solution aqueuse d'amidon soluble, la GA décompose l'amidon en glucose et le GOD convertit le glucose en gluconolactone et génère de l' $H_2O_2$ . Les concentrations en  $H_2O_2$  et en glucose sont déterminées par colorimétrie. Dans ces conditions expérimentales, le rapport molaire en glucose et  $H_2O_2$  est de 59/41 dans le filtrat. Cela indique que 40% du glucose produit par les couches de GA est converti en  $H_2O_2$  par les couches de GOD. Le rendement de conversion du glucose en  $H_2O_2$  est fonction de l'épaisseur des couches intermédiaires PEI/PSS, du débit et de la concentration en amidon.

### I.3 Références bibliographiques

- Advincula, R., Aust, E., Meyer, W., and Knoll, W. (1996). "*In Situ Investigations of Polymer Self-Assembly Solution Adsorption by Surface Plasmon Spectroscopy*". *Langmuir*, 12, 3536-3540.
- Antipov, A. A., Sukhorukov, G. B., Leporatti, S., Radtchenko, I. L., Donath, E., and Möhwald, H. (2002). "*Polyelectrolyte multilayer capsule permeability control*". *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 198, 535-541.
- Antipov, A. A., Sukhorukov, G. B., and Möhwald, H. (2003). "*Influence of the ionic strength on the polyelectrolyte multilayers' permeability*". *Langmuir*, 19, 2444-2448.
- Ariel, G., and Andelman, D. (2003). "*Polyelectrolyte persistence length: Attractive effect of counterion correlations and fluctuations*". *Europhysics Letters*, 61, 67-73.
- Arys, X., Laschewsky, A., and Jonas, A. M. (2001). "*Ordered Polyelectrolyte "Multilayers". I. Mechanisms of Growth and Structure Formation: A Comparison with Classical Fuzzy "Multilayers"*". *Macromolecules*, 34, 3318-3330.
- Augst, A. D., Kong, H. J., and Mooney, D. J. (2006). "*Alginate hydrogels as biomaterials*". *Macromolecular Bioscience*, 6, 623-633.
- Bataille, S., Portalier, P., Coulon, P., and Ternaux, J. P. (1998). "*Influence of acetylcholinesterase on embryonic spinal rat motoneurons growth in culture: a quantitative morphometric study*". *European Journal of Neuroscience*, 10, 560-572.
- Becheran-Marion, L., Peniche, C., and Arguelles-Monal, W. (2004). "*Study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and alginate: influence of alginate composition and chitosan molecular weight*". *International Journal of Biological Macromolecules*, 34, 127-133.
- Benkirane-Jessel, N., Lavalle, P., Meyer, F., Audouin, F., Frisch, B., Schaaf, P., Ogier, J., Decher, G., and Voegel, J.-C. (2004a). "*Control of monocyte morphology on and response to model surfaces for implants equipped with anti-inflammatory agents*". *Advanced Materials*, 16, 1507-1511.
- Benkirane-Jessel, N., Schwinté, P., Falvey, P., Darcy, R., Haikel, Y., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Ogier, J. (2004b). "*Build-up of polypeptide multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxicam-cyclodextrin complexes*". *Advanced Functional Materials*, 14, 174-182.
- Berg, M. C., Yang, S. Y., Hammond, P. T., and Rubner, M. F. (2004). "*Controlling mammalian cell interactions on patterned polyelectrolyte multilayer surfaces*". *Langmuir*, 20, 1362-1368.

- Berthelemy, N., Kerdjoudj, H., Gaucher, C., Schaaf, P., Stolz, J. F., Lacolley, P., Voegel, J. C., and Menu, P. (2008). "*Polyelectrolyte films boost progenitor cell differentiation into endothelium-like monolayers*". *Advanced Materials*, 20, 2674 - 2678.
- Bertrand, P., Jonas, A., Laschewsky, A., and Legras, R. (2000). "*Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces : suitable materials, structure and properties*". *Macromolecules Rapid Communication*, 21, 319-348.
- Bhandari, R. N. B., Riccalton, L. A., Lewis, A. L., Fry, J. R., Hammond, A. H., Tendler, S. J. B., and Shakesheff, K. M. (2001). "*Liver tissue engineering: A role for co-culture systems in modifying hepatocyte function and viability*". *Tissue Engineering*, 7, 345-357.
- Blaakmeer, J., Bohmer, M. R., Stuart, M. A. C., and Fler, G. J. (1990). "*Adsorption of Weak Polyelectrolytes on Highly Charged Surfaces - Poly(Acrylic Acid) on Polystyrene Latex with Strong Cationic Groups*". *Macromolecules*, 23, 2301-2309.
- Blodgett, K. B. (1934). "*Monomolecular films of fatty acids on glass*". *Journal of the American Chemical Society*, 56, 495.
- Blodgett, K. B., and Langmuir, I. (1937). "*Buildup films of Barium stearate and their optical properties*". *Physical Review*, 51, 964-982.
- Bohmer, M. R., Evers, O. A., and Scheutjens, J. (1990). "*Weak Polyelectrolytes between 2 Surfaces - Adsorption and Stabilization*". *Macromolecules*, 23, 2288-2301.
- Boulmedais, F., Frisch, B., Etienne, O., Lavalley, P., Picart, C., Ogier, J., Voegel, J.-C., Schaaf, P., and Egles, C. (2004). "*Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of anti-microbial protection for biomaterials*". *Biomaterials*, 25, 2003-2011.
- Boulmedais, F., Schwinte, P., Gergely, C., Voegel, J. C., and Schaaf, P. (2002). "*Secondary structure of polypeptide multilayer films: An example of locally ordered polyelectrolyte multilayers*". *Langmuir*, 18, 4523-4525.
- Boulmedais, F., Tang, C. S., Keller, B., and Vörös, J. (2006). "*Controlled electrodisolution of polyelectrolyte multilayers: A platform technology towards the surface-initiated delivery of drugs*". *Advanced Functional Materials*, 16, 63-70.
- Boura, C., Menu, P., Payan, E., Picart, C., Voegel, J. C., Muller, S., and Stoltz, J. F. (2003). "*Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification*". *Biomaterials*, 24, 3521-3530.
- Burke, N. A. D., Mazumder, M. A. J., Hanna, M., and Stover, H. D. H. (2007). "*Polyelectrolyte complexation between poly (methacrylic acid, sodium salt) and poly (diallyldimethylammonium chloride) or poly [2-(methacryloyloxyethyl) trimethylammonium chloride]*". *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 45, 4129-4143

- Burke, S. E., and Barrett, C. J. (2003). "*Acid-Base Equilibria of Weak Polyelectrolytes in Multilayer Thin Films*". *Langmuir*, 19, 3297-3303.
- Burke, S. E., and Barrett, C. J. (2005). "*Swelling Behavior of Hyaluronic Acid/Polyallylamine Hydrochloride Multilayers Films*". *Biomacromolecules*, 6, 1419-1428.
- Buscher, K., Graf, K., Ahrens, H., and Helm, C. A. (2002). "*Influence of adsorption conditions on the structure of polyelectrolyte multilayers*". *Langmuir*, 18, 3585-3591.
- Cacace, M. G., Landau, E. M., and Ramsden, J. J. (1997). "*The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena*". *Quarterly Reviews of Biophysics*, 30, 241-277.
- Caruso, F., Donath, E., and Möhwald, H. (1998a). "*Influence of polyelectrolyte multilayer coatings on Forster resonance energy transfer between 6-carboxyfluorescein and rhodamine B-labeled particles in aqueous solution*". *Journal of Physical Chemistry B*, 102, 2011-2016.
- Caruso, F., Furlong, D. N., Ariga, K., Ichinose, I., and Kunitake, T. (1998b). "*Characterization of polyelectrolyte-protein multilayer films by atomic force microscopy, scanning electron microscopy, and Fourier transform infrared reflection-absorption spectroscopy*". *Langmuir*, 14, 4559-4565.
- Caruso, F., Lichtenfeld, H., Donath, E., and Möhwald, H. (1999). "*Investigation of electrostatic interactions in polyelectrolyte multilayer films: Binding of anionic fluorescent probes to layers assembled onto colloids*". *Macromolecules*, 32, 2317-2328.
- Caruso, F., Niikura, K., Furlong, D. N., and Okahata, Y. (1997). "*I. Ultrathin multilayer polyelectrolyte films on gold: Construction and thickness determination*". *Langmuir*, 13, 3422-3426.
- Chapman, V. J., and Chapman, D. J. (1970). "*Seaweeds and their uses*".
- Chiarelli, P. A., Johal, M. S., Casson, J. L., Roberts, J. B., Robinson, J. M., and Wang, H. L. (2001). "*Controlled fabrication of polyelectrolyte multilayer thin films using spin-assembly*". *Advanced Materials*, 13, 1167 - 1171.
- Chluba, J., Voegel, J.-C., Decher, G., Erbacher, P., Schaaf, P., and Ogier, J. (2001). "*Peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity*". *Biomacromolecules*, 2, 800-805.
- Christian Jürgens, A. P. S., Thomas Porté, Maximilian Faschingbauer, and Seide, K. (2006). "*Biodegradable film in trauma and orthopedic surgery*". *European Journal of Trauma*, 32, 160-171.
- Chung, A. J., and Rubner, M. F. (2002). "*Methods of loading and releasing low molecular weight cationic molecules in weak polyelectrolyte multilayer films*". *Langmuir*, 18, 1176-1183.

- Clark, A. H., and Ross-Murphy, S. B. (1991). "*Structural and mechanical properties of biopolymer gels*". Food Polymers, Gels and Colloids 322.
- Cochin, D., and Laschewsky, A. (1999). "*Layer-by-layer self-assembly of hydrophobically modified polyelectrolytes*". Macromolecular Chemistry and Physics, 200, 609-615
- Collin, D., Lavallo, P., Garza, J. M., Voegel, J. C., Schaaf, P., and Martinoty, P. (2004). "*Mechanical properties of cross-linked hyaluronic acid/poly-(L-lysine) multilayer films*". Macromolecules, 37, 10195-10198.
- Cooper, C. L., Dubin, P. L., Kayitmazer, A. B., and Turksen, S. (2005). "*Polyelectrolyte-protein complexes*". Current Opinion in Colloid & Interface Science, 10, 52-78.
- Dausse, Y., Grossin, L., Miralles, G., Pelletier, S., Mainard, D., Hubert, P., Baptiste, D., Gillet, P., Dellacherie, E., Netter, P., and Payan, E. (2003). "*Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials: macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defect*". Osteoarthritis and Cartilage, 11, 16-28.
- Dautzenberg, H., Hartmann, J., Grünwald, T., and Brand, F. (1996). "*Stoichiometry and structure of polyelectrolyte complex particles in diluted solutions*". Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics, 100, 1024-1032
- Dautzenberg, H., Jaeger, W., Kotz, J., Philipp, B., Seidel, C., and Stscherbina, D. (1994). "*Polyelectrolytes: formation, characterization and application*". Hanser and Gardner, Munich.
- De Boissesson, M. R., Leonard, M., Hubert, P., Marchal, P., Stequert, A., Castel, C., Favre, E., and Dellacherie, E. (2004). "*Physical alginate hydrogels based on hydrophobic or dual hydrophobic/ionic interactions: Bead formation, structure, and stability*". Journal of Colloid and Interface Science, 273, 131-139.
- Decher, G. (1996). Templating, self-assembly and self-organization, J.-P. Sauvage and M. W. Hosseini, eds., Pergamon Press, Oxford.
- Decher, G. (1997). "*Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites*". Science, 277, 1232-1237.
- Decher, G., Hong, J. D., and Schmitt, J. (1992). "*Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charges surface*". Thin Solid Films, 210/211, 831-835.
- Decher, G., Lvov, Y., and Schmitt, J. (1994). "*Proof of multilayer structural organization in self-assembled polycation-polyanion molecular films*". Thin Solid Films, 244, 772-777.
- Decher, G., and Schlenoff, J. B. (2003). "*Multilayer thin films: sequential assembly of nanocomposite materials*". Wiley-VCH, Weinheim.

- Decher, G., and Schmitt, J. (1992). "*Fine-tuning of the film thickness of ultrathin multilayer films composed of consecutively alternating layers of anionic and cationic polyelectrolytes*". Progress in Colloid & Polymer Science, 89, 160-164.
- Delcorte, A., Bertrand, P., Arys, X., Jonas, A., Wischerhoff, E., Mayer, B., and Laschewsky, A. (1996). "*ToF-SIMS study of alternate polyelectrolyte thin films: Chemical surface characterization and molecular secondary ions sampling depth*". Surface Science, 366, 149-165.
- Delcorte, A., Bertrand, P., Wischerhoff, E., and Laschewsky, A. (1997). "*Adsorption of polyelectrolyte multilayers on polymer surfaces*". Langmuir, 13, 5125-5136.
- Dhoot, N. O., Tobias, C. A., Fischer, I., and Wheatley, M. A. (2004). "*Peptide-modified alginate surfaces as a growth permissive substrate for neurite outgrowth*". Journal of Biomedical Materials Research Part A, 71A, 191-200.
- Dieguez, L., Darwish, N., Graf, N., Voros, J., and Zambelli, T. (2009). "*Electrochemical tuning of the stability of PLL/DNA multilayers*". Soft Matter, 5, 2415-2421.
- Dierich, A., Le Guen, E., Messaddeq, N., Stoltz, J. F., Netter, P., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Benkirane-Jessel, N. (2007). "*Bone formation mediated by synergy-acting growth factors embedded in a polyelectrolyte multilayer film*". Advanced Materials, 19, 693-697.
- Dimitrova, M., Affolter, C., Meyer, F., Nguyen, I., Richard, D. G., Schuster, C., Bartenschlager, R., Voegel, J. C., Ogier, J., and Baumert, T. F. (2008). "*Sustained delivery of siRNAs targeting viral infection by cell-degradable multilayered polyelectrolyte films*". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105, 16320-16325.
- Dos Santos, L. A., De Oliveira, L. C., Rigo, E. C. S., Carrodeguas, R. G., Boschi, A. O., and De Arruda, A. C. F. (1999). "*Influence of polymeric additives on the mechanical properties of alpha-tricalcium phosphate cement*". Bone, 25, 99S-102S.
- Draget, K. I., SkjakBraek, G., and Smidsrod, O. (1997). "*Alginate based new materials*". International Journal of Biological Macromolecules, 21, 47-55.
- Draget, K. I., Smidsrød, O., and Skjåk-Bræk, G. (2002). "*Alginates from algae*". Biopolymers, 6, 215-240.
- Drury, J. L., Dennis, R. G., and Mooney, D. J. (2004). "*The tensile properties of alginate hydrogels*". Biomaterials, 25, 3187-3199.
- Drury, J. L., and Mooney, D. J. (2003). "*Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications*". Biomaterials, 24, 4337-4351.
- Dubas, S. T., and Schlenoff, J. B. (1999). "*Factors controlling the growth of polyelectrolyte multilayers*". Macromolecules, 32, 8153-8160.

- Dubas, S. T., and Schlenoff, J. B. (2001a). "*Polyelectrolyte Multilayers Containing a Weak Polyacid: Construction and Deconstruction*". *Macromolecules*, 34, 3736-3740.
- Dubas, S. T., and Schlenoff, J. B. (2001b). "*Swelling and smoothing of polyelectrolyte multilayers by salt*". *Langmuir*, 17, 7725-7727.
- Dvir-Ginzberg, M., Gamlieli-Bonshtein, I., Agbaria, R., and Cohen, S. (2003). "*Liver tissue engineering within alginate scaffolds: Effects of cell-seeding density on hepatocyte viability, morphology, and function*". *Tissue Engineering*, 9, 757-766.
- Eaglstein, W. H., and Falanga, V. (1997). "*Tissue engineering and the development of Apligraf(R), a human skin equivalent*". *Clinical Therapeutics*, 19, 894-905.
- El Haitami, A. E., Martel, D., Ball, V., Nguyen, H. C., Gonthier, E., Labbe, P., Voegel, J. C., Schaaf, P., Senger, B., and Boulmedais, F. (2009). "*Effect of the Supporting Electrolyte Anion on the Thickness of PSS/PAH Multilayer Films and on Their Permeability to an Electroactive Probe*". *Langmuir*, 25, 2282-2289.
- Elbert, D. L., Herbert, C. B., and Hubbell, J. A. (1999). "*Thin polymer layers formed by polyelectrolyte multilayer techniques on biological surfaces*". *Langmuir*, 15, 5355-5362.
- Ertesvag, H., and Valla, S. (1998). "*Biosynthesis and applications of alginates*". *Polymer Degradation and Stability*, 59, 85-91.
- Falcone, S. J., Palmeri, D., and Berg, R. A. (2006). "*Biomedical applications of hyaluronic acid*". *Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications*, 934, 155-174.
- Farhat, T. R., and Schlenoff, J. B. (2001). "*Ion transport and equilibria in polyelectrolyte multilayers*". *Langmuir*, 17, 1184-1192.
- Fery, A., Scholer, B., Cassagneau, T., and Caruso, F. (2001). "*Nanoporous thin films formed by salt-induced structural changes in multilayers of poly(acrylic acid) and poly(allylamine)*". *Langmuir*, 17, 3779-3783.
- Forzani, E. S., Perez, M. A., Teijelo, M. L., and Calvo, E. J. (2002). "*Redox driven swelling of layer-by-layer enzyme-polyelectrolyte multilayers*". *Langmuir*, 18, 9867-9873.
- Francius, G., Hemmerle, J., Ball, V., Lavallo, P., Picart, C., Voegel, J. C., Schaaf, P., and Senger, B. (2007). "*Stiffening of soft polyelectrolyte architectures by multilayer capping evidenced by viscoelastic analysis of AFM indentation measurements*". *Journal of Physical Chemistry C*, 111, 8299-8306.
- Freed, L. E., Marquis, J. C., Nohria, A., Emmanuel, J., Mikos, A. G., and Langer, R. (1993). "*Neocartilage Formation In vitro and In vivo Using Cells Cultured on Synthetic Biodegradable Polymers*". *Journal of Biomedical Materials Research*, 27, 11-23.
- Fromherz, P. (1980). *Electron Microscopy at molecular dimensions*, W. Baumeister and W. Vogell, eds., Springer-Verlag, Berlin, 338-349.

- Fundueanu, G., Nastruzzi, C., Carpov, A., Desbrieres, J., and Rinaudo, M. (1999). "*Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods*". *Biomaterials*, 20, 1427-1435.
- Gacesa, P. (1988). "*Alginates*". *Carbohydrate polymers*, 8, 161-182.
- Gaines Jr, G. (1983). "*Deposition of colloidal particles in monolayers and multilayers*". *Thin Solid Films*, 99, 243-248.
- Gao, C., Donath, E., Moya, S., Dudnik, V., and Möhwald, H. (2001a). "*Elasticity of hollow polyelectrolyte capsules prepared by the layer-by-layer technique*". *European Physical Journal E*, 5, 21-27.
- Gao, C. Y., Loporatti, S., Moya, S., Donath, E., and Möhwald, H. (2001b). "*Stability and mechanical properties of polyelectrolyte capsules obtained by stepwise assembly of poly(styrenesulfonate sodium salt) and poly(diallyldimethyl ammonium) chloride onto melamine resin particles*". *Langmuir*, 17, 3491-3495.
- Garza, J. M., Jessel, N., Ladam, G., Dupray, V., Muller, S., Stoltz, J. F., Schaaf, P., Voegel, J. C., and Lavalle, P. (2005). "*Polyelectrolyte multilayers and degradable polymer layers as multicompartment films*". *Langmuir*, 21, 12372-12377.
- Garza, J. M., Schaaf, P., Muller, S., Ball, V., Stoltz, J. F., Voegel, J. C., and Lavalle, P. (2004). "*Multicompartment films made of alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth*". *Langmuir*, 20, 7298-7302.
- Genes, N. G., Rowley, J. A., Mooney, D. J., and Bonassar, L. J. (2004). "*Effect of substrate mechanics on chondrocyte adhesion to modified alginate surfaces*". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 422, 161-167.
- Glinel, K., Dejumat, C., Prevot, M., Scholer, B., Schonhoff, M., and Klitzing, R. V. (2007). "*Responsive polyelectrolyte multilayers*". *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 303, 3-13.
- Gölander, C.-G., Arwin, H., Ericksson, J. C., Lundstrom, I., and Larsson, R. (1982). "*Heparin surface film formation through adsorption of colloidal particles studied by ellipsometry and scanning electron microscopy*". *Colloids and Surfaces*, 5, 1-16.
- Gombotz, W. R., and Wee, S. F. (1998). "*Protein release from alginate matrices*". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31, 267-285.
- Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., and Thom, D. (1973). "*Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model*". *FEBS letters*, 32, 195-198.
- Graul, T. W., and Schlenoff, J. B. (1999). "*Capillaries modified by polyelectrolyte multilayers for electrophoretic separations*". *Analytical Chemistry*, 71, 4007-4013.

- Green, A. E. S., and Sadrameli, S. M. (2004). "Analytical representations of experimental polyethylene pyrolysis yields". *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 72, 329-335.
- Grieshaber, D., Voros, J., Zambelli, T., Ball, V., Schaaf, P., Voegel, J. C., and Boulmedais, F. (2008). "Swelling and Contraction of Ferrocyanide-Containing Polyelectrolyte Multilayers upon Application of an Electric Potential". *Langmuir*, 24, 13668-13676.
- Guang, C., Hong, H. G., and Mallouk, T. E. (1992). "Layered Metal Phosphates and Phosphonates - from Crystals to Monolayers". *Accounts of Chemical Research*, 25, 420-427.
- Guillaume-Gentil, O., Akiyama, Y., Schuler, M., Tang, C., Textor, M., Yamato, M., Okano, T., and Voros, J. (2008). "Polyelectrolyte coatings with a potential for electronic control and cell sheet engineering". *Advanced Materials*, 20, 560 - 565.
- Hara, M., Yamaki, A., and Miyake, J. (2001). "Noninvasive detachment of cells on cells". *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, 17, 107-112.
- Hardouin, P., Anselme, K., Flautre, B., Bianchi, F., Bascoulergue, G., and Bouxin, B. (2000). "Ingénierie tissulaire et maladies du squelette". *Revue du Rhumatisme*, 67, 498-504.
- Haug, A., and Larsen, B. (1962). "Quantitative determination of the uronic acid composition of alginates". *ACTA CHEMICA SCANDINAVICA*, 16, 1908-1918.
- Haug, A., and Larsen, B. (1963). "The solubility of alginate at low pH". *ACTA CHEMICA SCANDINAVICA*, 17, 1653-1662.
- Haug, A., and Larsen, B. (1971). "Biosynthesis of alginate. II. Polymannuronic acid C-5-epimerase from *Azotobacter vinelandii* (Lipman)". *Carbohydrate research*, 17, 297.
- Haug, A., Larsen, B., and Smidsrod, O. (1963). "The degradation of alginates at different pH values". *ACTA CHEMICA SCANDINAVICA*, 17, 1466-1468.
- Haug, A., Larsen, B., and Smidsrod, O. (1967). "Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid". *ACTA CHEMICA SCANDINAVICA*, 21, 691-704.
- Haug, A., and Smidsrod, O. (1965). "The effect of divalent metals on the properties of alginate solutions". *ACTA CHEMICA SCANDINAVICA*, 19, 341-351.
- Hemmerle, J., Roucoules, V., Fleith, G., Nardin, M., Ball, V., Lavalle, P., Marie, P., Voegel, J. C., and Schaaf, P. (2005). "Mechanically responsive films of variable hydrophobicity made of polyelectrolyte multilayers". *Langmuir*, 21, 10328-10331.
- Hench, L. L., and Polak, J. M. (2002). "Third-generation biomedical materials". *Science*, 295, 1014 - 1017

- Hiller, J., Mendelsohn, J. D., and Rubner, M. F. (2002). "*Reversibly erasable nanoporous anti-reflection coatings from polyelectrolyte multilayers*". *Nature Materials*, 1, 59-63.
- Hoffman, A. S. "*Hydrogels for biomedical applications*." Conference on Bioartificial Organs III - Tissue Sourcing, Immunoisolation, and Clinical Trials, DAVOS, SWITZERLAND, 62-73.
- Hoffman, A. S. (2002). "*Hydrogels for biomedical applications*". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 3-12.
- Hofmeister, F. (1888). "*Zur lehre von der wirkung der salze*". *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 25, 1-30.
- Hofmeister, F. (1890). "*24. Zur Lehre von der Wirkung der Salze*". *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 27, 395-413.
- Hoogeveen, N. G., Cohen Stuart, M. A., Fler, G. J., and Bohmer, M. R. (1996). "*Formation and Stability of Multilayers of Polyelectrolytes*". *Langmuir*, 12, 3675 -3681.
- Hu, X. J., Lui, W., Cui, L., Wang, M., and Cao, Y. L. (2005). "*Tissue engineering of nearly transparent corneal stroma*". *Tissue Engineering*, 11, 1710-1717.
- Hubbe, M. A., Moore, S. M., and Lee, S. Y. (2005). "*Effects of charge ratios and cationic polymer nature on polyelectrolyte complex deposition onto cellulose*". *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 44, 3068-3074.
- Hubsch, E., Ball, V., Senger, B., Decher, G., Voegel, J.-C., and Schaaf, P. (2004). "*Controlling the growth regime of polyelectrolyte multilayer films: Changing from exponential to linear growth by adjusting the composition of polyelectrolyte mixtures*". *Langmuir*, 20, 1980-1985.
- Hubsch, E., Fleith, G., Fatisson, J., Labbe, P., Voegel, J. C., Schaaf, P., and Ball, V. (2005). "*Multivalent ion/polyelectrolyte exchange processes in exponentially growing multilayers*". *Langmuir*, 21, 3664-3669.
- Hutmacher, D. W. (2001). "*Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues - state of the art and future perspectives*". *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 12, 107-124.
- Ibarz, G., Dahne, L., Donath, E., and Möhwald, H. (2001). "*Smart micro- and nanocontainers for storage, transport, and release*". *Advanced Materials*, 13, 1324-1327.
- Iler, R. (1966). "*Multilayers of colloidal particles*". *Journal of Colloid and Interface Science* 21, 569-594.
- Inoue, H., and Anzai, J. (2005). "*Stimuli-sensitive thin films prepared by a layer-by-layer deposition of 2-iminobiotin-labeled poly(ethyleneimine) and avidin*". *Langmuir*, 21, 8354-8359.

- Ishaug, S. L., Crane, G. M., Miller, M. J., Yasko, A. W., Yaszemski, M. J., and Mikos, A. G. (1997). "Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds". *Journal of Biomedical Materials Research*, 36, 17-28.
- Izquierdo, A., Ono, S. S., Voegel, J.-C., Schaaf, P., and Decher, G. (2005). "Dipping versus spraying: Exploring the deposition conditions for speeding up layer-by-layer assembly". *Langmuir*, 21, 7558-7567.
- Izumrudov, V., Kharlampieva, E., and Sukhishvili, S. A. (2004). "Salt-induced multilayer growth: correlation with phase separation in solution". *Macromolecules*, 37, 8400-8406.
- Jaber, J. A., and Schlenoff, J. B. (2005). "Polyelectrolyte multilayers with reversible thermal responsivity". *Macromolecules*, 38, 1300-1306.
- Jaber, J. A., and Schlenoff, J. B. (2006). "Mechanical properties of reversibly cross-linked ultrathin polyelectrolyte complexes". *Journal of the American Chemical Society*, 128, 2940-2947.
- Jessel, N., Atalar, F., Lavalle, P., Mutterer, J., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Ogier, J. (2003). "Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins". *Advanced Materials*, 15, 692-695.
- Jessel, N., Oulad-Abdeighani, M., Meyer, F., Lavalle, P., Haikel, Y., Schaaf, P., and Voegel, J.-C. (2006). "Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by beta-cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 8618-8621.
- Jessel, N. B., Schwinté, P., Donohue, R., Lavalle, P., Boulmedais, F., Darcy, R., Szalontai, B., Voegel, J.-C., and Ogier, J. (2004). "Pyridylamino-beta-cyclodextrin as a molecular chaperone for lipopolysaccharide embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture". *Advanced Functional Materials*, 14, 963-969.
- Jomaa, H. W., and Schlenoff, J. B. (2005). "Salt-induced polyelectrolyte interdiffusion in multilayered films: A neutron reflectivity study". *Macromolecules*, 38, 8473-8480.
- Jourdainne, L., Arntz, Y., Senger, B., Debry, C., Voegel, J. C., Schaaf, P., and Lavalle, P. (2007). "Multiple strata of exponentially growing polyelectrolyte multilayer films". *Macromolecules*, 40, 316-321.
- Jourdainne, L., Lecuyer, S., Arntz, Y., Picart, C., Schaaf, P., Senger, B., Voegel, J. C., Lavalle, P., and Charitat, T. (2008). "Dynamics of poly(L-lysine) in hyaluronic acid/poly(L-lysine) multilayer films studied by fluorescence recovery after pattern photobleaching". *Langmuir*, 24, 7842-7847.
- Kabanov, V. A. (1994a). "Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology". Springer-Verlag, New York.

- Kabanov, V. A. (1994b). "*Physicochemical basis and the prospects of using soluble interpolyelectrolyte complex(review)*". *Polymer science*, 36, 143-156.
- Kharlampieva, E., and Sukhishvili, S. A. (2003). "*Ionization and pH stability of multilayers formed by self- assembly of weak polyelectrolytes*". *Langmuir*, 19, 1235-1243.
- Kohler, K., Möhwald, H., and Sukhorukov, G. B. (2006). "*Thermal behavior of polyelectrolyte multilayer microcapsules: 2. Insight into molecular mechanisms for the PDADMAC/PSS system*". *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 24002-24010.
- Koktysh, D. S., Liang, X. R., Yun, B. G., Pastoriza-Santos, I., Matts, R. L., Giersig, M., Serra-Rodriguez, C., Liz-Marzan, L. M., and Kotov, N. A. (2002). "*Biomaterials by design: Layer-by-layer assembled ion-selective and biocompatible films of TiO<sub>2</sub> nanoshells for neurochemical monitoring*". *Advanced Functional Materials*, 12, 255-265.
- Korneeva, D., Lvov, Y., Decher, G., Schmitt, J., and Yaradaikin, S. (1995). "*Neutron reflectivity analysis of self-assembled film superlattices with alternate layers of deuterated and hydrogenated polystyrenesulfonate and polyallylamine*". *Physica B : Condensed matter*, 213-214, 954-956.
- Kotov, N. A. (1999). "*Layer-by-layer self-assembly: The contribution of hydrophobic interactions*". *Nanostructured Materials*, 12, 789-796.
- Kovacevic, D., Van der Burgh, S., De Keizer, A., and Stuart, M. A. C. (2003). "*Specific Ionic Effects on Weak Polyelectrolyte Multilayer Formation†*". *J. Phys. Chem. B*, 107, 7998-8002.
- Kulcsar, A., Voegel, J.-C., Schaaf, P., and Kekicheff, P. (2005). "*Glassy state of polystyrene sulfonate/polyallylamine polyelectrolyte multilayers revealed by the surface force apparatus*". *Langmuir*, 21, 1166-1170.
- Kwok, K. K., Groves, M. J., and Burgess, D. J. (1991). "*Production of 5–15 μm Diameter Alginate-Polylysine Microcapsules by an Air-Atomization Technique*". *Pharmaceutical research*, 8, 341-344.
- Ladam, G., Schaad, P., Voegel, J.-C., Schaaf, P., Decher, G., and Cuisinier, F. J. G. (2000). "*In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers*". *Langmuir*, 16, 1249-1255.
- Ladam, G., Schaaf, P., Cuisinier, F. J. G., Decher, G., and Voegel, J.-C. (2001). "*Protein Adsorption onto Auto-Assembled Polyelectrolyte Films*". *Langmuir*, 17, 878-882.
- Langer, R., and Vacanti, J. P. (1993). "*Tissue Engineering*". *Science*, 260, 920-926.
- Laugel, N., Betscha, C., Winterhalter, M., Voegel, J.-C., Schaaf, P., and Ball, V. (2006). "*Relationship between the growth regime of polyelectrolyte multilayers and the polyanion/polycation complexation enthalpy*". *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 19443-19449.

- Laurent, D., and Schlenoff, J. B. (1997). "Multilayer Assemblies of Redox Polyelectrolytes". *Langmuir*, 13, 1552-1557.
- Lavalle, P., Gergely, C., Cuisinier, F. J. G., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Picart, C. (2002). "Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: An in situ atomic force microscopy study". *Macromolecules*, 35, 4458 -4465.
- Lavalle, P., Picart, C., Mutterer, J., Gergely, C., Reiss, H., Voegel, J.-C., Senger, B., and Schaaf, P. (2004). "Modeling the buildup of polyelectrolyte multilayer films having exponential growth". *Journal of Physical Chemistry B*, 108, 635-648.
- Lavik, E., and Langer, R. (2004). "Tissue engineering: current state and perspectives". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 1-8.
- Lee, K. Y., and Mooney, D. J. (2001). "Hydrogels for tissue engineering". *Chemical Reviews*, 101, 1869-1879.
- LeGeros, R. Z. (2002). "Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates". *Clinical Orthopaedics and Related Research* 81-98.
- Leguen, E., Chassepot, A., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Jessel, N. (2007). "Bioactive coatings based on polyelectrolyte multilayer architectures functionalized by embedded proteins, peptides or drugs". *Biomolecular Engineering*, 24, 33-41.
- Leinfelder, U., Brunnenmeier, F., Cramer, H., Schiller, J., Arnold, K., Vasquez, J. A., and Zimmermann, U. (2003). "A highly sensitive cell assay for validation of purification regimes of alginates". *Biomaterials*, 24, 4161-4172.
- Leontidis, E. (2002). "Hofmeister anion effects on surfactant self-assembly and the formation of mesoporous solids". *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7, 81-91.
- LeRoux, M. A., Guilak, F., and Setton, L. A. (1999). "Compressive and shear properties of alginate gel: Effects of sodium ions and alginate concentration". *Journal of Biomedical Materials Research*, 47, 46-53.
- Li, Z. S., Ramay, H. R., Hauch, K. D., Xiao, D. M., and Zhang, M. Q. (2005). "Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering". *Biomaterials*, 26, 3919-3928.
- Lim, F., and Sun, A. M. (1980). "Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas". *Science*, 210, 908-910.
- Liu, A. H., Kashiwagi, Y., and Anzai, J. (2003). "Polyelectrolyte multilayer films containing ferrocene: Effects of polyelectrolyte type and ferrocene contents in the film on the redox properties". *Electroanalysis*, 15, 1139-1142.

- Lösche, M., Schmitt, J., Decher, G., Bouwman, W. G., and Kjaer, K. (1998). "*Detailed Structure of Molecularly Thin Polyelectrolyte Multilayer Films on Solid Substrates as Revealed by Neutron Reflectometry*". *Macromolecules*, 31, 8893-8906.
- Lu, H. Y., and Hu, N. F. (2006). "*Loading behavior of {chitosan/hyaluronic acid}(n) layer-by-layer assembly films toward myoglobin: An electrochemical study*". *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 23710-23718.
- Lutkenhaus, J. L., McEnnis, K., and Hammond, P. T. (2008). "*Nano- and microporous layer-by-layer assemblies containing linear poly(ethylenimine) and poly(acrylic acid)*". *Macromolecules*, 41, 6047-6054.
- Lvov, Y., Ariga, K., Onda, M., Ichinose, I., and Kunitake, T. (1997). "*Alternate assembly of ordered multilayers of SiO<sub>2</sub> and other nanoparticles and polyions*". *Langmuir*, 13, 6195-6203.
- Lvov, Y., Ariga, K., Onda, M., Ichinose, I., and Kunitake, T. (1999). "*A careful examination of the adsorption step in the alternate layer-by-layer assembly of linear polyanion and polycation*". *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 146, 337-346.
- Lvov, Y., Decher, G., and Möhwald, H. (1993). "*Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine)*". *Langmuir*, 9, 481.
- Lvov, Y., Haas, H., Decher, G., Mohwald, H., Mikhailov, A., Mtchedlishvily, B., Morgunova, E., and Vainshtein, B. (1994). "*Successive Deposition of Alternate Layers of Polyelectrolytes and a Charged Virus*". *Langmuir*, 10, 4232-4236.
- Lvov, Y., Katsuhiko, A., Izumi, I., and Toyoki, K. (1996a). "*Molecular film assembly via layer-by-layer adsorption of oppositely charged macromolecules (linear polymer, protein and clay) and concanavalin A and glycogen*". *Thin Solid Films*, 284-285, 797-801.
- Lvov, Y., Onda, M., Ariga, K., Ichinose, I., and Kunitake, T. (1996b). "*Assembly of multiprotein ultrathin films by means of alternate adsorption with electrostatic or biospecific driving forces*". *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 212, 10.
- MacIntosh, A. C., Kearns, V. R., Crawford, A., and Hatton, P. V. (2008). "*Skeletal tissue engineering using silk biomaterials*". *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2, 71-80.
- MacNeil, S. (2007). "*Progress and opportunities for tissue-engineered skin*". *Nature*, 445, 874-880.
- Mamedov, A. A., Kotov, N. A., Prato, M., Guldi, D. M., Wicksted, J. P., and Hirsch, A. (2002). "*Molecular design of strong single-wall carbon nanotube/polyelectrolyte multilayer composites*". *Nature Materials*, 1, 190-194.

- Marijnissen, W. J. C. M., van Osch, G. J. V. M., Aigner, J., Verwoerd-Verhoef, H. L., and Verhaar, J. A. N. (2000). "*Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined in vivo with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM)*". *Biomaterials*, 21, 571-580.
- Martinsen, A., Skjakbraek, G., and Smidsrod, O. (1989). "*Alginate as Immobilization Material .1. Correlation between Chemical and Physical-Properties of Alginate Gel Beads*". *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 79-89.
- Martinsen, A., Skjakbraek, G., Smidsrod, O., Zanetti, F., and Paoletti, S. (1991). "*Comparison of Different Methods for Determination of Molecular-Weight and Molecular-Weight Distribution of Alginates*". *Carbohydrate polymers*, 15, 171-193.
- Martinsen, A., Storro, I., and Skjakbraek, G. (1992). "*Alginate as Immobilization Material .3. Diffusional Properties*". *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 186-194.
- McAloney, R. A., Sinyor, M., Dudnik, V., and Goh, M. C. (2001). "*Atomic force microscopy studies of salt effects on polyelectrolyte multilayer film morphology*". *Langmuir*, 17, 6655-6663.
- Mendelsohn, J. D., Barrett, C. J., Chan, V. V., Pal, A. J., Mayes, A. M., and Rubner, M. F. (2000). "*Fabrication of Microporous Thin Films from Polyelectrolyte Multilayers*". *Langmuir*, 16, 5017 -5023.
- Merceron, C., Vinatier, C., Clouet, J., Collic-Jouault, S., Weiss, P., and Guicheux, J. (2008). "*Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering*". *Joint Bone Spine*, 75, 672-674.
- Mermut, O., Lefebvre, J., Gray, D. G., and Barrett, C. J. (2003). "*Structural and mechanical properties of polyelectrolyte multilayer films studied by AFM*". *Macromolecules*, 36, 8819-8824.
- Mertz, D., Hemmerlé, J., Boulmedais, F., Voegel, J.-C., Lavallo, P., and Schaaf, P. (2007). "*Polyelectrolyte multilayer films under mechanical stretch*". *Soft Matter*, 3, 1413-1420.
- Michaels, A. S., and Miekka, R. G. (1961). "*Polycation-polyanion complexes: Preparation and properties of poly-(vinylbenzyltrimethylammonium) poly-(styrenesulfonate)*". *The Journal of Physical Chemistry*, 65, 1765-1773.
- Moby, V., Boura, C., Kerdjoudj, H., Voegel, J. C., Marchal, L., Dumas, D., Schaaf, P., Stoltz, J. F., and Menu, P. (2007). "*Poly(styrenesulfonate)/Poly(allylamine) multilayers: A route to favor endothelial cell growth on expanded poly(tetrafluoroethylene) vascular grafts*". *Biomacromolecules*, 8, 2156-2160.
- Mosahebi, A., Fuller, P., Wiberg, M., and Terenghi, G. (2002). "*Effect of allogeneic Schwann cell transplantation on peripheral nerve regeneration*". *Experimental Neurology*, 173, 213-223.

- Mosahebi, A., Wiberg, M., and Terenghi, G. (2003). "*Addition of fibronectin to alginate matrix improves peripheral nerve regeneration in tissue-engineered conduits*". *Tissue Engineering*, 9, 209-218.
- Mueller, R., Kohler, K., Weinkamer, R., Sukhorukov, G., and Fery, A. (2005). "*Melting of PDADMAC/PSS capsules investigated with AFM force spectroscopy*". *Macromolecules*, 38, 9766-9771.
- Muller, M., Rieser, T., Dubin, P. L., and Lunkwitz, K. (2001). "*Selective interaction between proteins and the outermost surface of polyelectrolyte multilayers: Influence of the polyanion type, pH and salt*". *Macromolecular Rapid Communications*, 22, 390-395.
- Muller, M., Rieser, T., Lunkwitz, K., and Meier-Haack, J. (1999). "*Polyelectrolyte complex layers : a promising concept for anti-fouling coatings verified by in situ ATR-FITR spectroscopy*". *Macromolecular Rapid Communications*, 20, 607-611.
- Muller, M., Voros, J., Csucs, G., Walter, E., Danuser, G., Merkle, H. P., Spencer, N. D., and Textor, M. (2003). "*Surface modification of PLGA microspheres*". *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 66A, 55-61.
- Narvaez, A., Suarez, G., Popescu, I. C., Katakis, I., and Dominguez, E. (2000). "*Reagentless biosensors based on self-deposited redox polyelectrolyte-oxidoreductases architectures*". *Biosensors and Bioelectronics*, 15, 43-52.
- Nazaran, P., Bosio, V., Jaeger, W., Anghel, D. F., and von Klitzing, R. (2007). "*Lateral mobility of polyelectrolyte chains in multilayers*". *Journal of Physical Chemistry B*, 111, 8572-8581.
- Neiser, S., Draget, K. I., and Smidsrod, O. (1999). "*Interactions in bovine serum albumin-calcium alginate gel systems*". *Food Hydrocolloids*, 13, 445-458.
- Netzer, L., and Sagiv, J. (1983). "*A new approach to construction of artificial monolayer assemblies*". *Journal of the American Chemical Society*, 105, 674-676.
- Novikov, L. N., Novikova, L. N., Mosahebi, A., Wiberg, M., Terenghi, G., and Kellerth, J. O. (2002). "*A novel biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury*". *Biomaterials*, 23, 3369-76.
- Onda, M., Lvov, Y., Ariga, K., and Kunitake, T. (1996a). "*Sequential actions of glucose oxidase and peroxidase in molecular films assembled by layer-by-layer alternate adsorption*". *Biotechnology and Bioengineering*, 51, 163-167.
- Onda, M., Lvov, Y., Ariga, K., and Kunitake, T. (1996b). "*Sequential reaction and product separation on molecular films of glucoamylase and glucose oxidase assembled on an ultrafilter*". *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, 502-506.
- Park, M. K., Deng, S. X., and Advincula, R. C. (2004). "*pH-sensitive bipolar ion-permselective ultrathin films*". *Journal of the American Chemical Society*, 126, 13723-13731.

- Philipp, B., Dautzenberg, H., Linow, K. J., Koetz, J., and Dawydoff, W. (1989). "*Polyelectrolyte complexes: recent developments and open problems*". Progress in polymer science, 14, 91-172.
- Picart, C., Elkaim, R., Richert, L., Audoin, T., Arntz, Y., Cardoso, M. D., Schaaf, P., Voegel, J. C., and Frisch, B. (2005a). "*Primary cell adhesion on RGD-functionalized and covalently crosslinked thin polyelectrolyte multilayer films*". Advanced Functional Materials, 15, 83-94.
- Picart, C., Lavalle, P., Hubert, P., Cuisinier, F. J. G., Decher, G., Schaaf, P., and Voegel, J.-C. (2001). "*Buildup mechanism for poly(L-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface*". Langmuir, 17, 7414-7424.
- Picart, C., Mutterer, J., Arntz, Y., Voegel, J. C., Schaaf, P., and Senger, B. (2005b). "*Application of fluorescence recovery after photobleaching to diffusion of a polyelectrolyte in a multilayer film*". Microscopy Research and Technique, 66, 43-57.
- Picart, C., Mutterer, J., Richert, L., Luo, Y., Prestwich, G. D., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Lavalle, P. (2002). "*Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers*". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 12531-12535.
- Porcel, C., Izquierdo, A., Ball, V., Decher, G., Voegel, J.-C., and Schaaf, P. (2005). "*Ultrathin coatings and (poly(glutamic acid)/polyallylamine) films deposited by continuous and simultaneous spraying*". Langmuir, 21, 800-802.
- Porcel, C., Lavalle, P., Ball, V., Decher, G., Senger, B., Voegel, J.-C., and Schaaf, P. (2006). "*From exponential to linear growth in polyelectrolyte multilayers*". Langmuir, 22, 4376-4383.
- Porcel, C., Lavalle, P., Decher, G., Senger, B., Voegel, J.-C., and Schaaf, P. (2007). "*Influence of the polyelectrolyte molecular weight on exponentially growing multilayer films in the linear regime*". Langmuir, 23, 1898-1904.
- Ramsden, J. J., Lvov, Y. M., and Decher, G. (1995). "*Determination of optical constants of molecular films assembled via alternate polyion adsorption*". Thin Solid Films, 254, 246-251.
- Ratner, B. D. (1996). "*The engineering of biomaterials exhibiting recognition and specificity*". Journal of Molecular Recognition, 9, 617-25.
- Ratner, B. D., and Bryant, S. J. (2004). "*Biomaterials: Where we have been and where we are going*". Annual Review of Biomedical Engineering, 6, 41-75.
- Ribeiro, A. J., Silva, C., Ferreira, D., and Veiga, F. (2005). "*Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique*". European Journal of Pharmaceutical Sciences, 25, 31-40.

- Ribeiro, C. C., Barrias, C. C., and Barbosa, M. A. (2004). "Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices". *Biomaterials*, 25, 4363-4373.
- Richert, L., Boulmedais, F., Lavallo, P., Mutterer, J., Ferreux, E., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Picart, C. (2004a). "Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking". *Biomacromolecules*, 5, 284-294.
- Richert, L., Engler, A. J., Discher, D. E., and Picart, C. (2004b). "Elasticity of native and cross-linked polyelectrolyte multilayer films". *Biomacromolecules*, 5, 1908-1916.
- Richert, L., Lavallo, P., Payan, E., Shu, X. Z., Prestwich, G. D., Stoltz, J.-F., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Picart, C. (2004c). "Layer by layer buildup of polysaccharide films: Physical chemistry and cellular adhesion aspects". *Langmuir*, 20, 448-458.
- Richert, L., Lavallo, P., Vautier, D., Senger, B., Stoltz, J.-F., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Picart, C. (2002). "Cell Interactions with polyelectrolyte multilayer films". *Biomacromolecules*, 3, 1170-1178.
- Rimmer, S., Johnson, C., Zhao, B., Collier, J., Gilmore, L., Sabnis, S., Wyman, P., Sammon, C., Fullwood, N. J., and MacNeil, S. (2007). "Epithelialization of hydrogels achieved by amine functionalization and co-culture with stromal cells". *Biomaterials*, 28, 5319-5331.
- Rinckenbach, S., Hemmerle, J., Dieval, F., Arntz, Y., Kretz, J. G., Durand, B., Chakfe, N., Schaaf, P., Voegel, J. C., and Vautier, D. (2008). "Characterization of polyelectrolyte multilayer films on polyethylene terephthalate vascular prostheses under mechanical stretching". *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 84, 576-588.
- Rmaile, H. H., Farhat, T. R., and Schlenoff, J. B. (2003). "H-P-gated permeability of variably charged species through polyelectrolyte multilayer membranes". *Journal of Physical Chemistry B*, 107, 14401-14406.
- Roberts, S. J., Howard, D., Buttery, L. D., and Shakesheff, K. M. (2008). "Clinical applications of musculoskeletal tissue engineering". *British Medical Bulletin*, 86, 7-22.
- Rodriguez, L. N. J., De Paul, S. M., Barrett, C. J., Reven, L., and Spiess, H. W. (2000). "Fast Magic-Angle Spinning and Double-Quantum  $^1\text{H}$  Solid-State NMR Spectroscopy of Polyelectrolyte Multilayers". *Advanced Materials*, 12, 1934 - 1938.
- Rokstad, A. M., Strand, B., Rian, K., Steinkjer, B., Kulseng, B., Skjak-Braek, G., and Espevik, T. (2003). "Evaluation of different types of alginate microcapsules as bioreactors for producing endostatin". *Cell Transplantation*, 12, 351-364.
- Rowley, J. A., Madlambayan, G., and Mooney, D. J. (1999). "Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials". *Biomaterials*, 20, 45-53.

- Rowley, J. A., and Mooney, D. J. (2002). "Alginate type and RGD density control myoblast phenotype". *Journal of Biomedical Materials Research*, 60, 217-223.
- Salomaki, M., Laiho, T., and Kankare, J. (2004a). "Counteranion-controlled properties of polyelectrolyte multilayers". *Macromolecules*, 37, 9585-9590.
- Salomaki, M., Tervasmaki, P., Areva, S., and Kankare, J. (2004b). "The Hofmeister anion effect and the growth of polyelectrolyte multilayers". *Langmuir*, 20, 3679-3683.
- Salomaki, M., Vinokurov, I. A., and Kankare, J. (2005). "Effect of temperature on the buildup of polyelectrolyte multilayers". *Langmuir*, 21, 11232-11240.
- Saude, N., Cheze-Lange, H., Beunard, D., Dhulster, P., Guillochon, D., Caze, A. M., Morcellet, M., and Junter, G. A. (2002). "Alginate production by *Azotobacter vinelandii* in a membrane bioreactor". *Process Biochemistry*, 38, 273-278.
- Schlenoff, J. B., and Dubas, S. T. (2001). "Mechanism of Polyelectrolyte Multilayer Growth: Charge Overcompensation and Distribution". *Macromolecules*, 34, 592-598.
- Schlenoff, J. B., Dubas, S. T., and Farhat, T. (2000). "Sprayed polyelectrolyte multilayers". *Langmuir*, 16, 9968-9969.
- Schmitt, J., Grünewald, T., Kjaer, K., Pershan, P., Decher, G., and Lösche, M. (1993). "Internal structure of layer-by-layer adsorbed polyelectrolyte films: a neutron and x-ray reflectivity study". *Macromolecules*, 26, 7058-7063.
- Schneider, A., Francius, G., Obeid, R., Schwinte, P., Hemmerle, J., Frisch, B., Schaaf, P., Voegel, J. C., Senger, B., and Picart, C. (2006). "Polyelectrolyte multilayers with a tunable Young's modulus: Influence of film stiffness on cell adhesion". *Langmuir*, 22, 1193-1200.
- Schneider, G., and Decher, G. (2004). "From functional core/shell nanoparticles prepared via layer-by-layer deposition to empty nanospheres". *Nano Letters*, 4, 1833-1839.
- Schwinté, P., Ball, V., Szalontai, B., Haikel, Y., Voegel, J.-C., and Schaaf, P. (2002). "Secondary structure of proteins adsorbed onto or embedded in polyelectrolyte multilayers". *Biomacromolecules*, 3, 1135-1143.
- Schwinté, P., Voegel, J.-C., Picart, C., Haikel, Y., Schaaf, P., and Szalontai, B. (2001). "Stabilizing Effects of Various Polyelectrolyte Multilayer Films on the Structure of Adsorbed/Embedded Fibrinogen Molecules: An ATR-FTIR Study". *Journal of Physical Chemistry B*, 105, 11906-11916.
- Seely, G. R., and Hart, R. L. (1974). "The binding of alkaline earth metal ions to alginate". *Macromolecules*, 7, 706-710.

- Seo, J., Lutkenhaus, J. L., Kim, J., Hammond, P. T., and Char, K. (2008). "*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*, 24, 7995-8000.
- Serpe, M. J., Yarmey, K. A., Nolan, C. M., and Lyon, L. A. (2005). "*Doxorubicin uptake and release from microgel thin films*". *Biomacromolecules*, 6, 408-413.
- Shi, F. X., Wasungu, L., Nomden, A., Stuart, M. C. A., Polushkin, E., Engberts, J. B. F. N., and Hoekstra, D. (2002). "*Interference of poly(ethylene glycol)-lipid analogues with cationic-lipid-mediated delivery of oligonucleotides; role of lipid exchangeability and non-lamellar transitions*". *Biochemical Journal*, 366, 333-341.
- Shin, H., Jo, S., and Mikos, A. G. (2003). "*Biomimetic materials for tissue engineering*". *Biomaterials*, 24, 4353-4364.
- Shiratori, S. S., and Rubner, M. F. (2000). "*pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes*". *Macromolecules*, 33, 4213-4219.
- Shoichet, M. S., Li, R. H., White, M. L., and Winn, S. R. (1996). "*Stability of hydrogels used in cell encapsulation: An in vitro comparison of alginate and agarose*". *Biotechnology and Bioengineering*, 50, 374-381.
- Simmons, C. A., Alsberg, E., Hsiong, S., Kim, W. J., and Mooney, D. J. (2004). "*Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells*". *Bone*, 35, 562-569.
- Smidsrød, O. (1974). "*Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state*". *Faraday discussions of the Chemical Society*, 57, 263-274.
- Smidsrod, O., Glover, R. M., and Whittington, S. G. (1973). "*The relative extension of alginates having different chemical composition*". *Carbohydrate Research*, 27, 107-18.
- Smidsrod, O., Haug, A., and Whittington, S. G. (1972). "*The molecular basis for some physical properties of polyuronides*". *Acta Chemica Scandinavica*, 26, 2563-2566.
- Smidsrod, O., and Painter, T. (1973). "*Effect of periodate oxidation upon the stiffness of the alginate molecule in solution*". *Carbohydr. Res*, 26, 125-132.
- Smith, R. N., Reven, L., and Barrett, C. J. (2003). "*<sup>13</sup>C Solid-State NMR Study of Polyelectrolyte Multilayers*". *Macromolecules*, 36, 1876-1881.
- Sotome, S., Uemura, T., Kikuchi, M., Chen, J., Itoh, S., Tanaka, J., Tateishi, T., and Shinomiya, K. (2004). "*Synthesis and in vivo evaluation of a novel hydroxyapatite/collagen-alginate as a bone filler and a drug delivery carrier of bone morphogenetic protein*". *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, 24, 341-347.

- Sriamornsak, P., and Kennedy, R. A. (2006). "*Development of polysaccharide gel-coated pellets for oral administration 2. Calcium alginate*". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29, 139-147.
- Stabler, C., Wilks, K., Sambanis, A., and Constantinidis, I. (2001). "*The effects of alginate composition on encapsulated beta TC3 cells*". *Biomaterials*, 22, 1301-1310.
- Steitz, R., Jaeger, W., and von Klitzing, R. (2001). "*Influence of charge density and ionic strength on the multilayer formation of strong polyelectrolytes*". *Langmuir*, 17, 4471-4474.
- Stevens, M. M., Qanadilo, H. F., Langer, R., and Shastri, V. P. (2004). "*A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering*". *Biomaterials*, 25, 887-894.
- Stokke, B. T., Smidsrod, O., Bruheim, P., and Skjakbraek, G. (1991). "*Distribution of Uronate Residues in Alginate Chains in Relation to Alginate Gelling Properties*". *Macromolecules*, 24, 4637-4645.
- Stokke, B. T., Smidsrod, O., Zanetti, F., Strand, W., and Skjakbraek, G. (1993). "*Distribution of Uronate Residues in Alginate Chains in Relation to Alginate Gelling Properties .2. Enrichment of Beta-D-Mannuronic Acid and Depletion of Alpha-L-Guluronic Acid in Sol Fraction*". *Carbohydrate polymers*, 21, 39-46.
- Strand, B. L., Ryan, L., Veld, P. I., Kulseng, B., Rokstad, A. M., Skjak-Braek, G., and Espevik, T. (2001). "*Poly-L-lysine induces fibrosis on alginate microcapsules via the induction of cytokines*". *Cell Transplantation*, 10, 263-275.
- Stuart, C., Klein, M. W., Krausch, G., Cosgrove, T., Everett, D. H., Ottewill, R. H., Shull, K. R., Jones, R. A. L., Zachmann, H. G., and Ryan, A. J. (1994). "*Polymers at Surfaces and Interfaces - Discussion*". *Faraday Discussions*, 98, 231-244.
- Sugiura, S., Oda, T., Izumida, Y., Aoyagi, Y., Satake, M., Ochiai, A., Ohkohchi, N., and Nakajima, M. (2005). "*Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array*". *Biomaterials*, 26, 3327-3331.
- Sugiyama, S., Fujii, M., Hayashi, H., and Kusakabe, K. (2004). "*Revised preparation procedure of calcium hydroxyapatite with sol consisting of sodium alginate and sodium diphosphate*". *Inorganic Chemistry Communications*, 7, 569-571.
- Sui, Z. J., Salloum, D., and Schlenoff, J. B. (2003). "*Effect of molecular weight on the construction of polyelectrolyte multilayers: Stripping versus sticking*". *Langmuir*, 19, 2491-2495.
- Sui, Z. J., and Schlenoff, J. B. (2004). "*Phase separations in pH-responsive polyelectrolyte multilayers: Charge extrusion versus charge expulsion*". *Langmuir*, 20, 6026-6031.

- Sukhishvili, S. A. (2005). "*Responsive polymer films and capsules via layer-by-layer assembly*". *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10, 37-44.
- Sukhishvili, S. A., and Granick, S. (2000). "*Layered, erasable, ultrathin polymer films*". *Journal of the American Chemical Society*, 122, 9550-9551.
- Sukhishvili, S. A., and Granick, S. (2002). "*Layered, erasable polymer multilayers formed by hydrogen-bonded sequential self-assembly*". *Macromolecules*, 35, 301-310.
- Sukhishvili, S. A., Kharlampieva, E., and Izumrudov, V. (2006). "*Where polyelectrolyte multilayers and polyelectrolyte complexes meet*". *Macromolecules*, 39, 8873-8881.
- Sukhorukov, G. B., Fery, A., Brumen, M., and Mohwald, H. (2004). "*Physical chemistry of encapsulation and release*". *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6, 4078-4089.
- Sukhorukov, G. B., Möhwald, H., Decher, G., and Lvov, Y. M. (1996). "*Assembly of polyelectrolyte multilayer films by consecutively alternating adsorption of polynucleotides and polycations*". *Thin Solid Films*, 284-285, 220-223.
- Sutherland, I. W. (1991). "*Biomaterials: Novel materials from biological sources*". Macmillan, New York.
- Tampieri, A., Sandri, M., Landi, E., Celotti, G., Roveri, N., Mattioli-Belmonte, M., Virgili, L., Gabbanelli, F., and Biagini, G. (2005). "*HA/alginate hybrid composites prepared through bio-inspired nucleation*". *Acta Biomaterialia*, 1, 343-351.
- Tan, H. L., McMurdo, M. J., Pan, G. Q., and Van Patten, P. G. (2003). "*Temperature dependence of polyelectrolyte multilayer assembly*". *Langmuir*, 19, 9311-9314.
- Tang, Z. Y., Kotov, N. A., Magonov, S., and Ozturk, B. (2003). "*Nanostructured artificial nacre*". *Nature Materials*, 2, 413-U8.
- Thierry, B., Winnik, F. M., Merhi, Y., and Tabrizian, M. (2003). "*Nanocoatings onto arteries via layer-by-layer deposition: Toward the in vivo repair of damaged blood vessels*". *Journal of the American Chemical Society*, 125, 7494-7495.
- Thu, B., Bruheim, P., Espevik, T., Smidsrod, O., SoonShiong, P., and SkjakBraek, G. (1996). "*Alginate polycation microcapsules .1. Interaction between alginate and polycation*". *Biomaterials*, 17, 1031-1040.
- Tsuchida, E., and Abe, K. (1982). "*Interactions between macromolecules in solution and intermacromolecular complexes*". Springer-Verlag, Heidelberg.
- Tuli, R., Li, W. J., and Tuan, R. S. (2003). "*Current state of cartilage tissue engineering*". *Arthritis Research & Therapy*, 5, 235-238.

- Vacanti, J. P., and Langer, R. (1999). "*Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation*". *Lancet*, 354, Si32-Si34.
- Van Osch, G. J. V. M., Van der Veen, S. W., Marijnissen, W. J. C. M., and Verhaar, J. A. N. (2001). "*Monoclonal antibody 11-fibrau: A useful marker to characterize chondrocyte differentiation stage*". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280, 806-812.
- Vandenbossche, G. M. R., Bracke, M. E., Cuvelier, C. A., Bortier, H. E., Mareel, M. M., and Remon, J. P. (1993a). "*Host-Reaction against Alginate-Polylysine Microcapsules Containing Living Cells*". *Journal of pharmacy and pharmacology*, 45, 121-125.
- Vandenbossche, G. M. R., Bracke, M. E., Cuvelier, C. A., Bortier, H. E., Mareel, M. M., and Remon, J. P. (1993b). "*Host-Reaction against Empty Alginate-Polylysine Microcapsules - Influence of Preparation Procedure*". *Journal of pharmacy and pharmacology*, 45, 115-120.
- Vautier, D., Hemmerle, J., Vodouhe, C., Koenig, G., Richert, L., Picart, C., Voegel, J. C., Debry, C., Chluba, J., and Ogier, J. (2003). "*3-D surface charges modulate protrusive and contractile contacts of chondrosarcoma cells*". *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 56, 147-158.
- Vazquez, E., Dewitt, D. M., Hammond, P. T., and Lynn, D. M. (2002). "*Construction of hydrolytically-degradable thin films via layer-by-layer deposition of degradable polyelectrolytes*". *Journal of the American Chemical Society*, 124, 13992-13993.
- Velings, N. M., and Mestdagh, M. M. (1995). "*Physicochemical Properties of Alginate Gel Beads*". *Polymer Gels and Networks*, 3, 311-330.
- Vodouhe, C., Le Guen, E., Garza, J. M., Francius, G., Dejognat, C., Ogier, J., Schaaf, P., Voegel, J. C., and Lavalley, P. (2006). "*Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films*". *Biomaterials*, 27, 4149-4156.
- Vodouhe, C., Schmittbuhl, M., Boulmedais, F., Bagnard, D., Vautier, D., Schaaf, P., Egles, C., Voegel, J. C., and Ogier, J. (2005). "*Effect of functionalization of multilayered polyelectrolyte films on motoneuron growth*". *Biomaterials*, 26, 545-554.
- Voigt, U., Jaeger, W., Findenegg, G. H., and Klitzing, R. V. (2003a). "*Charge effects on the formation of multilayers containing strong polyelectrolytes*". *Journal of Physical Chemistry B*, 107, 5273-5280.
- Voigt, U., Khrenov, V., Thuer, K., Hahn, M., Jaeger, W., and von Klitzing, R. (2003b). "*The effect of polymer charge density and charge distribution on the formation of multilayers*". *Journal of Physics-Condensed Matter*, 15, S213-S218.
- Von Klitzing, R. (2006). "*Internal structure of polyelectrolyte multilayer assemblies*". *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8, 5012-5033.

- Wang, L. Y., Wang, Z. Q., Zhang, X., and Shen, J. C. (1997). "A new approach for the fabrication of an alternating multilayer film of poly(4-vinylpyridine) and poly(acrylic acid) based on hydrogen bonding". *Macromolecular Rapid Communications*, 18, 509-514.
- Welsh, E. R., Schauer, C. L., Qadri, S. B., and Price, R. R. (2002). "Chitosan cross-linking with a water-soluble, blocked diisocyanate. I. Solid state". *Biomacromolecules*, 3, 1370-1374.
- Wong, M. (2004). "Alginates in Tissue Engineering". *Biopolymer Methods in Tissue Engineering*, A. P. Hollander and P. V. Hatton, eds., Humana Press, Totowa, New Jersey, 77-86.
- Wood, K. C., Chuang, H. F., Batten, R. D., Lynn, D. M., and Hammond, P. T. (2006). "Controlling interlayer diffusion to achieve sustained, multiagent delivery from layer-by-layer thin films". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 10207-10212.
- Wood, K. C., Zacharia, N. S., Schmidt, D. J., Wrightman, S. N., Andaya, B. J., and Hammond, P. T. (2008). "Electroactive controlled release thin films". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 2280-2285.
- Yoo, D., Shiratori, S. S., and Rubner, M. F. (1998). "Controlling bilayer composition and surface wettability of sequentially adsorbed multilayers of weak polyelectrolytes". *Macromolecules*, 31, 4309-4318.
- Zilberman, M., and Eberhart, R. C. (2006). "Drug-eluting bioresorbable stents for various applications". *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8, 153-180.
- Zimmermann, U., Klock, G., Federlin, K., Hannig, K., Kowalski, M., Bretzel, R. G., Horcher, A., Entenmann, H., Sieber, U., and Zekorn, T. (1992). "Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis". *Electrophoresis*, 13, 269-74.

---

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

---

<b>II.1 Matériel.....</b>	<b>102</b>
II.1.1 Les polyélectrolytes .....	102
II.1.2 Alginate de sodium .....	104
<b>II.2 Préparation des échantillons .....</b>	<b>108</b>
II.2.1 Les substrats utilisés.....	109
II.2.2 Procédés de construction des films multicouches.....	109
II.2.3 Procédés de construction des architectures microstratifiés.....	113
<b>II.3 Méthodes de caractérisation et d'analyse .....</b>	<b>113</b>
II.3.1 Microscopie confocale à balayage laser .....	113
II.3.2 Microbalance à cristal de quartz .....	117
II.3.3 Fluorimétrie.....	122
II.3.4 Spectroscopie UV-visible .....	124
<b>II.4 Références bibliographiques .....</b>	<b>127</b>

---

## II.1 Matériel

Les espèces chimiques utilisées durant cette thèse, ont été fournies principalement par :

- ↳ Sigma-Aldrich, S<sup>t</sup>. Quentin Fallavier, France.
- ↳ VWR International S.A.S., qui fournit les produits Merck et Prolabo, Strasbourg, France.
- ↳ Alfa Aeser, Karlsruhe, Allemagne.
- ↳ Lifecore Biomedical, Chaska, Minnesota, Etats Unis.

### II.1.1 Les polyélectrolytes

Un polymère est une macromolécule, organique ou inorganique, constituée de l'enchaînement répété d'un même motif, le monomère (du grec monos : un seul ou une seule, et meros : partie), reliés les uns aux autres par des liaisons covalentes. Un polymère peut être naturel, obtenu par modification chimique d'un polymère naturel, ou bien entièrement synthétisé par polymérisation.

Les polyélectrolytes sont des polymères dont le monomère présente au moins un groupement ionique. Les polyélectrolytes chargés positivement sont appelés « polycations » et ceux chargés négativement sont appelés « polyanions ». Il existe des polyélectrolytes forts dont tous les monomères ionisables sont chargés quelle que soit la valeur du pH et des polyélectrolytes faibles, caractérisés par une constante de dissociation (pKa ou pKb) dans la gamme de 2 à 10. Ainsi, la densité de charge de ces polyélectrolytes faibles est fonction du pH.

De nombreux polyélectrolytes peuvent être utilisés pour construire des films multicouches. Les tableaux 2.1 et 2.2, récapitulent les différents polycations et polyanions utilisés au cours de ce travail de thèse.

Les masses molaires des polyélectrolytes, indiquées par les différents fournisseurs, sont définies ainsi:

- ↳  $M_v$  : La masse molaire moyenne viscosimétrique, mesurée par viscosité.
- ↳  $M_w$  : La masse molaire moyenne en masse, mesurée par diffusion de la lumière aux petits angles (DL) ou chromatographie de perméation sur gel (CPG).
- ↳  $M_n$  : La masse molaire moyenne en nombre, mesurée par chromatographie de perméation sur gel (CPG).

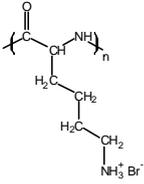
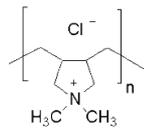
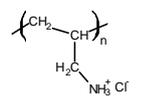
Nom des polyélectrolytes	Formule développée	Masse molaire $M_w$ (g/mol)	pKa du monomère	Fournisseur	Masse molaire de l'unité monomère
Poly(L-lysine) (PLL)		$M_w = 29\ 200$ (GPC)	10.5 (Kyte, 1995)	Aldrich	208 g/mol
Poly(diallyldiméthyl ammonium) (PDADMA)		$M_w = 936\ 000$ (GPC)	/	Aldrich	161 g/mol
Poly(allylamine) (PAH)		$M_w = 70\ 000$ (GPC)	10 (Yoo <i>et al.</i> , 1998)	Aldrich	93.15 g/mol

Tableau 2.1 : Polycations utilisés.

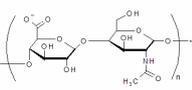
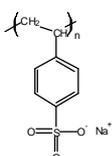
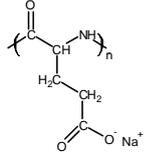
Nom des polyélectrolytes	Formule développée	Masse molaire $M_w$ (g/mol)	pKa du monomère	Fournisseur	Masse molaire de l'unité monomère
Acide Hyaluronique (HA)		$M_w = 381\ 000$ (GPC)	2.9 (Lapcik <i>et al.</i> , 1998)	Lifecore Biomedical	401 g/mol
Poly(styrène sulfonate) (PSS)		$M_w = 70\ 000$	/	Aldrich	206 g/mol
Poly(acide glutamique) (PGA)		$M_w = 47\ 500$	4.3 (Kyte, 1995)	Aldrich	151 g/mol

Tableau 2.2 : Polyanions utilisés.

Les polyélectrolytes utilisés dans la construction des films multicouches, ont été dissous dans une solution aqueuse de NaCl ou de CaCl<sub>2</sub>, préparée avec de l'eau ultra-pure (de résistivité 18.2 MΩ.cm, système Milli-Q-plus, Millipore) et tamponnée (sauf indication contraire) avec de l'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) (tampon HEPES 1mM/ NaCl ou CaCl<sub>2</sub> à différentes concentrations) ou du Tris (Tris (hydroxy méthyle) aminométhane) (Tampon tris 10 mM/ NaCl à différentes concentrations) (tableau 2.3). Le pH des solutions a été ajusté à 7.4 avec des solutions concentrées de HCl et de NaOH. Lors de notre travail, les solutions de polyélectrolytes ont été préparées à une concentration de 3. 10<sup>-3</sup> M (sauf indication contraire).

Nom du produit	Masse molaire (g/mol)	Fournisseur
Chlorure de sodium (NaCl)	58.44	Prolabo
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O)	107.02	Prolabo
Acide 4-(2-hydroxyéthyl) pipérazine éthane sulfonique (HEPES)	238.3	Prolabo
Tris (hydroxyméthyle) aminométhane (Tris)	121.14	Merck

**Tableau 2.3** : Produits chimiques utilisés pour la préparation des solutions tampon.

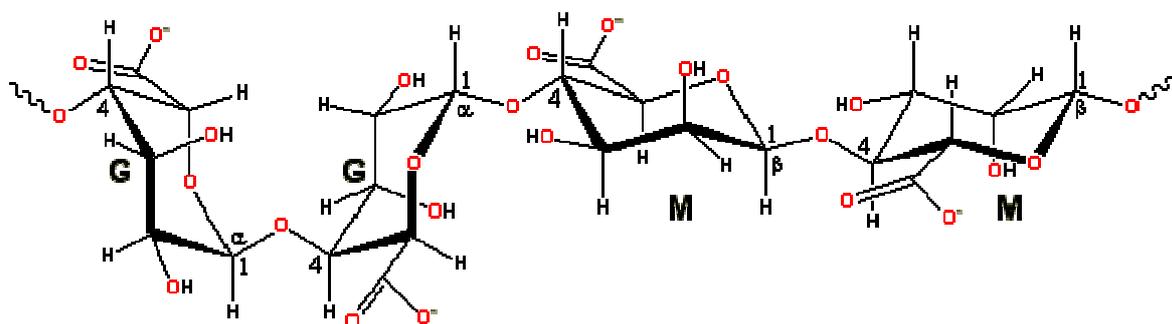
## II.1.2 Alginate de sodium

### II.1.2.1 Structure de l'alginate

L'alginate est un polysaccharide qui a été découvert par Stanford en 1881 dans l'algue *Laminaria digitata*, sous la forme d'acide alginique. L'alginate constitue une part importante de la structure membranaire des cellules des algues et il est produit presque uniquement par les algues brunes.

Les alginates sont des copolymères binaires linéaires dont les monomères, l'acide β-D-mannuronique (M) et l'acide α-L-guluronique (G), sont liés par des liaisons glycosidiques β-(1-4) et α-(1-4) (Fig. 2.1). Les motifs M et G sont organisés en blocs, formant ainsi des séquences répétitives donnant leurs propriétés aux chaînes d'alginate (Haug and Smidsrod, 1965).

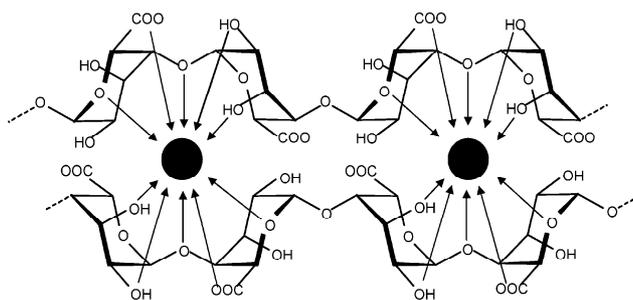
La structure des alginate dépend fortement du rapport M/G, c'est-à-dire le rapport du nombre de monomères mannuronate sur le nombre de monomères guluronate. Celui-ci varie selon l'origine de l'alginate et les traitements subis par celui-ci. Ce ratio est généralement situé entre 0.25 et 2.25 (Ji *et al.*, 1984). Par ailleurs, l'alginate est un polyélectrolyte du fait des charges négatives apportées par les fonctions carboxylate des monomères avec un pKa situé entre 3.38 et 3.65 (Simsek-Ege *et al.*, 2003). Chaque monomère ayant une charge négative, le degré de polymérisation moyen donne directement le nombre de charges négatives portées par la chaîne d'une molécule d'alginate.



**Figure 2.1 :** Schéma représentant la structure chimique de l'alginate. M est l'acide  $\beta$ -D-mannuronique, G est l'acide  $\alpha$ -L-guluronique, liés par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -(1-4) et  $\alpha$ -(1-4). Site internet : <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyalg.html>.

### II.1.2.2 Gélification de l'alginate

Les alginate ont la capacité de former des hydrogels en présence de cations divalents ou trivalents (Morris *et al.*, 1978). Cette méthode de gélification, dite ionotropique, met en jeu des interactions entre les charges des cations et les fonctions carboxylate et hydroxyle portées par les monomères G des chaînes d'alginate. La gélification de l'alginate de sodium en présence d'ions divalents se fait selon le modèle désigné par l'expression anglaise « egg-box model » (boîte à œufs) (Grant *et al.*, 1973). Généralement le sel de cation divalent le plus souvent utilisé pour la gélification de l'alginate est le chlorure de calcium  $\text{CaCl}_2$  (Draget *et al.*, 2001). La chélation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  par les monomères G permet de créer des zones de jonction stables. Ainsi, un cation  $\text{Ca}^{2+}$  peut interagir avec  $8 \pm 2$  résidus G (Fig. 2.2) (Stokke *et al.*, 1993).



**Figure 2.2 :** Schéma illustrant l'interaction entre les ions bivalents (en noir) et une paire de séquence d'acide L-gulonique (G) induisant ainsi à une gélification de l'alginate suivant le modèle « egg-box ». (Jorgensen *et al.*, 2007).

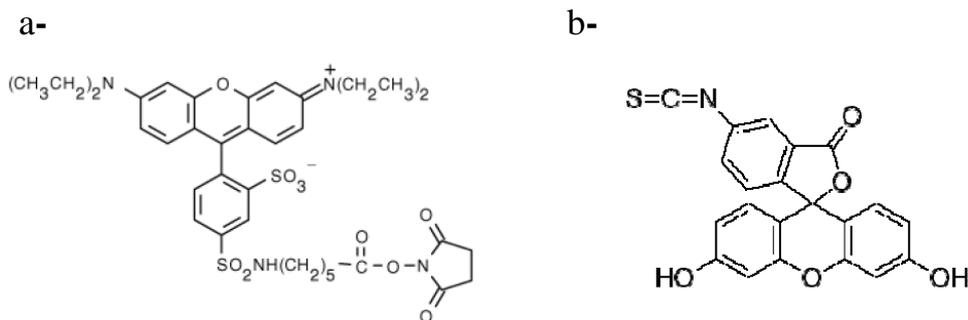
### II.1.2.3 Préparation d'une solution d'alginate de sodium

L'alginate utilisé, lors de ce travail de thèse, est un sel solide d'alginate de sodium de faible viscosité (*Low-viscosity sodium alginate*) produit par Alfa Aeser (référence: B25266).

L'alginate de sodium a été dissous à une concentration de 0.01 g/mL (1 % :  $\frac{\text{masse}}{\text{volume}}$ ) dans de l'eau ultra-pure. La solution d'alginate de sodium a été ensuite placée sous agitation vigoureuse pendant 14 heures.

### II.1.3 Polyélectrolytes fluorescents

Dans le cadre de la thèse, les films multicouches ont été caractérisés généralement à l'aide de la microscopie confocale à balayage laser. Pour cela, nous avons eu recours à des polyélectrolytes fluorescents. Ces polymères sont soit d'origine commerciale soit fonctionnalisés par des fluorophores. Dans les deux cas, le marquage de ces polyélectrolytes est réalisé par couplage covalent avec des sondes fluorescentes, la fluorescéine isothiocyanate, verte fluorescente (FITC, longueur d'onde d'absorption  $\lambda = 488$  nm/ d'émission  $\lambda = 520$  nm) ou encore la rhodamine succinimidyl ester, rouge fluorescente (Rho, longueur d'onde d'absorption  $\lambda = 570$  nm / d'émission  $\lambda = 595$  nm) (Fig. 2.3).



**Figure 2.3 :** Structures moléculaires des sondes fluorescentes greffées de façon covalente sur les polyélectrolytes. a), la rhodamine succinimidyl ester (excitation  $\lambda = 570$  nm/ émission  $\lambda = 595$  nm). b), la fluorescéine isothiocyanate (excitation  $\lambda = 488$  nm/ émission  $\lambda = 520$  nm).

### II.1.3.1 Protocole de marquage du HA à la FITC : ( $\text{HA}^{\text{FITC}}$ )

Pour réaliser le couplage de la FITC au HA, la fonction thiocyanate de la FITC réagit avec la fonction hydroxyle de l'acide hyaluronique. La réaction implique le carbone électrophile du groupe isothiocyanate, il en résulte la formation d'une liaison isothiourée permettant le couplage du fluorophore sur le polyélectrolyte.

Le couplage de la FITC au HA a été réalisé de la manière suivante : 41  $\mu\text{mol}$  de la FITC ont été dissoutes dans 2 mL de DMSO. Parallèlement, 0.31  $\mu\text{mol}$  de HA ont été dissous dans 18 mL d'eau ultra-pure. Le mélange des deux solutions est maintenu à pH 9 et mis sous agitation durant 12 heures à température ambiante. Par la suite, 40 mL d'eau ultra-pure sont rajoutés au mélange. La solution finale est dialysée pendant 6 jours contre 10 litres d'eau ultra-pure. Le taux de marquage du  $\text{HA}^{\text{FITC}}$  est de 0.01 %, c'est-à-dire, 0.0001 molécule de FITC pour un disaccharide).

### II.1.3.2 Protocole de marquage du PSS à la Rhodamine ( $\text{PSS}^{\text{Rho}}$ )

En ce qui concerne le poly(styrène sulfonate) marqué à la rhodamine ( $\text{PSS}^{\text{Rho}}$ ), la stratégie de couplage est différente. Le  $\text{PSS}^{\text{Rho}}$  a été synthétisé suivant le protocole suivant : 2.5 mmol de monomères de 4-styrène sulfonate de sodium (SS, Sigma,) sont dissous dans 7.5 mL d'eau ultra-pure. Puis une solution de methacryloxyéthyl-thiocarbamoyl-rhodamine B (MRho, Polysciences, Allemagne) soit 0.0125 mmol dans 2 mL de méthanol, est ajoutée à la solution précédente de SS, avec un rapport molaire  $\frac{\text{MRho}}{\text{SS}}$  de 0.5 %. Ce mélange est maintenu sous agitation pendant une heure sous atmosphère d'azote. Puis 250  $\mu\text{L}$  d'une solution aqueuse de tetra-

méthylethylènediamine (TMEDA, Sigma) à 0.1 M et 250  $\mu\text{L}$  d'une solution aqueuse de peroxydisulfate d'ammonium  $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8, \text{Sigma})$  à 0.05 M sont ajoutés au milieu réactionnel sous atmosphère d'azote afin d'initialiser la réaction de polymérisation. La solution, maintenue sous atmosphère d'azote, est chauffée à 40 °C pendant 4 heures puis refroidie à température ambiante pendant 12 heures sous agitation. La solution finale est dialysée pendant une semaine contre de l'eau et finalement lyophilisée pour donner un solide rouge fluorescent de PSS<sup>Rho</sup> (Dahne *et al.*, 2001).

### II.1.3.3 Récapitulatif des polyélectrolytes fluorescents utilisés

Selon les expériences, les polyélectrolytes fluorescents ont été dissous à une concentration de 1 mg/mL, dans le même tampon de construction que les films multicouches. Les polyélectrolytes fluorescents utilisés, sont répertoriés dans le tableau 2.4.

Nom Notation	Source	pKa	M <sub>w</sub> (g/mol)
PLL <sup>FITC</sup>	Sigma-Aldrich	10.5 (Kyte, 1995)	58 900
HA <sup>FITC</sup>	Marqué au laboratoire	2.9 (Lapčík <i>et al.</i> , 1998)	381 000
PSS <sup>Rho</sup>	Synthétisé au laboratoire	/	/

**Tableau 2.4 :** Polyélectrolytes fluorescents utilisés.

## II.2 Préparation des échantillons

Lors de ce travail de thèse, nous avons réalisé trois types de construction :

1. Les films multicouches (PLL/HA)<sub>n</sub>
2. Les films multicouches (PSS/PDADMA)<sub>n</sub>

3. Les architectures microstratifiées à base de films multicouches (PLL/HA)<sub>n</sub> et de gels d'alginate

### II.2.1 Les substrats utilisés

Les films multicouches ainsi que les architectures microstratifiées (à base de films multicouches et de gels d'alginate) ont été construits sur des lamelles de verre à base de silice (VWR), de 12 mm de diamètre et chargées négativement à la surface. Du fait de leur faible rugosité et de leur transparence facilitant les observations optiques, les lamelles de verre sont des supports adéquats pour nos études. De plus, il a été montré que les résultats obtenus sur le verre sont facilement transposables à d'autres surfaces car les films multicouches de polyélectrolytes, après le dépôt de quelques couches, possèdent des caractéristiques de construction indépendantes du substrat (Ladam *et al.*, 2000).

Les lamelles de verre sont préalablement nettoyées selon le protocole suivant :

1. Les lamelles de verre sont d'abord immergées pendant au moins 15 minutes dans un bain de sodium dodecyl sulfate (SDS) à 0.01 M au bain-marie. Cette étape permet le dégraissage du substrat.
2. Dans un second temps, les substrats sont trempés dans un bain de HCl à 0,1 mol/L au bain-marie pendant au moins 15 minutes.
3. Enfin, un rinçage abondant à l'eau est effectué avant leur utilisation.

### II.2.2 Procédés de construction des films multicouches

Pour la construction des films multicouches, deux procédés ont été utilisés : le trempage et la nébulisation.

#### II.2.2.1 Méthode de trempage

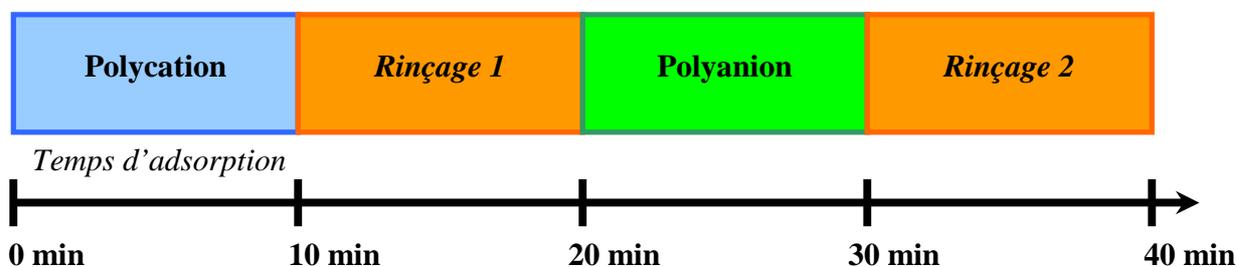
Pour le trempage, deux techniques différentes ont été utilisées : trempage automatisé et trempage manuel.

➤ **Trempage automatisé.** Pour la construction des films multicouches (PLL/HA)<sub>n</sub> constitués d'un grand nombre de couches, nous avons utilisé la méthode de trempage à l'aide d'un robot automatisé (Dipping Robot, Riegler et Kirstein, GmbH, Berlin, Allemagne) (Fig. 2.4).



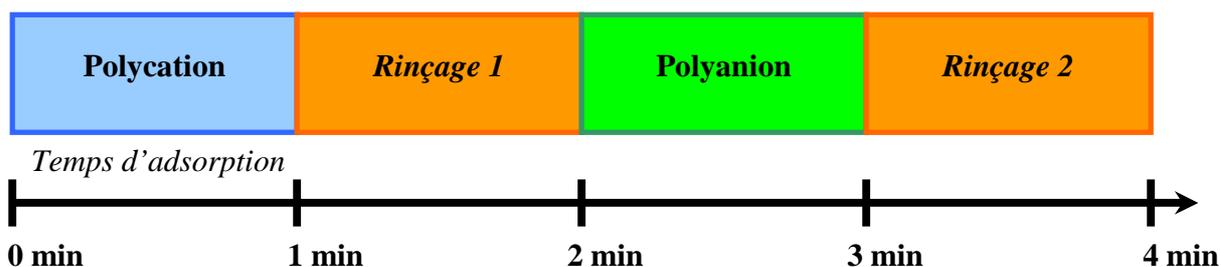
**Figure 2.4 :** Système automatisé de trempage ou Dipping robot pour la construction des films multicouches.

Ce robot est constitué d'un bras automatisé auquel est fixé un portoir où sont placés les substrats (lamelles de verre). Le déplacement de ce bras dans les différents bains de solutions de polyélectrolytes et de rinçage est contrôlé par un ordinateur via un programme défini au préalable (positions et temps de trempage), qui sera toujours identique au cours de nos études. Les substrats sont immergés séquentiellement dans les solutions de polyélectrolytes et de rinçage. Ils sont tout d'abord immergés dans la solution de polycations (10 min, volume 18 mL) puis rincées (10 min, volume 40 mL) avec la solution tampon. Ils sont ensuite plongés dans la solution de polyanions et rincés en suivant le même protocole que celui pour le dépôt des polycations. Ces opérations d'immersions successives sont répétées jusqu'à l'obtention du nombre de couches souhaité (Fig. 2.5).



**Figure 2.5 :** Séquence standard de construction d'un film multicouche par trempage automatisé à l'aide d'un robot. La construction complète d'une bicouche de polyélectrolytes dure 40 minutes.

➤ **Trempage manuel.** Les films multicouches  $(PSS/PDADMA)_n$ , construits au-dessus des films multicouches  $(PLL/HA)_n$ - PLL, destinés à constituer une barrière empêchant la diffusion des polyélectrolytes depuis le film précurseur vers le surnageant, ont été réalisés par trempage manuel. Le temps d'adsorption des polyélectrolytes est de 1 minute, séparé par 1 minute de rinçage avec le tampon de construction (figure 2.6). Un volume de 200  $\mu$ L a été déposé pour chaque solution.



**Figure 2.6 :** Séquence standard de construction d'un film multicouche par trempage manuel. La construction complète d'une bicouche de polyélectrolytes dure 4 minutes.

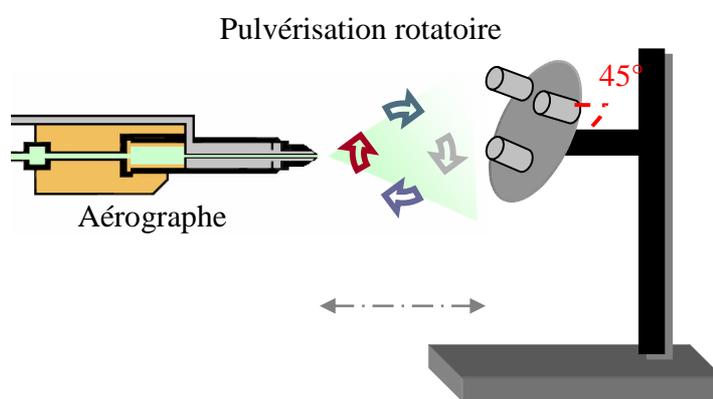
### II.2.2.2 Méthode de nébulisation

La construction des films multicouches peut également se faire par nébulisation, une alternative intéressante au procédé classique de trempage, qui présente l'avantage de réaliser les films multicouches en un temps réduit. A cette fin, un dispositif de nébulisation a été utilisé (Fig. 2.7).

a- Outils de nébulisation



b- Schéma du support de nébulisation



**Figure 2.7 :** Système de nébulisation utilisé pour la réalisation des architectures étudiées. a), l'aérographe de pulvérisation et le compresseur qui permet d'effectuer une nébulisation sous une pression contrôlée. b), le support de nébulisation qui offre la possibilité d'orienter le substrat, lamelle en verre (en vert clair), selon un angle de  $45^\circ$  ou  $90^\circ$  par rapport à un axe horizontal. Ici, nous avons choisi d'orienter notre substrat à  $45^\circ$ . La nébulisation se fait à une distance de 20 cm.

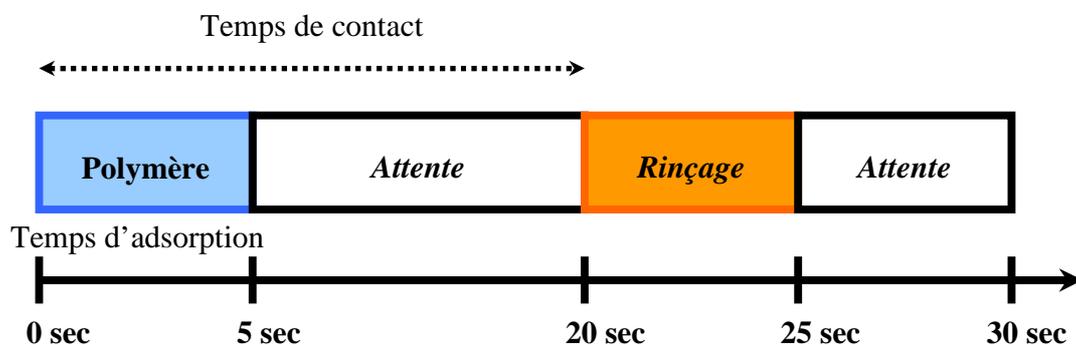
La nébulisation des solutions de polyélectrolytes a été réalisée grâce à des nébuliseurs appelés aérogaphes (Référence : 280004, SEDIP, Poincaré, France). Ces derniers sont reliés à un compresseur (Référence : 210023, SEDIP, Poincaré, France) afin de contrôler la pression de nébulisation (fixée à 1 bar). La nébulisation des solutions tampon, lors du rinçage, a été effectuée

grâce à des nébuliseurs (*Airspray*, Fisherblock Scientific, Illkirch, France) (Fig. 2.8) où la mise sous pression se fait à l'aide d'un système de pompage manuel. Les lamelles de verre, substrats pour les constructions, sont orientées à  $45^\circ$  par rapport au support vertical, ce qui permet un meilleur drainage.



**Figure 2.8 :** Bouteilles de nébulisation *Airspray*.

La séquence standard de nébulisation est présentée par la figure 2.9.



**Figure 2.9 :** Séquence standard de construction d'une couche de polyélectrolyte par méthode de nébulisation. La construction complète d'une bicouche de polyélectrolytes dure 60 secondes.

La première solution de polycation est nébulisée pendant une durée de 5 secondes. Elle est suivie par une période de repos de 10 secondes, permettant le drainage de la solution sous l'effet de la gravité, puis la nébulisation de la solution tampon pour une durée de 5 secondes. Elle permet le rinçage du film et la désorption des polycations en excès, et est suivie par une nouvelle période de repos de 5 secondes. La poursuite de la construction se fait par la nébulisation de la seconde solution (de polyanions). Cette étape se déroule de manière identique et vient compléter le cycle de dépôt. Chaque nébuliseur est réutilisé pour plusieurs expériences et est dédié à une

espèce polyélectrolytique. Entre chaque expérience, les nébuliseurs sont rincés à l'éthanol puis abondamment à l'eau milliQ.

### II.2.3 Procédés de construction des architectures microstratifiées

Un des objectifs de la thèse est l'élaboration d'un biomatériau microstratifié, par des dépôts alternés de films multicouches et de gels d'alginate. Pour la réalisation de ce projet, la méthode de nébulisation a été choisie. Le dispositif de nébulisation utilisé est identique à celui décrit dans le paragraphe §II.2.2.2. La solution d'alginate est nébulisée à l'aide d'un aérographe. La formation du gel d'alginate se fait par contact avec une solution de  $\text{CaCl}_2$  à 0.05 M. La gélification peut être réalisée de deux façons différentes : soit par nébulisation de la solution de  $\text{CaCl}_2$  directement sur la solution d'alginate pendant 5 secondes à l'aide du nébuliseur Airspray, soit par trempage de la solution d'alginate dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  pendant 2 heures.

Les différentes étapes conduisant à la réalisation de l'architecture microstratifiée sont:

1. Construction, par nébulisation, d'un film précurseur  $(\text{PLL}/\text{HA})_m\text{-PLL}^{\text{FITC}}$  dans le tampon adéquat ( $\text{NaCl}$  0.15 M ou  $\text{CaCl}_2$  0.05 M). La  $\text{PLL}^{\text{FITC}}$  a pour but: (i) la visualisation du film multicouches en microscopie confocale, (ii) l'adsorption de l'alginate de sodium.
2. Nébulisation de la solution d'alginate sur le film multicouche précurseur puis gélification au contact d'une solution de  $\text{CaCl}_2$ , par trempage ou nébulisation.
3. Construction d'un film multicouche  $(\text{PLL}/\text{HA})_n\text{-PLL}^{\text{FITC}}$  dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  0.05 M au-dessus du gel d'alginate.
4. Empilement d'un deuxième gel d'alginate de la même manière que pour l'étape (2).

L'architecture est ensuite gardée dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  à 0.05 M. Pour une observation en microscopie confocale, l'adsorption d'une couche de  $\text{PLL}^{\text{FITC}}$  est nécessaire au-dessus du dernier gel d'alginate.

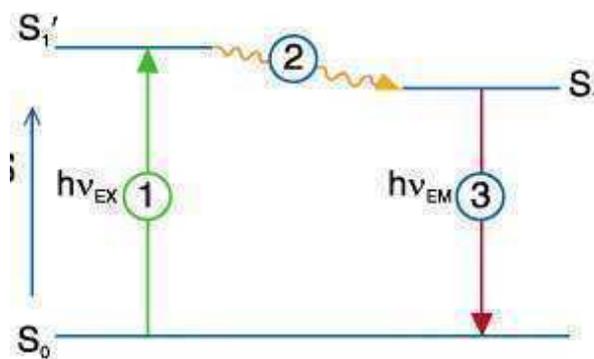
## II.3 Méthodes de caractérisation et d'analyse

### II.3.1 Microscopie confocale à balayage laser

#### II.3.1.1 Phénomène de fluorescence et sondes fluorescentes

La fluorescence est la propriété d'une molécule à absorber un photon, puis à le réémettre à une longueur d'onde plus élevée (Diagramme de Jablonski, Fig. 2.10). Soumise à une excitation

lumineuse de longueur d'onde donnée, la molécule fluorescente est portée dans un état électronique excité ( $S_1'$ ). A température ambiante, la conversion interne entraîne une perte partielle de l'énergie absorbée et la molécule se retrouve à un état excité moins élevé ( $S_1$ ). Le retour de la molécule à son état stable ( $S_0$ ) est associé à la libération d'énergie sous forme lumineuse. La perte d'énergie par conversion interne, se traduit par une longueur d'onde d'émission supérieure à la longueur d'onde d'absorption (Déplacement de Stocke).



**Figure 2.10 :** Diagramme de Jablonski. Un électron du fluorophore absorbe de l'énergie sous forme lumineuse (1) et se retrouve à l'état excité  $S_1'$ . Lors de la désexcitation, il y a tout d'abord perte de l'énergie par conversion interne (vibration, chocs...). La molécule se trouve à état d'excitation inférieur ( $S_1$ ) et retrouve son état stable ( $S_0$ ). Cette transition libère de l'énergie sous forme lumineuse, ce qui correspond à une longueur d'onde plus élevée (car l'énergie est plus faible).

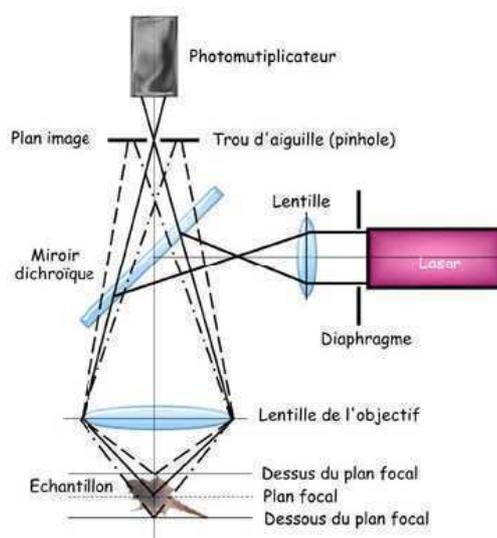
Les sondes fluorescentes (tableau 2.5) sont des molécules relativement petites pouvant être couplées de façon covalente à différents polyélectrolytes ou macromolécules biologiques. En raison de leur large rendement quantique de fluorescence, les sondes fluorescentes peuvent fournir une très grande sensibilité de détection et permettent l'imagerie d'espèces moléculaires présentes dans les films multicouches de polyélectrolytes par des techniques de microscopie de fluorescence telle que la microscopie confocale à balayage laser.

Sondes fluorescentes	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)
FITC	488	520
Rhodamine	570	595

**Tableau 2.5** : Les sondes fluorescentes.

### II.3.1.2 Principe de la microscopie confocale à balayage laser

Le principe général de la microscopie confocale a été proposé par Minsky (1957). Il s'agit de diriger une lumière ponctuelle, généralement obtenue à partir d'un laser, sur un point précis (point focal) de l'échantillon à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence. Cependant, le trajet du faisceau laser dans l'échantillon génère de la fluorescence en dehors du plan focal. Pour éliminer cette fluorescence parasite, un trou de filtrage (pinhole ou trou d'aiguille) (Fig. 2.11) est placé en amont du détecteur et ne laisse passer que la lumière en provenance du point focal. L'image ainsi obtenue présente un bon rapport signal /bruit.



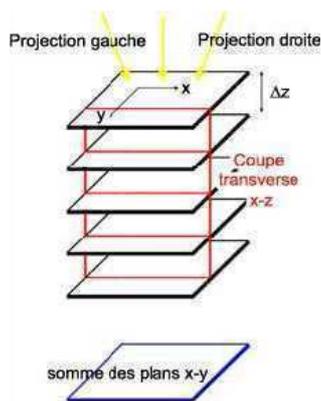
**Figure 2.11** : Schéma de principe d'un microscope confocale à balayage laser. La source laser est condensée par l'intermédiaire d'une première lentille, d'un miroir dichroïque et de l'objectif en un point focal. La fluorescence émise par l'échantillon est ensuite recueillie par un photomultiplicateur. Pour éliminer la fluorescence parasite (ligne en pointillé), le trou de filtrage (pinhole) est disposé au niveau du plan image de l'objectif.

Le balayage de l'échantillon par le laser, en tout point (x,y) de la surface fournit une image du plan focal. Ce balayage dans le plan horizontal est obtenu à l'aide de miroirs motorisés

disposés sur le trajet optique du laser. Pour le balayage vertical (en  $z$ ), l'objectif est monté sur un moteur piézo-électrique. Il est ainsi possible d'obtenir des images en provenance de différents plans focaux de l'échantillon et ainsi de reconstituer une structure en trois dimensions. Pour une longueur d'onde d'excitation de 500 nm, la résolution horizontale et verticale sont respectivement de 0.15  $\mu\text{m}$  et 0.5  $\mu\text{m}$  pour un objectif ayant une ouverture numérique de 1.4 (Stelzer and Lindek, 1994). Cette caractéristique est particulièrement intéressante pour étudier la structure normale des films multicouches d'épaisseur micrométrique en milieu aqueux. La configuration la plus courante est le mode réflexion que nous avons utilisé pour l'observation des films multicouches. Dans ce mode, la même lentille sert à focaliser la source et à réaliser l'image sur le détecteur.

### II.3.1.3 Reconstitution des images

Le faisceau laser se déplace par lignes pour imager un plan  $(x,y)$ . La platine porte-objet, support de l'échantillon (lame de verre), est également déplacée en  $z$  d'un pas fini constant ( $\Delta z$ ). Une image numérique des plans  $(x,y)$  du film est prise successivement pour chaque pas  $\Delta z$  et l'utilisation du pinhole (« trou d'aiguille ») permet d'imager un plan donné en éliminant les contributions des zones situées en-dessus et en-dessous de ce plan. L'image tridimensionnelle peut alors être reconstituée et l'objet peut être visualisé par tranches, sous différentes vues à l'aide du logiciel Zeiss LSM Image Browser (Fig. 2.12).



**Figure 2.12 :** Principe de reconstitution d'images en 3D. Une image numérique  $(x,y)$  est réalisée à différentes hauteurs en  $z$  avec un pas de déplacement constant  $z$  et l'image en 3 D est reconstituée par la somme de ces plans. On peut alors accéder aux coupes transversales suivant les plans verticaux  $(xz)$  et  $(yz)$ . La résolution verticale du microscope confocale dépend de la longueur d'onde utilisée et se situe aux alentours de 500 nm.

Les lasers les plus couramment utilisés sont :

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

### II.3.1.4 Déroulement d'une expérience

Le microscope confocal utilisé (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS, Strasbourg) est de type LSM 510 (Zeiss), monté sur un microscope AxioVert 100M (Zeiss) associé aux lasers Hélium/Néon et Argon. Au cours des expériences de microscopie confocale, nous avons utilisé les raies d'excitation à 488 nm fournie par le laser Argon et celle à 543 nm fournie par le laser Hélium Néon I. Pour visualiser les films multicouches de polyélectrolytes, les polyélectrolytes sont couplés avec des sondes fluorescentes, généralement la fluorescéine isothiocyanate (tableau 2.5). Sur les films multicouches dont l'un au moins des polyélectrolytes diffuse à travers l'ensemble de la construction, le dépôt d'un polyélectrolyte marqué permet de visualiser toute l'épaisseur du film (Fig. 2.13). Ainsi, pour obtenir un marquage complet du film, le polyélectrolyte est déposé en couche terminale pendant une dizaine de minutes. Le microscope confocal utilisé disposant de plusieurs lasers, il est possible de co-marquer les films multicouches à l'aide de deux sondes fluorescentes différentes.



**Figure 2.13 :** Coupe verticale (en z) d'un film multicouche  $(\text{PLL}/\text{HA})_{60}/\text{PLL}^{\text{FITC}}$  construit sur une lamelle de verre et observé par microscopie confocale avec un objectif  $\times 40$ . La bande verte correspond à la diffusion de la  $\text{PLL}^{\text{FITC}}$  à travers tout le film et permet de mesurer l'épaisseur du film, ici environ  $14.5 \mu\text{m}$ .

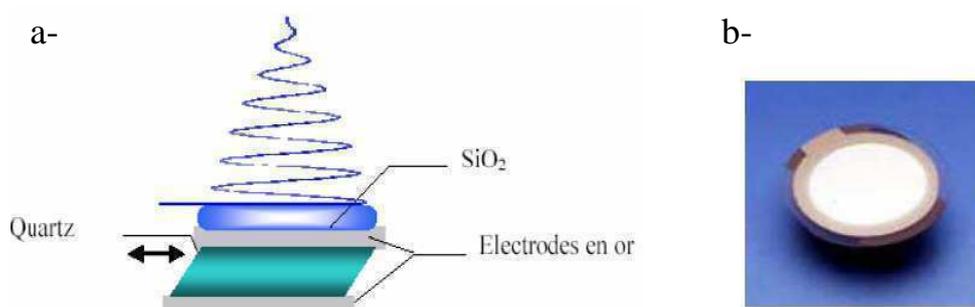
## II.3.2 Microbalance à cristal de quartz

### II.3.2.1 Principe général

La technique de microbalance à cristal de quartz (QCM) est utilisée depuis de nombreuses années pour contrôler les dépôts de couches métalliques sur des supports solides. Son principe repose sur les propriétés piézo-électriques du cristal de quartz. En effet le quartz est un matériau

qui se déforme sous l'application d'une différence de potentiels électriques et réciproquement une contrainte mécanique entraîne l'apparition d'une polarisation à ses bords.

Le cristal se présente sous la forme d'un disque de quartz de 0.3 mm d'épaisseur environ, entouré de deux électrodes en or, l'une d'entre elles étant recouverte de silice de 100 nm d'épaisseur (Fig. 2.14).



**Figure 2.14 :** a) Schéma de principe d'un cristal de quartz entouré par deux électrodes en or et recouvert d'une couche superficielle de SiO<sub>2</sub>. La différence de potentiels appliquée entre les électrodes induit une contrainte de cisaillement sur le cristal perpendiculairement au champ électrique appliqué. b) Photo du cristal de quartz. Le film est déposé sur une des deux faces en or constituant les deux électrodes.

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

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

Où  $M$  représente la masse de l'oscillateur (le cristal de quartz) et  $k$  sa constante de raideur.

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

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

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

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

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

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

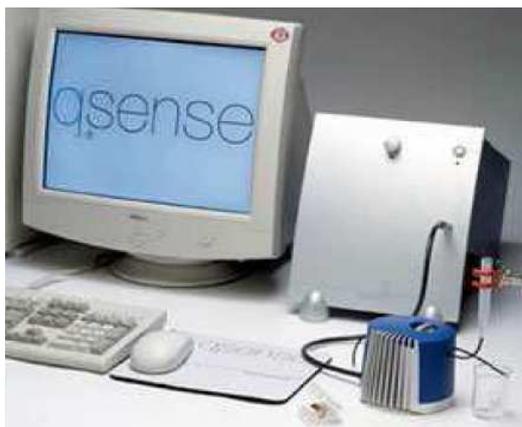
Le principe de la microbalance à cristal de quartz consiste à mesurer cette variation de fréquence de résonance  $\Delta f$  après le dépôt d'un matériau de masse  $m$  et permet donc d'avoir accès à la masse déposée par unité de surface avec une précision proche du  $\text{ng.cm}^{-2}$ . De plus, une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

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

Cette relation s'applique de façon approchée, à un dépôt de matériau en milieu liquide (Rodahl and Kasemo, 1996), mais toujours pour des films fins, rigides et uniformes. Or, les films multicouches étudiés tels que PLL/HA sont très hydratés et possèdent généralement un comportement semblable à celui d'un gel ou d'un liquide visqueux lorsqu'ils deviennent épais. La relation de Sauerbrey n'est alors plus applicable et un autre modèle qui tient compte des propriétés viscoélastiques des films multicouches est utilisé. Les récentes évolutions techniques ont permis l'acquisition d'un nouveau paramètre expérimental : le facteur de dissipation visqueuse noté  $D$  (d'où le nom de l'appareil : QCM-D) qui est lié aux propriétés viscoélastiques du film déposé. Une analyse de l'évolution des fréquences et de la dissipation a été réalisée à partir du modèle proposé par Voinova *et al.* (Voinova *et al.*, 1999). Ce modèle a été étendu par le Dr B. Senger (Inserm Unité 977) aux données issues des mesures réalisées avec l'appareillage de QCM-D (Q-Sense). A l'aide de ce programme, nous pouvons déterminer l'évolution de l'épaisseur sur plusieurs centaines de nanomètres ainsi que la viscosité et le module élastique pour des films multicouches de polyélectrolytes (Zhang *et al.*, 2004).

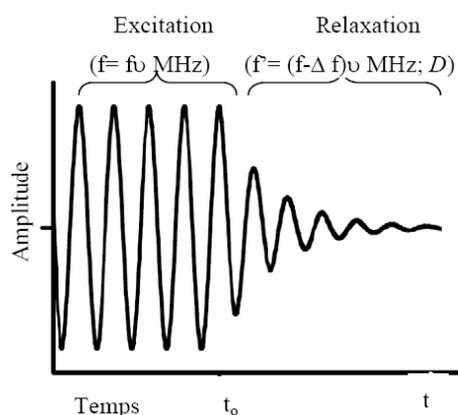
### II.3.2.2 Fonctionnement de la QCM-D

L'appareil que nous avons utilisé est de marque Q-Sense (Q-Sense AB, Göteborg, Suède) de type QCM-D301. Il comporte une chambre de mesure thermostatée par un système Pelletier et une unité électronique interfacée à un ordinateur (Fig. 2.15).



**Figure 2.15 :** Photographie de l'appareillage de QCM-D comprenant une chambre de mesure thermostatée et une unité électronique interfacée à un ordinateur.

Cet appareil fonctionne sur le principe suivant : un générateur de fréquence excite le cristal de quartz avec une tension sinusoïdale de fréquence  $f_1$ . Cette fréquence prend successivement la valeur de la fréquence fondamentale de résonance de la lame (5 MHz) et de ses harmoniques (15, 25 et 35 MHz). L'excitation du cristal est imposée sur une durée très brève (quelques  $\mu\text{s}$ ). Après l'arrêt de l'excitation, pour chaque résonance ( $\nu=1, 3,5,7$ ), le cristal oscille librement à une fréquence de résonance proche de la fréquence d'excitation du cristal. Ces oscillations mécaniques génèrent des oscillations électriques aux bords du cristal, qui sont enregistrées et traitées informatiquement. Ces oscillations sont amorties, comme cela est représenté sur la figure 2.16.

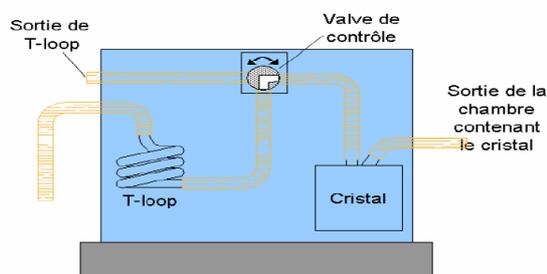


**Figure 2.16 :** Amplitude des oscillations du cristal en fonction du temps lors d'une expérience en QCM-D. Première phase (jusqu'à  $t_0$ ) : excitation du cristal à sa fréquence de résonance. Seconde phase ( $t > t_0$ ) : étude de la relaxation du cristal avec obtention de la nouvelle fréquence de résonance ( $f' = f - \Delta f$ ) et du facteur de dissipation visqueuse ( $D$ ) relié à la constante d'amortissement.

La constante d'amortissement est inversement proportionnelle au temps de relaxation du cristal après son excitation et elle est reliée au facteur de dissipation visqueuse  $D$  du système. En effet, l'amortissement du signal est dû à l'énergie dissipée dans la lame, mais surtout dans le film et dans le fluide au contact de la lame. En QCM-D, les grandeurs que l'on mesure sont la fréquence de résonance et le facteur de dissipation visqueuse  $D$  (déterminé via la constante d'amortissement) pour les 4 fréquences d'excitation (5, 15, 25 et 35 MHz). Cette dissipation renseigne en principe sur les propriétés viscoélastiques des films.

### II.3.2.3 Déroulement d'une expérience

Les cristaux utilisés sont du type QSX 303 (Q-Sense) : ils sont recouverts d'un film de  $\text{SiO}_2$  de 100 nm d'épaisseur et ils possèdent une fréquence fondamentale de résonance à 5 MHz et des harmoniques à 15, 25 et 35 MHz. Avant chaque expérience, le cristal est nettoyé *in situ*, avec une solution de Hellmanex à 2% pendant une demi-heure à température ambiante. Il est ensuite rincé avec une solution de HCl 0.1M puis lavé à l'eau et séché à l'azote. La construction d'un film multicouche de polyelectrolytes se fait dans la chambre de mesure de l'appareil QCM-D (Fig. 2.17) où se trouve le cristal de quartz.



**Figure 2.17** : Schéma de la chambre de mesure de l'appareil QCM-D. Le liquide est injecté dans un système de boucles (T-Loop) utilisé pour la régulation de température. La valve de contrôle permet d'injecter le liquide dans la chambre de mesure thermostatée contenant le cristal de quartz ou bien d'écouler le liquide à l'extérieur (sortie de la T-loop).

Au début de la mesure, il faut attendre la stabilisation du signal en présence de la solution tampon. Ensuite, on injecte 1.5 mL de la solution de polycations (le support ayant une charge négative) dans un circuit thermostaté appelé T-Loop. Ce système de boucle (Loop) permet de réguler très précisément la température des solutions (fixée à 25°C) avant leur injection dans la cellule de mesure, afin d'éviter les instabilités thermiques de mesure. Après 2 minutes, 0.5 mL de cette solution sont mis en contact avec le cristal dans la cellule de mesure et laissé 8 minutes au repos. L'opération est répétée avec la solution de rinçage puis la solution de polyanions est

injectée de façon similaire. Les étapes d'injection et de rinçage sont poursuivies jusqu'à l'obtention du dépôt du nombre de couches voulu.

### II.3.3 Fluorimétrie

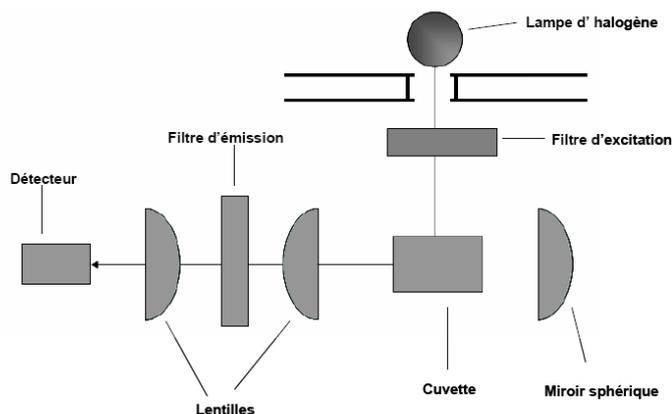
La fluorimétrie permet soit de déterminer les spectres de fluorescence (excitation/émission) d'un spécimen, soit de réaliser des dosages quantitatifs très sensibles ( $< 10^{-5}$  M). L'intensité de la fluorescence d'un échantillon varie linéairement avec sa concentration, dont l'intensité est définie par :

$$F = kQP_0(1 - 10^{-\epsilon bc}) \quad (6)$$

Où  $F$  est l'intensité de la fluorescence mesurée,  $k$  un facteur géométrique de l'instrument,  $Q$  le rendement quantique de fluorescence,  $P_0$  l'intensité lumineuse de la source d'excitation,  $\epsilon$  le coefficient d'absorption moléculaire et  $b$  et  $c$  sont des paramètres de la loi de Beer-Lambert. Cette relation empirique indique principalement que l'absorption de la lumière est proportionnelle à la concentration de molécules absorbant la lumière dans l'échantillon.

#### II.3.3.1 Fonctionnement du fluorimètre

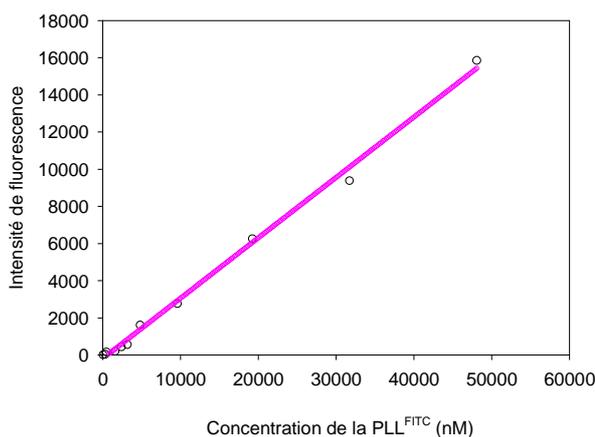
Le fluorimètre utilise comme source lumineuse une lampe halogène de quartz qui émet une lumière de longueur d'onde variant de 350 à 900 nm. La lumière est ensuite dirigée vers un filtre d'excitation (monochromateur). La fluorescence émise dans la cuvette est focalisée par un miroir sphérique et dirigée vers une première lentille asphérique. La lumière passe par un deuxième filtre (émission) de longueur d'onde correspondant à la fluorescence de l'échantillon. Ensuite la lumière traverse une deuxième lentille asphérique afin de la diriger au niveau du détecteur. Le système de détection est une photodiode avec un circuit analogique permettant d'amplifier le signal. Le signal amplifié est transformé en un signal digital et converti en unités relatives de fluorescence (Fig. 2.18).



**Figure 2.18** : Schéma du système optique du fluorimètre.

### II.3.3.2 Protocole expérimental

Nous avons utilisé un fluorimètre de marque VersaFluor (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Les filtres utilisés sont dénommés EX 490/10 (longueurs d'onde de 485 à 495 nm) pour le filtre d'excitation et EX520/10 (longueurs d'onde de 515 à 525 nm) pour le filtre d'émission. La cuvette recevant la solution à analyser a une dimension de  $35 \times 5 \times 5 \text{ mm}^3$ . Avant une série de mesures, l'appareil est calibré avec une courbe d'étalonnage. La figure 2.19 illustre un exemple de courbe d'étalonnage pour la PLL<sup>FITC</sup> mise en solution dans NaCl 0.15 M, 1 mM, Hepes, pH = 7.4.



**Figure 2.19** : Schéma d'une courbe d'étalonnage pour la PLL<sup>FITC</sup> de masse molaire  $M_w = 58.9 \times 10^3 \text{ Da}$  (Sigma-Aldrich). A chaque solution de PLL<sup>FITC</sup> préparée à une concentration connue (dilution en cascade à partir d'une solution de forte concentration déterminée par pesée) correspond une intensité de fluorescence mesurée. Ces points peuvent être ajustés par une régression linéaire du type Intensité =  $b + a \times$  Concentration ( $a = 0.325$ ,  $b = -203.9791$ ),  $R = 0.998$ .

A partir d'une courbe d'étalonnage, on pourra déterminer avec précision la quantité de PLL<sup>FITC</sup> contenue dans une solution donnée.

### II.3.3.3 Calcul de la fluorescence cumulée

Des films multicouches (PLL/HA)<sub>50</sub> ont été marqués avec la PLL<sup>FITC</sup> ou le HA<sup>FITC</sup>. Pour évaluer l'effet de l'augmentation de la force ionique du surnageant sur ces films, des cinétiques de libération des molécules fluorescentes ont été réalisées. Pour cela, des prélèvements du surnageant (200 µL) ont été réalisés pour doser la fluorescence. Entre deux prélèvements, la perte du volume est compensée par ajout de la solution tampon étudiée. Les courbes d'étalonnage de la PLL<sup>FITC</sup> (Fig. 2.19) et du HA<sup>FITC</sup> ont été utilisées pour convertir la fluorescence mesurée en concentration (nM) de PLL<sup>FITC</sup> ou du HA<sup>FITC</sup>.

Pour calculer les fluorescences cumulées dans le surnageant, il est nécessaire de corriger les mesures de la fluorescence en tenant compte des dilutions effectuées. La fluorescence corrigée sera notée  $C_i$  et sera calculée de la manière suivante :

Au temps 0, nous admettons que l'intensité de fluorescence est nulle, i.e.  $I_0 = 0$ .

Pour la mesure  $i$ , la concentration est :

$$I_i = I_{i-1} - \Delta I_i$$

$$\text{Avec } \Delta I_i = F_i - F_{i-1} \times 0.8$$

$$\text{La dilution étant : } \frac{\text{Volume:initial}}{\text{Volume:final}} = \frac{(1000\mu L - 200\mu L)}{1000\mu L} = 0.8$$

$\Delta I_i$  est l'incrément de fluorescence apparu entre deux prélèvements pendant la durée ( $t_i - t_{i-1}$ ).  $F_i$  et  $F_{i-1}$  sont les intensités de fluorescence mesurées aux instants  $i$  et  $i-1$  respectivement. L'intensité de fluorescence est ensuite convertie en concentration en se basant sur la courbe étalon de la PLL<sup>FITC</sup> ou du HA<sup>FITC</sup>.

## II.3.4 Spectroscopie UV-visible

### II.3.4.1 Principe

La technique de spectrophotométrie est basée sur la propriété de la matière, et plus particulièrement de certaines molécules, d'absorber certaines longueurs d'ondes du spectre UV-visible. Elle permet de réaliser des dosages grâce à la *loi de Beer-Lambert* qui montre une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration, aussi bien qu'une étude structurale des complexes par l'étude des spectres d'absorption. Cette méthode est basée sur

l'utilisation d'un spectrophotomètre qui détermine l'absorption d'une solution pour une longueur d'onde donnée ou pour une plage de longueurs d'ondes judicieusement choisie.

La loi de Beer-Lambert est une relation donnant la variation de l'intensité lumineuse en fonction de la distance parcourue dans un milieu transparent (généralement une solution mais peut aussi se faire sur des lames de verre). Cette loi dit que si un faisceau de photon d'intensité initiale  $I_0$  traverse une cuve de longueur  $l$  (généralement 1 cm) contenant une solution de concentration  $C$  (mol.L<sup>-1</sup>), l'intensité  $I$  une fois la cuve traversée aura comme valeur :

$$I = I_0 \exp^{-\epsilon l c} \quad (7)$$

$\epsilon$  est appelé le coefficient molaire d'absorption.

Cette relation possède des domaines de validité. Elle est valide pour des concentrations:  $C < 100$  mmol.L<sup>-1</sup>.

Nous définissons également **l'absorbance**, unité utilisée en spectrophotométrie UV-visible :

$$A = \log \frac{I_0}{I} = -\log T \quad (8)$$

$$\text{Avec } T = \frac{I}{I_0} \quad (9)$$

Et l'absorbance peut donc s'écrire sous la forme :

$$A = \epsilon l c \quad (10)$$

Où  $\epsilon$  est appelé coefficient d'extinction molaire qui est fonction de la longueur d'onde d'absorbance.

Les paramètres	$A$	$\epsilon$	$c$	$l$
Les unités	-	L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>	mol.L <sup>-1</sup>	cm

### II.3.4.2 Déroulement d'une expérience

Pour nos travaux, la spectroscopie UV-visible a été utilisée comme méthode pour suivre l'évolution de la turbidité d'une solution pour mettre en évidence les interactions moléculaires. Le principe est simple : il est basé sur la modification de l'absorbance d'un milieu suite à une interaction entre des macromolécules ou à une dissociation. En effet, une solution turbide diffuse une partie du rayonnement lumineux incident et le faisceau qui la traverse sera d'autant moins intense que sa turbidité sera importante, et par conséquent l'absorbance  $A$  mesurée sera plus forte. Le spectrophotomètre utilisé est un spectrophotomètre UV-visible, double faisceau, modèle Safas UVmc<sup>2</sup> (Monaco).

Nos études consistaient à mesurer la turbidité pour un mélange de solutions de polycation et de polyanion à différents ratios ( $f$  : le rapport du nombre de moles de monomères cationiques au nombre de moles de monomères anioniques) et à différents taux de sel. La longueur d'onde d'absorption utilisée est 500 nm, longueur d'onde pour laquelle ni le polycation, ni le polyanion et ni la solution tampon n'absorbent. Dans une cuve en plastique (dimensions : 12.5 x 12.5 x 45 mm<sup>3</sup>, Plastibrand, Wertheim). Les solutions de polycation et de polyanion sont préparées à une concentration de 1 mg/mL, sauf indication contraire. Pour le ratio  $f$ , les volumes des solutions de polyélectrolytes mélangées ont été ajustés en respectant un volume total de 1 mL, supplémenté de 3 mL de la solution tampon pour éviter une absorbance supérieure à 2, sauf indication contraire. La ligne de base a été réalisée à l'aide de la solution tampon adéquate.

## II.4 Références bibliographiques

- Dahne, L., Loporatti, S., Donath, E., and Möhwald, H. (2001). "Fabrication of micro reaction cages with tailored properties". *Journal of American Chemical Society*, 123, 5431–5436.
- Draget, K. I., Gaserod, O., Aune, I., Andersen, P. O., Storbakken, B., Stokke, B. T., and Smidsrod, O. (2001). "Effects of molecular weight and elastic segment flexibility on syneresis in Ca-alginate gels". *Food Hydrocolloids*, 15, 485-490.
- Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., and Thom, D. (1973). "Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model". *FEBS lett*, 32, 195-198.
- Haug, A., and Smidsrod, O. (1965). "The effect of divalent metals on the properties of alginate solutions". *Acta chemica scandinavica*, 19, 341-351.
- Ji, M. H., Wang, Y. J., Xu, Z. H., and Guo, Y. C. (1984). "Studies on the M-G Ratios in Alginate". *Hydrobiologia*, 116, 554-556.
- Jorgensen, T. E., Sletmoen, M., Draget, K. I., and Stokke, B. T. (2007). "Influence of oligoguluronates on alginate gelation, kinetics, and polymer organization". *Biomacromolecules*, 8, 2388-2397.
- Kyte, J. (1995). "Structure in protein chemistry." Garland Publishing, New-York & London.
- Ladam, G., Schaad, P., Voegel, J.-C., Schaaf, P., Decher, G., and Cuisinier, F. J. G. (2000). "In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers". *Langmuir*, 16, 1249-1255.
- Lapčík, L., Lapčík, L., De Smedt, J., Demeester, J., and Chabreck, P. (1998). "Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications". *Chemical reviews*, 98, 2663 -2684.
- Morris, E. R., Rees, D. A., Thom, D., and Boyd, J. (1978). "Chiroptical and Stoichiometric Evidence of a Specific, Primary Dimerization Process in Alginate Gelation". *Carbohydrate Research*, 66, 145-154.
- Rodahl, M., and Kasemo, B. (1996). "Frequency and dissipation-factor responses to localized liquid deposits on a QCM electrode". *Sensors and Actuators, B: Chemical Sensors and Materials*, B37, 111-116.
- Simsek-Ege, F. A., Bond, G. M., and Stringer, J. (2003). "Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as a function of pH". *Journal of Applied Polymer Science*, 88, 346-351.
- Stelzer, E. H. K., and Lindek, S. (1994). "Fundamental Reduction of the Observation Volume in Far-Field Light-Microscopy by Detection Orthogonal to the Illumination Axis - Confocal Theta Microscopy". *Optics Communications*, 111, 536-547.
- Stokke, B. T., Smidsrød, O., Zanetti, F., Strand, W., and Skjåk-Bræk, G. (1993). "Distribution of uronate residues in alginate chains in relation to alginate gelling properties. II:

*Enrichment of -D-mannuronic acid and depletion of -L-guluronic acid in sol fraction*". Carbohydrate polymers, 21, 39-46.

Voinova, M. V., Rodahl, M., Jonson, M., and Kasemo, B. (1999). "*Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: Continuum mechanics approach*". Physica Scripta, 59, 391-396.

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

Zhang, J. T., Chua, L. S., and Lynn, D. M. (2004). "*Multilayered thin films that sustain the release of functional DNA under physiological conditions*". Langmuir, 20, 8015-8021.

## Chapitre III :

### Etude des complexes de polyélectrolytes :

#### Solution *versus* films multicouches

---

<b>III.1 Résumé.....</b>	<b>130</b>
<b>III.2 Projet Article 1.....</b>	<b>131</b>

Hajare Majded, Jean-Claude Voegel, Armelle Chassepot, Bernard Senger, Pierre Schaaf, Fouzia Boulmedais, and Vincent Ball, "*Turbidity diagrams of polyanion/polycation complexes in solution as a tool to predict polyelectrolyte multilayer growth*", *in preparation*

---

### **III.1 Résumé**

Dans cette partie, nous nous sommes consacrés à l'étude de la complexation de polyélectrolytes. Nous avons comparé le comportement des complexes en solution afin de comprendre comment ils interviennent lors de la construction des films multicouches à partir du même couple polycation/polyanion. Cette étude a été effectuée pour différents couples polycations/polyanions. Cette étude a été portée sur six différents couples de polyélectrolytes : PLL/HA, PLL/PSS, PLL/PGA, PAH/PSS, PAH/PGA et PDADMAC/PSS. Nous avons tout d'abord évalué le comportement des polyélectrolytes en solution. Des mesures d'absorbance, reflétant l'état « turbide » de la solution, ont été effectuées à la longueur d'onde de 500 nm. Le maximum de turbidité est obtenu pour une valeur de  $r$  (rapport polycation/polyanion) proche de 1. La valeur de l'absorbance dépend également de la force ionique de la solution du chlorure de sodium (NaCl). Lorsque nous représentons l'absorbance en fonction de la force ionique de la solution de NaCl et pour un ratio de 1, nous obtenons donc une courbe présentant un maximum dont la force ionique dépend de la nature des polyélectrolytes. Une courbe de même allure est obtenue lorsque l'épaisseur des films, évaluée par QCM-D (microbalance à cristal de quartz, suivi de la fréquence et de la dissipation) pour les films fins ou par microscopie confocale pour les films plus épais, est représentée en fonction de la force ionique de la solution de NaCl. Pour la construction des films multicouches, nous partons de solutions de polyélectrolytes ayant la même concentration rapportée en nombre de moles d'unités monomères pour PLL/HA et en masse pour les autres couples. Cette observation suggère que le comportement des complexes polycation/polyanion en solution permet de prédire l'aptitude de ces couple de polyélectrolytes à pouvoir former des films multicouches dont l'épaisseur (pour un nombre de paires de couches données) est reliée à la turbidité des complexes en solution. Cette étude avec les différents systèmes, suggère qu'il est possible de prédire, par un simple mélange au préalable de deux polyélectrolytes de signe opposé, sous les conditions souhaitées, s'ils sont susceptibles ou non de former un film multicouche.

## III.2 Projet Article 1

*“Turbidity diagrams of polyanion/polycation complexes in solution as a tool to predict polyelectrolyte multilayer growth”*

### **1. Introduction**

The coating of surfaces, with functional molecules to yield films with controlled properties and thickness, is of major importance for both its fundamental aspects as well as its applications in technology. The first demonstration of the possibility to use electrostatic self assembly (ESA) to deposit multilayer films from colloids (Iler, 1966) as well as the generalisation of the concept to polyelectrolytes (Decher, 1997; Decher and Hong, 1991; Decher *et al.*, 1992; Hoogeveen *et al.*, 1996; Yoo *et al.*, 1998) and polyelectrolytes in combination with charged colloids (Caruso *et al.*, 1998b; Caruso *et al.*, 1998c; Keller *et al.*, 1994; Kotov *et al.*, 1995) (among them biomolecules like DNA (Lvov *et al.*, 1993), proteins (Lvov *et al.*, 1995), polysaccharides (Richert *et al.*, 2004)<sup>18</sup> and even cells (Krol *et al.*, 2005)) has opened the route to the easy and versatile coating of substrates from aqueous solutions with films having a thickness ranging from a few nanometers up to several micrometers. The layer-by-layer (LBL) deposition can rely on ESA as well as on the self-assembly of molecules carrying complementary functionalities, for instance polymers carrying hydrogen donor or acceptor moieties (Cho and Caruso, 2003; Sukhishvili and Granick, 2000; Sukhishvili and Granick, 2002; Xie and Granick, 2002). Multilayer films can be obtained from two multifunctional molecules A and B provided the functionality of A overcompensates that of B during the alternate adsorption. In the case of polyelectrolytes, the driving force for the deposition of a polyelectrolyte multilayer (PEM) film is the charge overcompensation at the topmost part of the film in contact with the aqueous solution, as has been demonstrated by means of zeta potential measurements (Caruso *et al.*, 1998a; Ladam *et al.*, 2000). The PEM films are easy to deposit on various substrates, among them on colloids (De Geest *et al.*, 2007; Donath *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2008) where they offer a plethora of possible applications in biology (De Geest *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008) as well as in materials science (Ariga *et al.*, 2007; Lutkenhaus and Hammond, 2007). In addition they can be

deposited by regular solution coating (using dipping machines), by spin coating (Chiarelli *et al.*, 2001) or by spray deposition (Schlenoff *et al.*, 2000).

The ease of the processing of such films is in total contrast with the complexity of the underlying deposition mechanism. The two major problems to be fully understood before understanding PEM deposition at a molecular level, a prerequisite for applications, are :

(i) the problem of the internal charge compensation, which can be either of intrinsic (Schlenoff *et al.*, 1998; Schlenoff and Dubas, 2001) or of extrinsic nature (Hubsch *et al.*, 2005; Takita *et al.*, 2007) (meaning that electroneutrality in the bulk of the film is due to the quantitative ion pairing between the polycation and the polyanion or to the incorporation of an excess of small electrolytes respectively).

(ii) as well as the understanding of the film growth regime. Indeed, 3 different situations have been described in the case of polyelectrolytes :

\* linear growth, in which the film thickness as well as the amount of deposited molecules increase linearly with the number of deposited layer pairs,  $n$ . A layer pair consists in the successive deposition of a polycation and a polyanion or *vice versa*. This film growth regime is by far the most common, the combination of poly(4-styrene sulfonate) (PSS) and poly(allylamine) (PAH) at ambient temperature being one of the most representative example (Decher, 1997; Ladam *et al.*, 2000; Ramsden *et al.*, 1995).

\* supralinear growth in which the derivative of the film thickness with respect to  $n$  is positive. The first example of such growth has been found in the combination between poly-L-lysine and sodium alginate (Elbert *et al.*, 1999) and many examples followed in the literature (Boulmedais *et al.*, 2003; Lavallo *et al.*, 2002; Picart *et al.*, 2002). It has been demonstrated that the supralinear growth can be described by an exponential function in many cases. This growth regime is due to diffusion of at least one of the participating polyelectrolyte in and out of the whole the film during each deposition step (Picart *et al.*, 2002). This growth has been modeled by means of a model relying on the assumption that the deposition of one polyelectrolyte stops when its chemical potential in the bulk of the film is equal to the chemical potential in solution. In addition the last deposited layer constitutes an electrostatic potential barrier impeding the release of the polyelectrolytes from the film in the solution before the contact with the solution containing the polyelectrolyte of opposite charge (Picart *et al.*, 2002).

\* the absence of film growth which most of the time manifests in the adsorption of one polyelectrolyte followed by its desorption when the substrate is put in contact with the

polyelectrolyte of opposite sign (Kovacevic *et al.*, 2002; Kovacevic *et al.*, 2003). This observation means that polyelectrolytes A and B prefer to form complexes that desorb from the substrate and are soluble in solution rather than to stick as an insoluble film on the substrate. These findings have been rationalized by Sukhishvili *et al.* in terms of phase diagrams (Sukhishvili *et al.*, 2006): the formation of soluble complexes in solution being unfavorable to the deposition of PEMs whereas the formation of insoluble complexes (and phase separation in a polyelectrolyte rich precipitate and a solution poor in polyelectrolyte) correspond to a glassy state and the formation of PEM films when the same polyelectrolytes are deposited in LBL manner. This relationship between turbidity diagram and multilayer buildup has been experimentally supported on poly(methacrylic acid) and quaternized poly(vinyl pyridine) (QPVP) (Sukhishvili *et al.*, 2006). It has been demonstrated that the stability of polyelectrolyte–polyelectrolyte or polyelectrolyte-protein complexes (where the proteins have to be considered as colloids carrying a heterogeneous surface charge distribution) depend among other parameters on the chain length (Takahashi *et al.*, 2000), the linear charge density of the polyelectrolyte (Dautzenberg and Jaeger, 2002; Mattison *et al.*, 1998; Seyrek *et al.*, 2007; Trukhanova *et al.*, 2005), the ionic strength (Seyrek *et al.*, 2007), the *pH* (Hallberg and Dubin, 1998; Seyrek *et al.*, 2007) in the case of weak polyelectrolytes or proteins and the temperature. The (Zacharia *et al.*, 2007) appear to be basically the same as those governing the build up of PEM films. For instance an increase in ionic strength of a solution containing already formed complexes or a PEM film leads finally to a solubilization of the complexes (Izumrudov and Zhiryakova, 1999) (or a disappearance of the coacervate phase, where a coacervate corresponds to a liquid phase of insoluble complexes (Burke *et al.*, 2007)) and a progressive (Burke *et al.*, 2007; Nolte *et al.*, 2007) or quantitative dissolution of PEM films (Mjahed *et al.*, 2009). Exchange mechanism provide an other analogy between PE complexes and PEM films. One polyelectrolyte of a polycation-polyanion complex can be displaced from these complexes by the introduction of a competing polyelectrolyte (Zelikin *et al.*, 2003) and similarly exchange phenomena can occur in PEM films (Ball *et al.*, 2005; Jomaa and Schlenoff, 2005; Zacharia *et al.*, 2007). Finally, both self assembled systems can display variable mobility of their constituents : BSA can display a diffusion coefficient in PE complexes (Bohidar *et al.*, 2005) as well as in PEM films (Szyk *et al.*, 2002) that is only slightly lower than in the free solution at the same temperature.

Despite these strong analogies in the behavior and properties of PE complexes and PEM films, there have been only few experimental investigations to find their molecular

origin. Some isothermal titration microcalorimetry experiments suggest that the regime of film growth is related to the sign of the enthalpy during the complexation process in solution (Laugel *et al.*, 2006). These data strongly suggest that entropy changes are one of the driving force in both PE complexation (Ball *et al.*, 2002) as well as in PEM film build up. The importance of entropic contributions to free energy changes during polyelectrolyte complexation has been assumed very early in the literature (Michaels, 1965), however the quantification of these entropy changes are difficult to measure by the unique use of ITC (Isothermal Titration Calorimetry) (Bucur *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2008). All these investigations and analogies between complexation in solution and growth of PEM films give important support to the assumption of Sukishvili *et al.* (Sukhishvili *et al.*, 2006).

In the present investigation, we aim to use a *broad range* of polyelectrolytes already used in the preparation of PEM films, to try to make a correlation between the turbidity diagram of polycation-polyanion complexation behaviour in solution and the possible buildup of PEM films from the same polyelectrolytes and to extend the rule introduced by Sukhishvili *et al.* to the correlation between the turbidity diagram and the type of multilayer growth. If the polycation-polyanion association in solution, which will be measured by means of turbidity, is related to the growth of PEM films, this will provide a very easy and predictive tool when experimentalists want to try novel polycation-polyanion combinations to build up PEM films : they just have to mix polycation and polyanion solutions in different solution conditions (*pH*, ionic strength) and to follow if phase separation occurs. They do not have to change the solution conditions and to follow systematically the buildup of the films. We will also use the turbidity experiments to make the diagnostic of the occurrence of the linear or supralinear growth regime of PEM films.

Our investigation will also highlight, as already suggested by Sukishvili *et al.* (Sukhishvili *et al.*, 2006), that polymers carrying sulfonate groups are very efficient to produce stable PE complexes as well as robust build up of PEM films over a broad range of physicochemical conditions. To be as general as possible, we used both polycarboxylates (sodium Poly-L-glutamate, PGA, sodium hyaluronate, HA) and polysulfonates (poly(sodium-4-styrene sulfonate)). The used polycations carried both primary amine groups (poly(allylamine), PAH and poly-L-lysine) and quaternary ammonium groups (poly(diallyldimethylammonium chloride), PDADMAC).

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Polyelectrolyte solutions**

Poly(L-lysine) (PLL, ref: P2636,  $M_w = 2.92 \times 10^4$  g/mol,  $M_w/M_n = 1.64$ ), fluorescein isothiocyanate poly(L-lysine) (PLL<sup>FITC</sup>,  $M_w = 5.89 \times 10^4$  g/mol,  $M_w/M_n = 2.82$ ) with an average of 0.008 FITC group per lysine monomer, poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDADMA,  $M_w = 9.36 \times 10^5$  g/mol), poly(allylamine) (PAH,  $M_w = 7 \times 10^4$  g/mol), Poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS,  $M_w = 7.0 \times 10^4$  g/mol), sodium(poly-L-glutamate) (PGA,  $M_w = 4.75 \times 10^4$ ), poly(éthylène imine) (PEI,  $M_w = 75 \times 10^4$ ), were all purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). Sodium hyaluronic acid (HA, ref: 80190,  $M_w = 3.81 \times 10^5$  g/mol,  $M_w/M_n = 1.76$ ) was purchased from Lifecore (Chaska, MN). The mass distribution of HA was determined by means of steric exclusion chromatography – multi angle laser light scattering (SEC-MALLS).

NaCl aqueous solutions were prepared at different ionic strengths, and buffered at *pH* 7.4 with 1 mM Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) for PLL and HA solutions or with 10 mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) to dissolve all other polyelectrolytes, using ultrapure water (MilliQ- plus system, Millipore) with a resistivity of 18.2 M $\Omega$ .cm. The ionic strength of all the solutions was changed from experiment to experiment by adding variable amounts of NaCl.

Polyelectrolyte solutions were prepared by dissolution of adequate amounts of polyelectrolyte powders (or by dilution of the commercial solution in the case of PDADMAC) in 1 mM Hepes or 10 mM tris – NaCl buffer at *pH* 7.4. HA and PLL solutions were prepared at a concentration of  $3 \times 10^{-3}$  M in monomer units. All other polyelectrolyte solutions were prepared at a concentration of 1 mg/mL.

### **2.2 Build-up of polyelectrolyte multilayers**

The PEM films, aimed to be imaged by means of confocal laser scanning microscopy (LSCM), were buildup with a dipping robot (Riegler & Kirstein GmbH, Potsdam, Germany) on glass slides (glass coverslips from Menzel GmbH & Co, Braunschweig, Germany). Before polyelectrolyte adsorption, the glass slides were cleaned with 0.1 M sodium dodecyl sulfate (15 min), 0.1 M HCl (15 min), and pure water. Then, the glass slides were dipped in a polycation solution for 8 min. A rinsing step was performed by dipping the substrates for 10 min in the NaCl containing buffer (*pH* 7.4).

The polyanion was then deposited in the same manner. The build-up process was pursued by alternated depositions of the polycation and the polyanion. After deposition of  $n$  layer pairs, the film obtained is denoted (polycation/polyanion) $_n$ .

### 2.3 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Confocal laser scanning microscopy investigations were performed on films in contact with a NaCl solution. CLSM observations were carried out with a Zeiss LSM-510 microscope using a 40x/1.4 oil immersion objective and a 0.43 mm z-section interval. For all CLSM observations unless otherwise stated, the adsorption of PLL<sup>FITC</sup> (respectively PSS<sup>Rho</sup>) was performed by dipping the multilayer films for 15 min in a PLL<sup>FITC</sup> (respectively PSS<sup>Rho</sup>) solution and rinsing with 1 mM HEPES or 10 mM –Tris buffer at  $pH$  7.4 before its observation. FITC fluorescence was detected upon excitation at 488 nm, through a cut-off dichroic mirror and an emission bandpass filter of 505–530 nm (green). Rhodamine fluorescence was detected upon excitation at 543 nm and an emission long-pass filter above 585 nm (red emission). Virtual vertical sections can be visualized, allowing the film thickness to be determined.

### 2.4 Quartz cristal microbalance and dissipation (QCM-D)

The construction of multilayer films was monitored *in situ* by quartz crystal microbalance with dissipation monitoring QCM-D (Q-Sense E4, Götenborg, Sweden). The device was fitted with a 4-sensor chamber meaning that 4 build-up experiments could be performed simultaneously. The QCM-D technique consists in measuring the resonance frequency changes ( $\Delta f$ ) of a quartz crystal induced by polyelectrolyte adsorption on the crystal, when compared to the crystal in contact with a buffer solution solution. The quartz crystal is excited at its fundamental frequency (5 MHz), and the measurements are performed at the first, third, fifth and seventh overtones (denoted by  $\nu = 1, 3, 5$  and  $7$ , respectively) corresponding to about 5, 15, 25, and 35 MHz, respectively. Changes in the resonance frequencies,  $\Delta f$ , and in the relaxation of the vibration once the excitation is switched off are measured at these four frequencies. The relaxation measurement gives access to the change in the dissipation factor,  $D$ . The used quartz crystal is coated with a ~50 nm SiO<sub>2</sub> film. The four sensors are fixed in removable flow modules with inlet and outlet. The measurement methodology has been addressed in details elsewhere. 600  $\mu$ L of

NaCl solution was injected into the measurement cell. After stabilization of the signals, 600  $\mu\text{L}$  of the polycation solution dissolved in a NaCl containing buffer was injected. This solution was left in the cell for 5 min, and rinsed with the NaCl containing buffer solution and left again for 5 min. During the whole process, the frequency shifts were continuously recorded as a function of time. The same procedure was used for the deposition of the polyanion. The construction was pursued by alternate depositions of polycation and polyanion. A positive shift in the opposite of the normalized frequency shift,  $-\Delta f/\nu$ , can be associated, in first approximation, with an increase of the mass adsorbed on the crystal.

## **2.5 Turbidity as a function of mixing ratio ( $r$ ) of polyelectrolytes and as a function of ionic strength**

Mixtures of different couples of polycation/polyanion were prepared at different mixing ratios and at different ionic strengths in NaCl (the buffer always containing 1mM HEPES or 10 mM Tris at  $pH$  7.4). During the complex preparation, a given volume of a polycation solution was injected in a given volume of buffer containing polyanion. The mixture was vigorously stirred to ensure fast homogenization. In a typical experiment, an aliquot from polycation solution was added to an aliquot from polyanion solution in such a way to establish different molar ratios between polycation and polyanion at different ionic strength of NaCl buffered solution in a polystyrene cuvette. A different cuvette was used for each value of the mixing ratio  $r$ . typically  $r$  was varied between 0 (no polycation) and 10, corresponding to a large excess of polycation monomers.  $r$  is defined as the ratio between the number of moles of cationic units and the number of moles of anionic units. In the case of PSS and PDADMAC each monomer carries an elementary negative and positive charge respectively. We make the assumption that each weak polyelectrolyte is also fully protonated (for the polyamines) or fully deprotonated (for the polyacids). This assumption is realistic at  $pH$  7.4 which is far below the average  $pK_a$  of the polyamines (around 10 for PLL and 9.5 for PAH) and far above the  $pK_a$  of the used polyacids. The validity of this assumption is also better at higher ionic strength where the intramolecular electrostatic interactions between charges are screened.

In order to have absorbance values lower than 2, 3 mL of buffer solution were added, unless otherwise stated. The obtained solution was then aged for 10 minutes at room temperature before absorbance measurement.

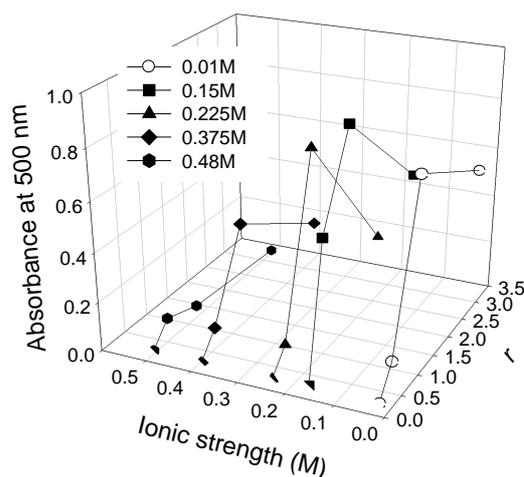
The occurrence of complexation was quantified as the apparent absorbance at 500

nm, which corresponds to light scattering because no of the used polyelectrolytes absorbs light at this wavelength. Spectrophotometric measurements were performed using UVmc<sup>2</sup> spectrophotometer (Safas, Monaco).

### **3. Results and discussion**

We will first investigate two polycation-polyanion combinations that are known to display different behaviours at an ionic strength of 0.15 M and for *pH* values between 5 and 8 : the thickness of (PLL/HA)<sub>n</sub> films grow in an exponential manner (Picart *et al.*, 2001; Picart *et al.*, 2002), whereas the (PAH/PSS)<sub>n</sub> films display a linear growth regime (Ramsden *et al.*, 1995). However, it has to be noted, that the PAH/PSS combination of polyelectrolytes can also lead to a supralinear growth regime at temperatures higher than 55°C (Salomaki *et al.*, 2005). Fig. 1 shows a typical turbidity diagram for the PLL/HA combination of polyelectrolytes in which the absorbance at 500 nm of the mixture is plotted as a function of *r* at different ionic strengths in NaCl. The reported absorbances were measured 10 min after mixture of the polycation and polyanion solutions. After longer times we observed either sedimentation or a progressive decrease in absorbance depending on the polycation/polyanion combination as well as on the ionic strength. Typically the reduction in absorbance, be it due to sedimentation (hence macroscopic phase separation) or to an other process was most pronounced around *r* values of 1, namely at charge equivalence between the polycation and the polyanion. This phenomenon is well known in the literature. Because of the absence of a steady state in turbidity as a function of time for polycation/polyanion mixtures satisfying to  $r \approx 1$ , the notion of turbidity diagram is used in a qualitative manner only.

It is not the aim of this work to investigate whether the PE complexes sediment or undergo another evolution with time. This will be the subject of a forthcoming work. In the particular case of the PLL/HA combination the turbidity of the solution at  $r \approx 1$  decreased progressively as a function of time without apparent sedimentation (Fig. 1 of the Supporting Information) as we will report in detail elsewhere. It appears in the recent literature that PE complexes made from polyelectrolyte–neutral bloc copolymers can rearrange slowly, typically with characteristic times of hours, we hypothesize that the PLL/HA complexes also follow this trend (Lindhoud *et al.*, 2009).



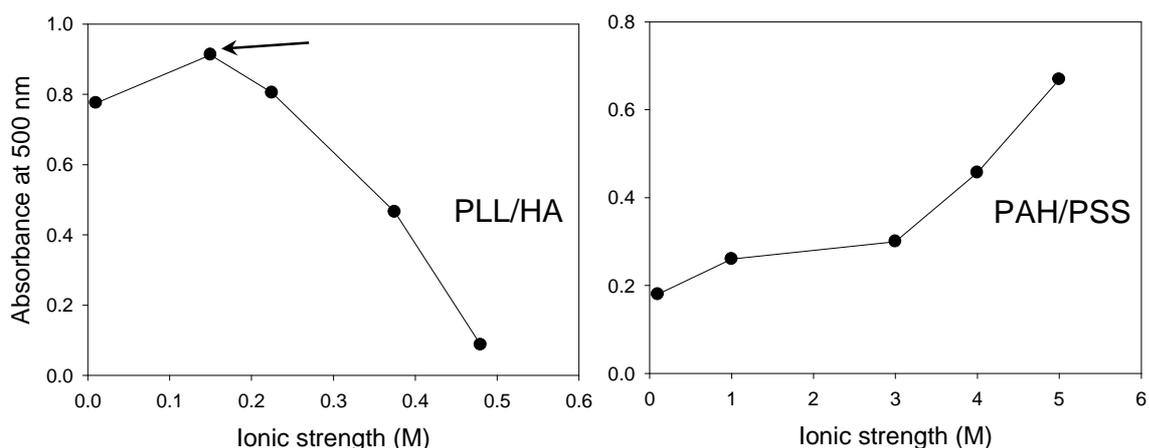
**Figure 1.** Turbidity diagram, representing the turbidity quantified as the absorbance at 500 nm, of the PLL/HA combination of polyelectrolytes as a function of the mixing ratio  $r$  and the ionic strength (adjusted with NaCl).

It is not the aim of this work to investigate whether the PE complexes sediment or undergo another evolution with time. This will be the subject of a forthcoming work. In the particular case of the PLL/HA combination the turbidity of the solution at  $r \approx 1$  decreased progressively as a function of time without apparent sedimentation (Fig. 1 of the Supporting Information) as we will report in detail elsewhere. It appears in the recent literature that PE complexes made from polyelectrolyte–neutral bloc copolymers can rearrange slowly, typically with characteristic times of hours, we hypothesize that the HA/PLL complexes also follow this trend (Lindhoud *et al.*, 2009).

In opposition to the PLL/HA system, the PAH/PSS complexes at mixing ratios close to 1 display a clear sedimentation after only a few minutes in the ionic strength range between 0.1 and 5 M in NaCl. Whatever, the final evolution of the polyelectrolyte complexes, phase separation or slow decrease in turbidity, for all the “turbidity diagrams” investigated in this work, the maximal turbidity is obtained close to  $r = 1$  at all ionic strengths. This means that in this region either the number of PE complexes is maximal or their size is maximal. We did not focus on the size distribution of the complexes: they are polydisperse and there are aggregates in the solution that can be bigger than a few  $\mu\text{m}$  particularly for the PAH/PSS and PAH/PGA combinations. Therefore, we will focus on the turbidity at  $r \approx 1$  as a function of the ionic strength for all the investigated polycations/polyanions combinations. The turbidity change for the PLL/HA and PAH/PSS combinations are plotted in Figure 2 as a function of the ionic strength at  $r \approx 1$ .

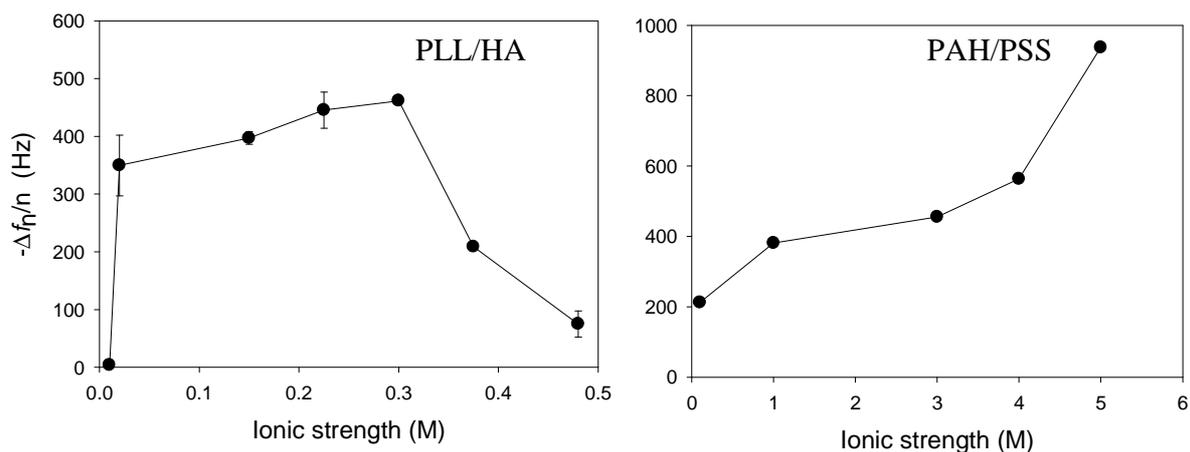
It appears that the two systems behave rather differently: the extent of PLL/HA complexation seems to reach a maximum at around 0.15 M in NaCl and at 0.48 M in

NaCl, the solution is fully transparent. Examination of the PLL/HA mixture at  $r \approx 1$  in these conditions of ionic strength by means of dynamic light scattering reveals the absence of complexes because the average hydrodynamic radius is close to that of HA and PLL in their individual solutions (data not shown), namely a few nanometers. On the other hand, the turbidity evolution for the PAH/PSS combination does not display a maximum as a function of the ionic strength between 0.1 and 5 M. This means that an increase in ionic strength is not able to “soften” the PAH/PSS complexes, which is expected to occur because the small ion/polyelectrolyte interaction should become predominant over the polycation/polyanion interactions (pas sur A rediscuter) (Izumrudov and Zhiryakova, 1999). This may also occur for the PAH/PSS combination, but the solubility of NaCl is limited to around 6 M in our conditions. Anyway, up to 4 M in ionic strength, the extent of PAH/PSS complexation is strong.



**Figure 2.** Turbidity, quantified as the absorbance at 500 nm, of PLL/HA and PAH/PSS mixtures at  $r \approx 1$  as a function of the salt concentration in NaCl. The arrow indicates the approximate position of the maximal turbidity. The line is aimed to guide the eye.

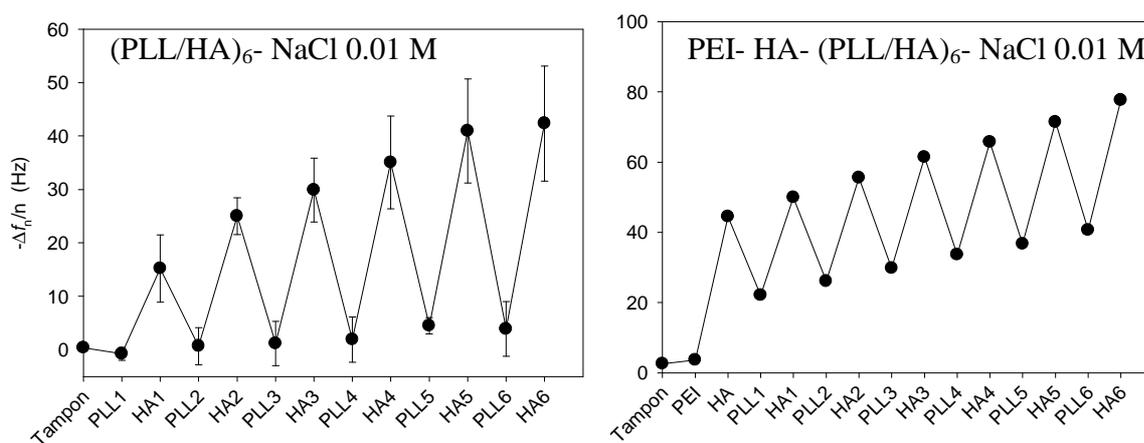
Let us now turn to the PEM films build up for the same combinations of polyelectrolytes. Figure 3 shows that the thickness reached after the deposition of 6 layer pairs is maximal at around 0.15-0.225 M in NaCl for the HA/PLL combination whereas the film thickness increases monotonously for the PAH/PSS combination up to 5 M in NaCl. The same trend is observed for much thicker  $(\text{PLL/HA})_n$  films ( $n=50$  instead of  $n=6$ ) as investigated by means of CLSM (Figure 3 of the Supporting Information).



**Figure 3.** QCM-D monitoring of PEM film deposition after a six bilayers of polycation/polyanion deposition steps.

Clearly the shape of the PEM film buildup (Fig. 3) follows the trend of the turbidity versus ionic strength curve (Fig. 2) with one small exception : in the case of the PLL/HA combination there is already an important turbidity at small ionic strength (10 mM) but almost no PEM deposition.

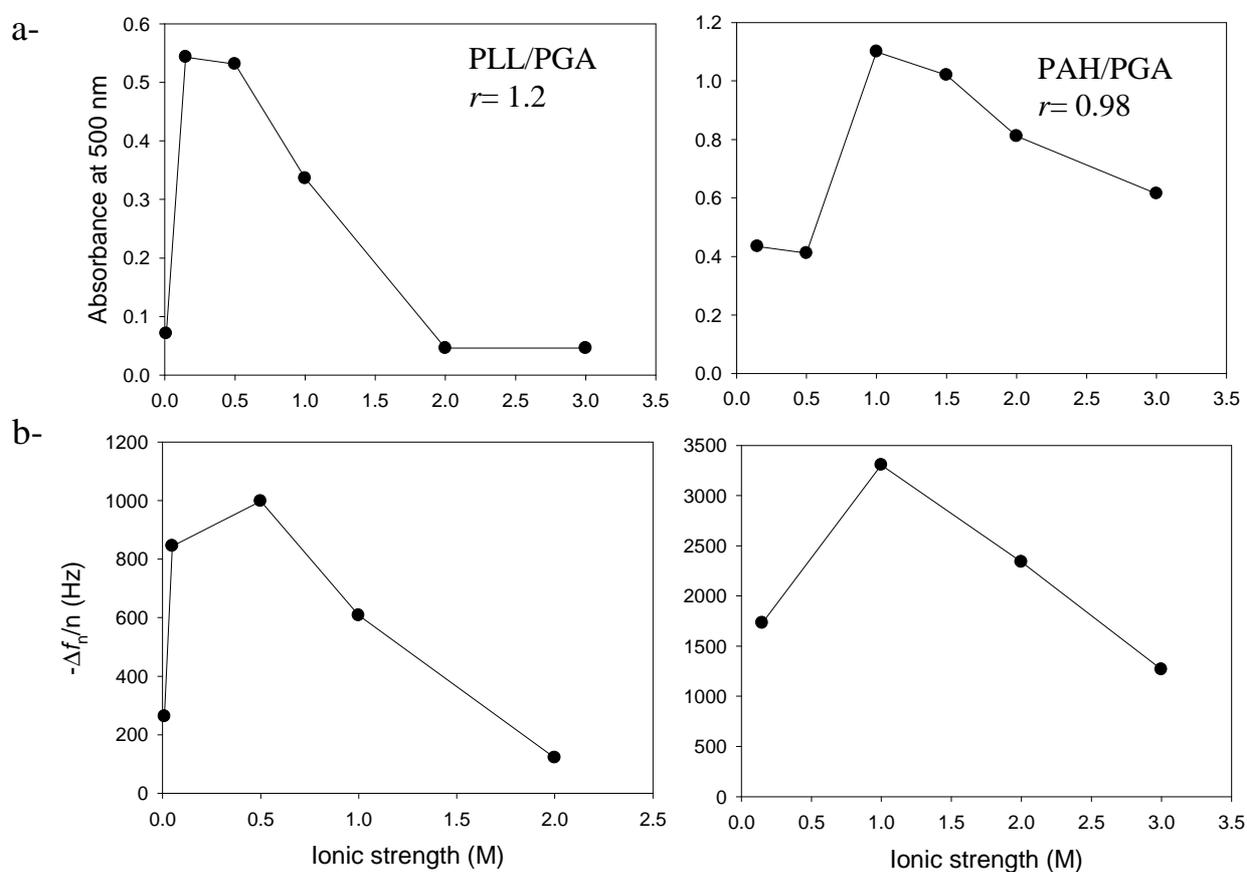
Indeed, in this particular condition, the deposition of HA on a PLL covered substrate is followed by its near quantitative desorption upon contact with a PLL solution, Figure 4. This phenomenon persists although with the use of PEI as anchoring first layer. Note also that the position of the maximum in turbidity does not exactly match with the position of the maximum in the thickness versus ionic strength curve in the case of the PLL/HA system.



**Figure 4.** Evolution of the reduced frequency (at  $n=3$ ), monitored by QCM-D as a function of the nature of the adsorbing polyelectrolyte in the case of the PLL/HA combination in the presence of NaCl at 0.01 M.

The trend for the PLL/HA and PAH/PSS combination confirms the findings of Sukishvili *et al.* (Sukishvili *et al.*, 2006), namely that the absence of turbidity and hence of PE complexation in solution is related to the impossibility to build up PEM films in the same physicochemical conditions.

We will now check if these findings can be generalised to other combinations of polycations and polyanions. Let us first consider the polycation/polyanion combinations in which the polyanion is a polycarboxylate: for the PLL/PGA as well as for the PAH/PGA system the turbidity versus NaCl concentration as well as the reduced frequency change (hence the amount of deposited film) versus NaCl concentration curves display the same shape as for the PLL/HA system (Fig. 5).

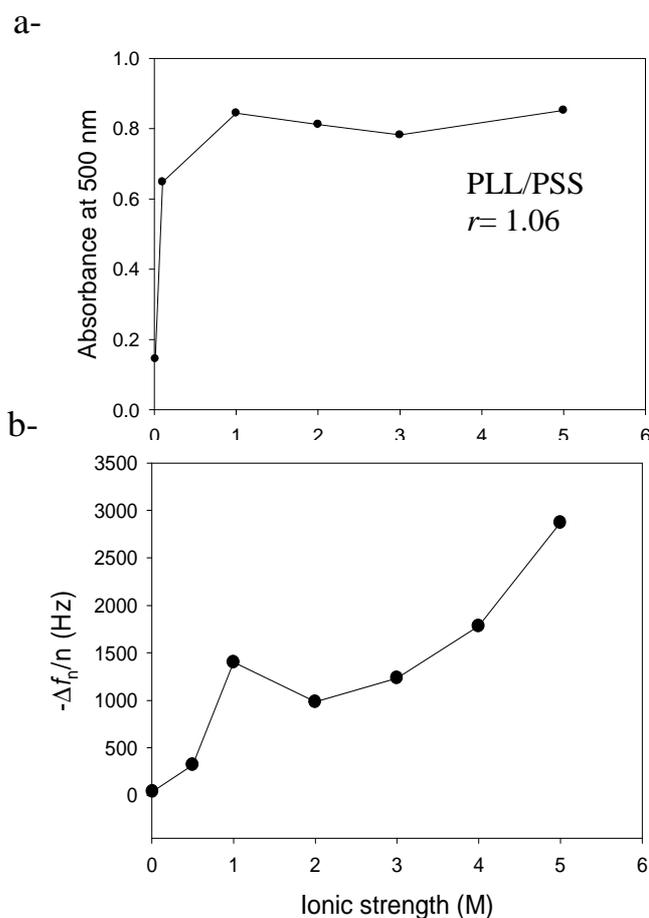


**Figure 5.** Comparison between (a) the turbidity (at 500 nm) versus ionic strength and (b) reduced frequency change versus ionic strength for polycation/polyanion systems. The reduced frequency changes at  $n= 3$  obtained by QCM-D are quoted in the case of 6 layer pairs.

More specifically, the sodium chloride concentration at which maximal turbidity is obtained at  $r \approx 1$  matches closely the salt concentration at which the film thickness reaches an optimal value. In addition it appears from Figure 5 that buildup of PEM films made from PGA as a polyanion is possible up to 3 M in NaCl in presence of PAH whereas the

film growth is not possible anymore above 2 M when PLL is used as the polycation. This may probably come from structural differences between PLL and PAH.

To go further in this direction, let us now consider the PE complexes as well as the PEM films made from the same polycations, namely PLL and PAH but the polyanion being now PSS instead of PGA. The data for the PAH/PSS combination are given in Figures 2 and 3 : in the 0.01 M- 4 M NaCl concentration range, both the solution turbidity (measured at  $r \approx 1$ ) and the film thickness increase monotonously. The same trend is found for the PLL/PSS combination as shown in figure 6.

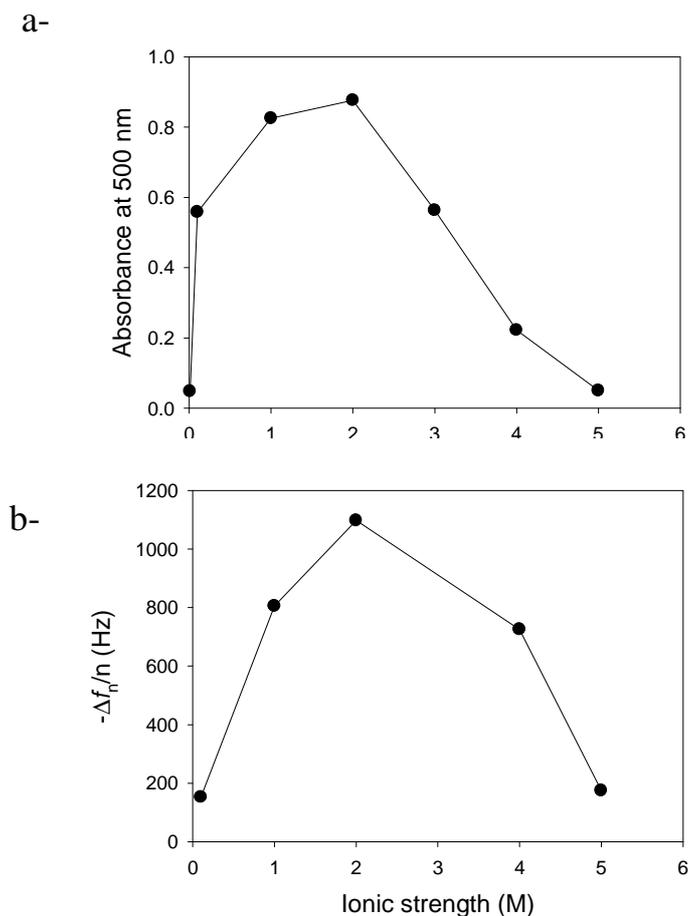


**Figure 6.** Evolution of (a) the turbidity for PLL/PSS mixtures at  $r \approx 1$  as a function of the ionic strength and (b) the evolution of the reduced frequency change at  $n= 3$  after the deposition of a (PLL-PSS)<sub>8</sub>-PLL film as a function of the ionic strength.

This finding means that for the two polycations PLL and PAH carrying primary ammonium groups, it is the change in the polyanionic partner that determines the complexation in solution and the buildup of the PEM films : in the presence of the carboxylate carrying PGA, the complexation and film buildup display a maximum at intermediate ionic strengths whereas no maximum appears up to 5 M in NaCl in the

presence of the sulfonate carrying PSS. Let us now consider the situation of a constant polyanion, PSS, put in the presence of either a polycation carrying primary amines (PLL and PAH) or quaternary ammonium groups (PDADMAC).

It appears that when complexes are formed between PDADMAC and PSS, the turbidity versus NaCl concentration curve displays a marked maximum (at around 2 M) which corresponds closely to the ionic strength at which the PEM film buildup is optimal (Fig. 7).



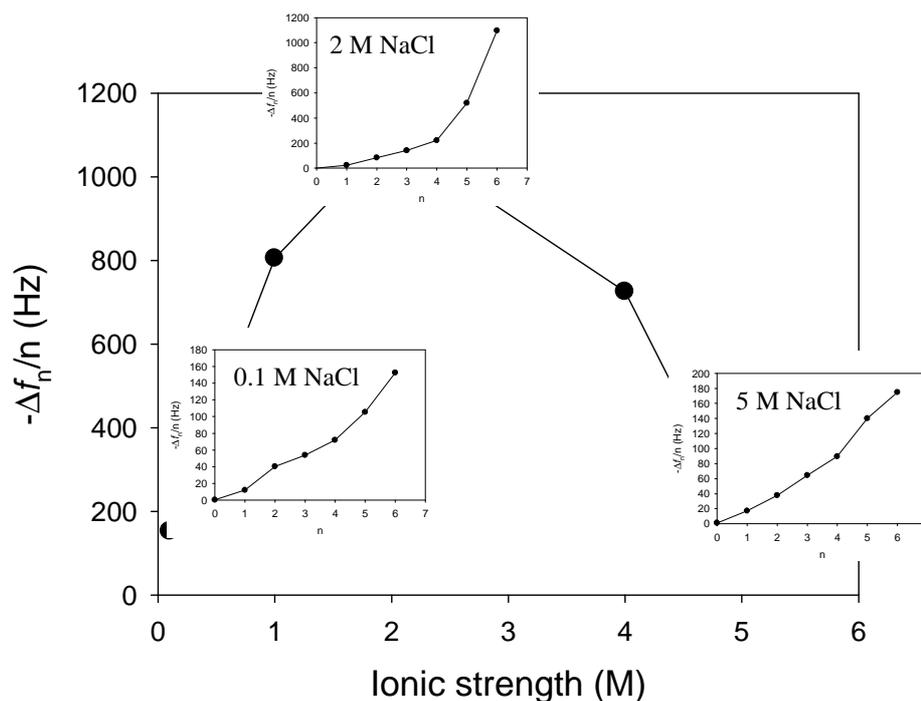
**Figure 7.** Evolution of the turbidity for PDADMAC/PSS mixtures at  $r \approx 1$  as a function of the ionic strength and (b) the evolution of the film thickness after the deposition of a (PDADMAC-PSS)<sub>10</sub> film as a function of the ionic strength.

Hence the change from PLL or PAH to PDADMAC totally modifies the behaviour of the PE complexes as well as that of the PEM film deposition: qualitatively the PDADMAC/PSS combination behaves as the PLL/HA (Fig. 2 and 3) and the PLL/PGA as PAH/PGA combinations (Fig. 5). Taken together these data confirm the trend extracted from the experiments performed by The group of Izumrudov (Sukhishvili *et al.*, 2006), namely that complexes made from polycations carrying primary amines and from polyanions carrying sulfate (not investigated herein) or sulfonate groups are particularly stable in a broad range of

salt concentrations (Sukhishvili *et al.*, 2006). Our investigation shows on the basis of 6 polycation/polyanion combinations that it is possible to predict qualitatively the possibility to deposit multilayer films at a given *pH* and ionic strength by just mixing a polycation and a polyanion solution to reach a mixing ratio of 1: if the solution turns immediately to turbid, its is a strong indication that the buildup of PEM films is possible under these conditions. When the solution remains transparent, particularly at high ionic strength, it means that the formation of soluble interpolyelectrolyte complexes and the absence of complexation are thermodynamically favored, which plays against the buildup of PEM films.

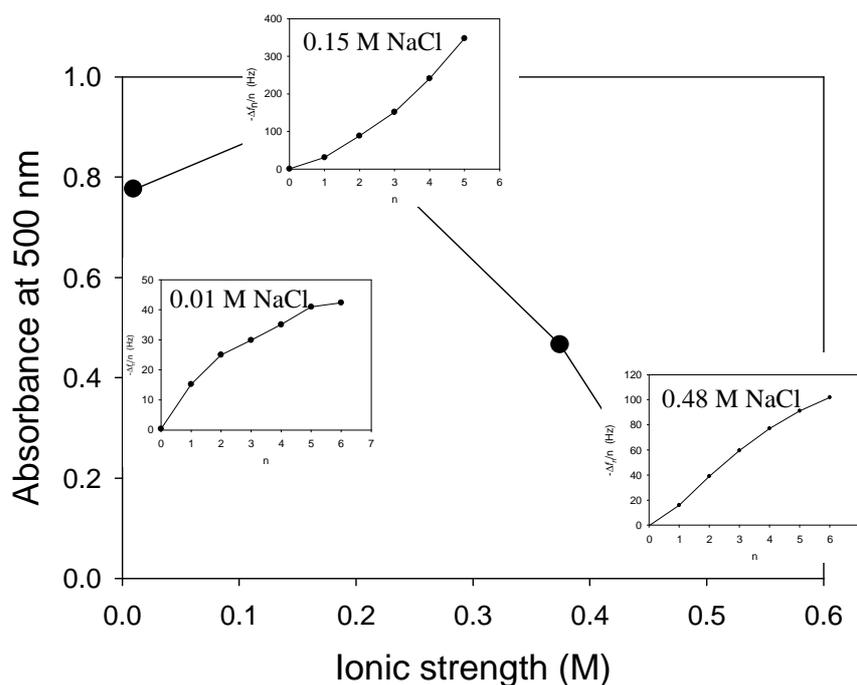
However, the analysis of turbidity in solution does not allow to explain all the behavior of PEM deposition. As seen from the PLL/HA (Figure 2) as well as from the PAH/PGA (Fig. 5), PLL/PSS (Fig. 6) and PDADMAC/PSS (Fig. 7) combinations, the absence or the slow film buildup at small ionic strength seems not related to the occurrence of PE complexation. The analysis of the film buildup for the PLL/HA combination at 0.01 M in NaCl provides an explanation: the film does not deposit because the introduction of the polycation in solution removes the polyanion that is already adsorbed, meaning that the formation of complexes is favorable but that they do not adhere to the substrate (Figure 4). Hence the criterion of important turbidity in solution to predict the occurrence of film deposition is not valid at low ionic strength. In addition, each polycation/polyanion mixture, even PAH/PSS should be characterised by a ionic strength above which no complexation in solution and no film deposition should occur owing to the competition between small counterions and the oppositely charged polyelectrolyte to interact with a given polyelectrolyte.

Let us now see if we can correlate the occurrence of a maximum in turbidity with the growth regime of the PEM film. For now, we only focused at a film obtained after the deposition of a given number of polycation/polyanion layer pairs. It seems also that in the region where the turbidity displays a maximal value, the film growth regime is of supralinear nature, whereas it is linear at smaller ionic strength and the buildup rate decreases at higher ionic strength, as already mentioned. In the salt concentration regime above the maximum, the buildup regime of the film remains exponential with a growth rate that decreases when the ionic strength increases. Finally, one reaches a critical ionic strength above which the multilayer no longer builds up. This trend is represented in Figure 8 for the PDADMAC combination and in Figure 9 for the PLL/HA combination.



**Figure 8.** Growth regime of the PDAMAC/PSS PEM films at different positions in the turbidity (measured as the absorbance at 500 nm) versus sodium chloride concentration plot. The growth curves at 0.01 M was fitted with a straight line whereas the growth curves at 1 and 4 M were fitted with an exponential growth law. Note the difference in the y axis scales for the different plots in insert.

The same trend was also found for the PAH/PGA as well as for the PLL/PGA combinations (data not shown). However, the tendency for an exponential growth of PLL/PSS and PAH/PSS PEM films was less pronounced when the ionic strength in solution increases. This could be related to the observation that the turbidity of the mixtures characterized by  $r \approx 1$  does not reach a maximum for the PAH/PSS mixtures (Figure 2) and only a weakly pronounced maximum for the PLL/PSS mixtures (Figure 6). The comparison between the growth regime and the shape of the turbidity versus NaCl concentration curves (at  $r \approx 1$ ) hence suggests that when the turbidity reaches a maximum, the PEM film growth underwents a transition from a linear to an exponential exponential growth regime. At high salt concentration where turbidity vanishes the multilayer no longer builds up. At low salt concentrations, despite turbidity, the film does not buildup, but for totally different reasons, namely the desorption of polyanion/polycation complexes from the surface.



**Figure 9.** Growth regime of the PLL/HA PEM films at different positions in the turbidity (measured as the absorbance at 500 nm) versus sodium chloride concentration plot. The build up experiments were followed by QCM-D and only the reduced frequency changes at the third overtone are represented. Note the difference in the y axis scales for the different plots in insert.

We make the assumption that in the case of the PLL/PSS and PAH/PSS combination the interpolyelectrolyte interactions are so strong that even a high concentration in NaCl (4 M) is not able to disrupt the polycation-polyanions ion pairs allowing for the build up of PEM films. This disruption should however occur at higher temperatures or in the presence of other small electrolytes. Note, however, that the mechanical properties of the PEM films made from PAH and PSS are weakened in conditions of high NaCl concentration, typically above 3 M.

## 4. Conclusions

In this report we have put additional evidence that there is a strong correlation between polyelectrolyte complexation in solution and PEM build up as previous examples have been provided in the literature (Kovacevic *et al.*, 2002; Kovacevic *et al.*, 2003; Sukhishvili *et al.*, 2006). But here we rely on experiments performed on six polycation-polyanion combination widely used in the investigation of PEM films, namely : PLL/HA, PLL/PGA, PAH/PGA, PLL/PSS, PAH/PSS and PDADMAC/PSS. In all the investigated cases, it appears that strong interpolyelectrolyte complexation (occurring in a lower ionic

strength range) is associated with important film deposition. The different polycation/polyanion distinguish from one another by two markedly different behaviors : in some instances the turbidity versus NaCl concentration as well as the film deposition versus NaCl concentration curves have a maximum or not. The combinations containing a polycarboxylic acid seem to give rise to curves displaying the presence of a maximum versus the combinations containing the strong polyelectrolyte PSS show a monotonous behavior in turbidity as well as in film thickness. However, when PSS is associated to a polycation containing quaternary ammonium groups, PDADMAC, the turbidity as well as film deposition versus NaCl concentration curves display again the presence of a maximum. These two kinds of behaviors are directly related to the interaction strength between the polycation and the polyanion. It depends on the structure of the polyelectrolytes as well as on the physicochemical conditions in the solution (pH, ionic strength, temperature). Our investigation also suggests that the presence of a maximum in the turbidity versus NaCl concentration is also related with the occurrence of a supralinear growth regime, again in accordance with the occurrence of a weakening in the polycation-polyanion interactions.

Anyway the investigation of polyelectrolyte complexation in solution, particularly around charge equivalence ( $r \approx 1$ ), is a particularly powerful diagnostic tool to predict the fate of PEM deposition on surfaces. Nevertheless, the fact that complexation is maximal at  $r \approx 1$  whatever the ionic strength in solution does not mean that the PEM films are characterized by an intrinsic charge compensation, hence by the incorporation of equal number of cationic and anionic groups from the polymers (Schlenoff *et al.*, 1998; Schlenoff and Dubas, 2001).

## 5. Projet Article 1 (Supporting information)

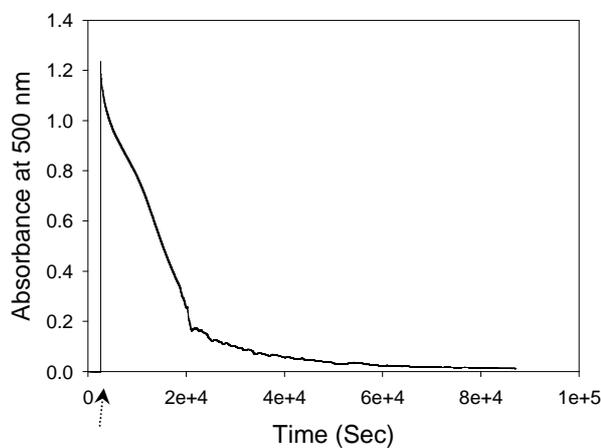
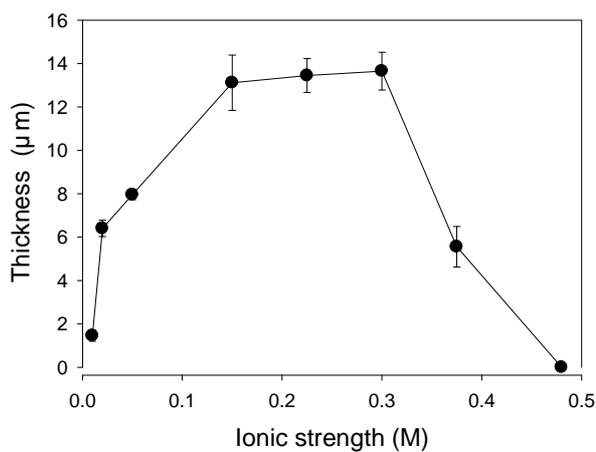


Fig S-1. Kinetic of the decrease of the absorbance at 500 nm of the mixture of PLL and HA at  $r=1$ . The arrow indicates the time of HA injection.



**Fig S-2.** Thickness of (PLL-HA)<sub>50</sub> as a function of ionic strength. The thickness was measured by CLSM.

## **5. Reference List**

- Ariga, K., Hill, J. P., and Ji, Q. M. (2007). "Layer-by-layer assembly as a versatile bottom-up nanofabrication technique for exploratory research and realistic application." *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9, 2319-2340.
- Ball, V., Hubsch, E., Schweiss, R., Voegel, J. C., Schaaf, P., and Knoll, W. (2005). "Interactions between multivalent ions and exponentially growing multilayers: Dissolution and exchange processes." *Langmuir*, 21, 8526-8531.
- Ball, V., Winterhalter, M., Schwinte, P., Lavalle, P., Voegel, J. C., and Schaaf, P. (2002). "Complexation mechanism of bovine serum albumin and poly(allylamine hydrochloride)." *Journal of Physical Chemistry B*, 106, 2357-2364.
- Bohidar, H., Dubin, P. L., Majhi, P. R., Tribet, C., and Jaeger, W. (2005). "Effects of protein-polyelectrolyte affinity and polyelectrolyte molecular weight on dynamic properties of bovine serum albumin-poly(diallyldimethylammonium chloride) coacervates." *Biomacromolecules*, 6, 1573-1585.
- Boulmedais, F., Ball, V., Schwinté, P., Frisch, B., Schaaf, P., and Voegel, J.-C. (2003). "Buildup of Exponentially Growing Multilayer Polypeptide Films with Internal Secondary Structure." *Langmuir*, 19, 440-445.
- Bucur, C. B., Sui, Z., and Schlenoff, J. B. (2006). "Ideal mixing in polyelectrolyte complexes and multilayers: Entropy driven assembly." *Journal of the American Chemical Society*, 128, 13690-13691.
- Burke, N. A. D., Mazumder, M. A. J., Hanna, M., and Stover, H. D. H. (2007). "Polyelectrolyte complexation between poly (methacrylic acid, sodium salt) and poly (diallyldimethylammonium chloride) or poly [2-(methacryloyloxyethyl) trimethylammonium chloride]." *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 45, 4129 - 4143.
- Caruso, F., Donath, E., and Möhwald, H. (1998a). "Influence of polyelectrolyte multilayer coatings on Forster resonance energy transfer between 6-carboxyfluorescein and rhodamine B-labeled particles in aqueous solution." *Journal of Physical Chemistry B*, 102, 2011-2016.
- Caruso, F., Kurth, D. G., Volkmer, D., Koop, M. J., and Muller, A. (1998b). "Ultrathin molybdenum polyoxometalate-polyelectrolyte multilayer films." *Langmuir*, 14, 3462-3465.
- Caruso, F., Lichtenfeld, H., Giersig, M., and Mohwald, H. (1998c). "Electrostatic self-assembly of silica nanoparticle - Polyelectrolyte multilayers on polystyrene latex particles." *Journal of the American Chemical Society*, 120, 8523-8524.
- Chiarelli, P. A., Johal, M. S., Casson, J. L., Roberts, J. B., Robinson, J. M., and Wang, H. L. (2001). "Controlled fabrication of polyelectrolyte multilayer thin films using spin-assembly." *Advanced Materials*, 13, 1167 - 1171.
- Cho, J., and Caruso, F. (2003). "Polymeric multilayer films comprising deconstructible hydrogen-bonded stacks confined between electrostatically assembled layers." *Macromolecules*, 36, 2845-2851.
- Dautzenberg, H., and Jaeger, W. (2002). "Effect of charge density on the formation and salt stability of polyelectrolyte complexes." *Macromolecular Chemistry and Physics*, 203, 2095-2102.

- De Geest, B. G., Sanders, N. N., Sukhorukov, G. B., Demeester, J., and De Smedt, S. C. (2007). "Release mechanisms for polyelectrolyte capsules." *Chemical Society Reviews*, 36, 636-649.
- Decher, G. (1997). "Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites." *Science*, 277, 1232-1237.
- Decher, G., and Hong, J.-D. (1991). "Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process .I. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles on Charged Surfaces." *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Symposia*, 46, 321-327
- Decher, G., Hong, J. D., and Schmitt, J. (1992). "Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charges surface." *Thin Solid Films*, 210/211, 831-835.
- Donath, E., Sukhorukov, G. B., Caruso, F., Davis, S. A., and Mohwald, H. (1998). "Novel hollow polymer shells by colloid-templated assembly of polyelectrolytes." *Angewandte Chemie-International Edition*, 37, 2202-2205.
- Elbert, D. L., Herbert, C. B., and Hubbell, J. A. (1999). "Thin polymer layers formed by polyelectrolyte multilayer techniques on biological surfaces." *Langmuir*, 15, 5355-5362.
- Feng, X., Leduc, M., and Pelton, R. (2008). "Polyelectrolyte complex characterization with isothermal titration calorimetry and colloid titration." *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 317, 535-542.
- Hallberg, R. K., and Dubin, P. L. (1998). "Effect of pH on the binding of beta-lactoglobulin to sodium polystyrenesulfonate." *Journal of Physical Chemistry B*, 102, 8629-8633.
- Hoogeveen, N. G., Cohen Stuart, M. A., Fler, G. J., and Bohmer, M. R. (1996). "Formation and Stability of Multilayers of Polyelectrolytes." *Langmuir*, 12, 3675 -3681.
- Hubsch, E., Fleith, G., Fatisson, J., Labbe, P., Voegel, J. C., Schaaf, P., and Ball, V. (2005). "Multivalent ion/polyelectrolyte exchange processes in exponentially growing multilayers." *Langmuir*, 21, 3664-3669.
- Iler, R. (1966). "Multilayers of colloidal particles." *Journal of Colloid and Interface Science*, 21, 569-594.
- Izumrudov, V. A., and Zhiryakova, M. V. (1999). "Stability of DNA-containing interpolyelectrolyte complexes in water-salt solutions." *Macromolecular Chemistry and Physics*, 200, 2533-2540.
- Jomaa, H. W., and Schlenoff, J. B. (2005). "Accelerated exchange in polyelectrolyte multilayers by "catalytic" polyvalent ion pairing." *Langmuir*, 21, 8081-8084.
- Keller, S. W., Kim, H. N., and Mallouk, T. E. (1994). "Layer-by-Layer Assembly of Intercalation Compounds and Heterostructures on Surfaces - toward Molecular Beaker Epitaxy." *Journal of the American Chemical Society*, 116, 8817-8818.
- Kotov, N. A., Dekany, I., and Fendler, J. H. (1995). "Layer-by-Layer Self-Assembly of Polyelectrolyte-Semiconductor Nanoparticle Composite Films." *Journal of Physical Chemistry*, 99, 13065-13069.
- Kovacevic, D., Van der Burgh, S., De Keizer, A., and Stuart, M. A. C. (2002). "Kinetics of formation and dissolution of weak polyelectrolyte multilayers: role of salt and free polyions." *Langmuir*, 18, 5607-5612.

- Kovacevic, D., Van der Burgh, S., De Keizer, A., and Stuart, M. A. C. (2003). "Specific Ionic Effects on Weak Polyelectrolyte Multilayer Formation." *Journal of Physical Chemistry B*, 107, 7998-8002.
- Krol, S., Nolte, M., Diaspro, A., Mazza, D., Magrassi, R., Gliozzi, A., and Fery, A. (2005). "Encapsulated living cells on microstructured surfaces." *Langmuir*, 21, 705-709.
- Ladam, G., Schaad, P., Voegel, J.-C., Schaaf, P., Decher, G., and Cuisinier, F. J. G. (2000). "In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers." *Langmuir*, 16, 1249-1255.
- Laugel, N., Betscha, C., Winterhalter, M., Voegel, J.-C., Schaaf, P., and Ball, V. (2006). "Relationship between the growth regime of polyelectrolyte multilayers and the polyanion/polycation complexation enthalpy." *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 19443-19449.
- Lavalle, P., Gergely, C., Cuisinier, F. J. G., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Picart, C. (2002). "Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: An in situ atomic force microscopy study." *Macromolecules*, 35, 4458-4465.
- Lindhoud, S., Norde, W., and Stuart, M. A. C. (2009). "Reversibility and Relaxation Behavior of Polyelectrolyte Complex Micelle Formation." *Journal of Physical Chemistry B*, 113, 5431-5439.
- Lutkenhaus, J. L., and Hammond, P. T. (2007). "Electrochemically enabled polyelectrolyte multilayer devices: from fuel cells to sensors." *Soft Matter*, 3, 804-816.
- Lvov, Y., Ariga, K., Ichinose, I., and Kunitake, T. (1995). "Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic layer-by-layer adsorption." *Journal of the American Chemical Society*, 117, 6117-6123.
- Lvov, Y., Decher, G., and Sukhorukov, G. (1993). "Assembly of Thin-Films by Means of Successive Deposition of Alternate Layers of DNA and Poly(Allylamine)." *Macromolecules*, 26, 5396-5399.
- Mattison, K. W., Dubin, P. L., and Brittain, I. J. (1998). "Complex formation between bovine serum albumin and strong polyelectrolytes: Effect of polymer charge density." *Journal of Physical Chemistry B*, 102, 3830-3836.
- Michaels, A. S. (1965). "Polyelectrolyte complexes." *Industrial & Engineering Chemistry*, 57, 32-40.
- Mjahed, H., Voegel, J. C., Senger, B., Chassepot, A., Rameau, A., Ball, V., Schaaf, P., and Boulmedais, F. (2009). "Hole formation induced by ionic strength increase in exponentially growing multilayer films." *Soft Matter*, 5, 2269-2276.
- Nolte, A. J., Takane, N., Hindman, E., Gaynor, W., Rubner, M. F., and Cohen, R. E. (2007). "Thin film thickness gradients and spatial patterning via salt etching of polyelectrolyte multilayers." *Macromolecules*, 40, 5479-5486.
- Picart, C., Lavalle, P., Hubert, P., Cuisinier, F. J. G., Decher, G., Schaaf, P., and Voegel, J.-C. (2001). "Buildup mechanism for poly(L-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface." *Langmuir*, 17, 7414-7424.
- Picart, C., Mutterer, J., Richert, L., Luo, Y., Prestwich, G. D., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Lavalle, P. (2002). "Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte

- multilayers.*" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 12531-12535.
- Ramsden, J. J., Lvov, Y. M., and Decher, G. (1995). "*Determination of optical constants of molecular films assembled via alternate polyion adsorption.*" *Thin Solid Films*, 254, 246-251.
- Richert, L., Lavallo, P., Payan, E., Shu, X. Z., Prestwich, G. D., Stoltz, J.-F., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Picart, C. (2004). "*Layer by layer buildup of polysaccharide films: Physical chemistry and cellular adhesion aspects.*" *Langmuir*, 20, 448-458.
- Salomaki, M., Vinokurov, I. A., and Kankare, J. (2005). "*Effect of temperature on the buildup of polyelectrolyte multilayers.*" *Langmuir*, 21, 11232-11240.
- Schlenoff, J., Ly, H., and Li, M. (1998). "*Charge and mass balance in polyelectrolyte multilayers.*" *Journal of the American Chemical Society*, 120, 7626-7634.
- Schlenoff, J. B., and Dubas, S. T. (2001). "*Mechanism of Polyelectrolyte Multilayer Growth: Charge Overcompensation and Distribution.*" *Macromolecules*, 34, 592-598.
- Schlenoff, J. B., Dubas, S. T., and Farhat, T. (2000). "*Sprayed polyelectrolyte multilayers.*" *Langmuir*, 16, 9968-9969.
- Seyrek, E., Dubin, P. L., and Henriksen, J. (2007). "*Nonspecific electrostatic binding characteristics of the heparin-antithrombin interaction.*" *Biopolymers*, 86, 249-259.
- Sukhishvili, S. A., and Granick, S. (2000). "*Layered, erasable, ultrathin polymer films*" *Journal of the American Chemical Society*, 122, 9550-9551.
- Sukhishvili, S. A., and Granick, S. (2002). "*Layered, erasable polymer multilayers formed by hydrogen-bonded sequential self-assembly.*" *Macromolecules*, 35, 301-310.
- Sukhishvili, S. A., Kharlampieva, E., and Izumrudov, V. (2006). "*Where polyelectrolyte multilayers and polyelectrolyte complexes meet.*" *Macromolecules*, 39, 8873-8881.
- Szyk, L., Schwinté, P., Voegel, J.-C., Schaaf, P., and Tinland, B. (2002). "*Dynamical behavior of human serum albumin adsorbed on or embedded in polyelectrolyte multilayers.*" *Journal of Physical Chemistry B*, 106, 6049-6055.
- Takahashi, D., Kubota, Y., Kokai, K., Izumi, T., Hirata, M., and Kokufuta, E. (2000). "*Effects of surface charge distribution of proteins in their complexation with polyelectrolytes in an aqueous salt-free system.*" *Langmuir*, 16, 3133-3140.
- Takita, R., Yoshida, K., and Anzai, J. (2007). "*Redox properties of ferricyanide ion on layer-by-layer deposited poly(glutamic acid) film-coated electrodes and its use for electrocatalytic sensing of ascorbic acid.*" *Sensors and Actuators B-Chemical*, 121, 54-60.
- Tang, Z. Y., Wang, Y., Podsiadlo, P., and Kotov, N. A. (2006). "*Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering.*" *Advanced Materials*, 18, 3203-3224.
- Trukhanova, E. S., Izumrudov, V. A., Litmanovich, A. A., and Zelikin, A. N. (2005). "*Recognition and selective binding of DNA by lonenes of different charge density.*" *Biomacromolecules*, 6, 3198-3201.
- Wang, Y., Angelatos, A. S., and Caruso, F. (2008). "*Template synthesis of nanostructured materials via layer-by-layer assembly.*" *Chemistry of Materials*, 20, 848-858.

- Xie, A. F., and Granick, S. (2002). "*Local electrostatics within a polyelectrolyte multilayer with embedded weak polyelectrolyte.*" *Macromolecules*, 35, 1805-1813.
- Yoo, D., Shiratori, S. S., and Rubner, M. F. (1998). "*Controlling bilayer composition and surface wettability of sequentially adsorbed multilayers of weak polyelectrolytes.*" *Macromolecules*, 31, 4309-4318.
- Zacharia, N. S., DeLongchamp, D. M., Modestino, M., and Hammond, P. T. (2007). "*Controlling diffusion and exchange in layer-by-layer assemblies.*" *Macromolecules*, 40, 1598-1603.
- Zelikin, A. N., Trukhanova, E. S., Putnam, D., Izumrudov, V. A., and Litmanovich, A. A. (2003). "*Competitive reactions in solutions of poly-L-histidine, calf thymus DNA, and synthetic polyanions: Determining the binding constants of polyelectrolytes.*" *Journal of the American Chemical Society*, 125, 13693-13699.

## Chapitre IV :

### Effet de la variation de la force ionique sur le comportement des films multicouches préformés

---

<b>IV.1 Résumé.....</b>	<b>156</b>
<b>IV.2 Article 2.....</b>	<b>159</b>

Hajare Mjahed, Jean-Claude Voegel, Bernard Senger, Armelle Chassepot, Alain Rameau, Vincent Ball, Pierre Schaaf and Fouzia Boulmedais, "*Hole formation induced by ionic strength increase in exponentially growing multilayer films*", **Soft Matter**, 2009, 5, 2269.

<b>IV.3 Article 2 (Supporting information).....</b>	<b>167</b>
<b>IV.4 Projet d'Article 3 .....</b>	<b>171</b>

"*Exponentially growing polyelectrolyte multilayers: Film restructurations under osmotic stresses*", **in preparation**

---

## IV.1 Résumé

Les films multicouches de polyélectrolytes consistent en une structure supramoléculaire obtenue par adsorption alternée de polycations et de polyanions. Ces films multicouches, basé principalement sur des interactions électrostatiques, peuvent répondre de manière spécifique à différents stimuli externes. Selon les polyélectrolytes qui les composent, ces films adaptatifs peuvent être utilisés comme des matériaux fonctionnels ayant des propriétés physico-chimiques modulables (densité de charges, propriétés viscoélastiques, propriétés optiques), soit dans le but de délivrer des composés actifs consécutivement à une variation de pH, de température ou de lumière ou encore des films bio-interactifs. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'influence de différents chocs osmotiques, via un changement de force ionique de la solution surnageante, sur le film multicouche poly(L-lysine) PLL/(acide hyaluronique) HA. Ce film est caractérisé par une croissance exponentielle de l'épaisseur en fonction des cycles de dépôts des polyélectrolytes. La neutralité des charges au sein du film PLL/HA est assurée à la fois par une compensation intrinsèque (association entre polyélectrolytes de charge opposées) et une compensation extrinsèque des charges (contre-ions qui sont en équilibre avec le surnageant). De ce fait, ces films sont très sensibles aux variations de la force ionique durant et après leur construction.

Les films multicouches PLL/HA constitués de cinquante paires de couches ont été marqués par la PLL<sup>FITC</sup>. Cette dernière, diffusant à travers tout le film, permet de visualiser toute l'épaisseur du film par microscopie confocale. Nous avons pu ainsi visualiser *in situ* le comportement des films PLL/HA en réponse aux différents chocs osmotiques. Dans un premier temps, nous avons observé que l'augmentation progressive de la force ionique du surnageant induit un gonflement du film et une libération des polyélectrolytes, suivie par fluorimétrie. Ce phénomène de libération dépend de la force ionique, puisqu'à une force ionique de 0.375 M en NaCl, le film présente un gonflement plus important et une cinétique de libération de polyélectrolytes beaucoup plus rapide que pour des forces ioniques inférieures à cette dernière. Après 1 mois, au contact d'une solution de NaCl dont la concentration est supérieure à 0.3 M, le film finit par se dissoudre. L'exposition du film à une force ionique de 0.48 M induit, en plus de sa dissolution matérialisée par la libération des polyélectrolytes, l'apparition de cavités sphériques à l'intérieur du film. La présence de polyélectrolytes libres dans ces cavités, visualisés par microscopie confocale, induit une concentration ionique plus forte. Par conséquent, la pression osmotique devient plus forte à l'intérieur des cavités que dans le film environnant. Cette augmentation de la pression conduit

à une augmentation en taille de ces cavités. Cependant, au fur et à mesure que les polyélectrolytes diffusent vers le milieu, la pression osmotique diminue et l'excès de la concentration en ions diminue entraînant la disparition des cavités. A la fin de ce processus, une dissolution complète du film est observée. Lorsque la libération des polyélectrolytes est bloquée par la construction d'un film barrière à base de PDADMAC/PSS préalablement déposée sur le film PLL/HA, l'apparition des cavités est observée à une concentration de 0.375 M en NaCl plus faible qu'en absence de la barrière. La présence de ce film barrière empêche la diffusion des polyélectrolytes à travers le film. La concentration en polyélectrolytes ainsi qu'en ions ne diminue pas dans les cavités, la différence de pression osmotique est maintenue. Cependant, dès la rupture de la barrière, les polyélectrolytes libres diffusent vers la solution et les cavités se réduisent en taille et disparaissent.

Dans un second temps, nous avons évalué le comportement de ce même film multicouche lorsque celui-ci est soumis à une diminution de la force ionique. Nous avons montré que le film multicouche diminue en épaisseur avec une libération des polyélectrolytes dans le surnageant. Lors du dégonflement, lorsque le choc subit est important, des cavités apparaissent à l'intérieur du film. La taille de ces cavités dépend de l'écart de force ionique entre la solution de contact et la solution initiale de construction (0.15 M en NaCl). Plus cet écart est grand plus la taille des cavités est importante. Par contre, lorsque l'écart est faible, la microscopie confocale ne révèle pas de cavités au sein du film. Ces cavités finissent par disparaître au cours du temps quelle que soit leur taille. La libération des polyélectrolytes dans le surnageant reflète une restructuration au sein du film multicouche. La diminution de la force ionique du surnageant appauvrit le film en ions sodium et chlorure, la compensation extrinsèque des charges est réduite engendrant ainsi des forces de répulsion entre les polyélectrolytes de même signe. D'autre part, après gonflement du film par augmentation de la force ionique, le retour à la force ionique initiale du surnageant s'accompagne d'une compaction du film avec formation de craquelures irrégulières qui disparaissent au cours du temps et cela sans libération des polyélectrolytes dans le surnageant. Le film retrouve alors son épaisseur initiale dans la mesure où le temps de contact lors du gonflement n'induit pas une libération conséquente des polyélectrolytes. Etant donné que lors du dégonflement, une libération rapide et importante des polyélectrolytes a lieu dès les premiers moments de contact avec la solution de plus faible force ionique, le film multicouche se voit réduit en épaisseur une fois remis dans sa solution initiale.

Dans cette partie, nous avons montré que *via* le changement de force ionique de la solution de contact, le film multicouche PLL/HA répond par un gonflement ou un

dégonflement accompagnées ou non de libération de polyélectrolytes et de formation de cavités ou de craquelures.

*Signalement bibliographique ajouté par le :*

**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**  
**Service Commun de Documentation**

**Hole formation induced by ionic strength increase in exponentially growing multilayer films**

Hajare MJAHEDE, Jean-Claude VOEGEL, Bernard SENGER, Armelle CHASSEPOT, Alain RAMEAU, Vincent BALL, Pierre SCHAAF, Fouzia BOULMEDAIS

**Soft Matter, 2009, vol. 5, pages 2269-2276**

© Royal Society of Chemistry 2009

**Pages 159-170 :**

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/10.1039/b819066f>

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/>

## IV.4 Projet d'Article 3

### “Exponentially growing polyelectrolyte multilayers: Film restructurations under osmotic stresses”

#### **1. Introduction**

The buildup of polyelectrolyte multilayer films (PEMs) by the so called layer by layer (L.b.L) approach became a very popular and simple surface coating process. It's based on an alternated deposition of oppositely charged polyelectrolytes. The driving force for the buildup results generally from the charge overcompensation occurring during each new deposition cycle. The success of the process comes also from the facility to realize such buildups which can be obtained easily via consecutive dipping cycles (Decher, 1997), spin coating (Chiarelli *et al.*, 2001) or by spraying the different elements constituting the architectures (Porcel *et al.*, 2005; Schlenoff *et al.*, 2000). Different kind of charged polymers, of synthetic or natural origin, can be employed for the film construction (Tang *et al.*, 2006). With the different constituting building elements two growth regimes were described (i) linear and (ii) exponential or super linear growing films. The first one is generally thin, often built with synthetic polyelectrolytes or in the presence of weak salt amounts, whereas the second is often obtained in the presence of higher salt amounts or with polypeptides and or polysaccharides (Lavalle *et al.*, 2002; McAloney *et al.*, 2001). The versatility of the L.b.L approach is of interest for various areas like coatings, catalysis, electrooptics, photovoltaic cells (DeLongchamp and Hammond, 2003; Hammond, 1999; Wu *et al.*, 2006). The concept is also interesting for biomedical applications in particular due to the possibility to “biofunctionalize” the films by growth factors, active peptides, drugs or DNA embedding (Picart, 2008; Tang *et al.*, 2006). Because of their thickness, exponentially growing films are particularly interesting for this functionalization. Indeed, large amounts of molecules could be included into these films by simple diffusion (Vodouhê *et al.*, 2006). Moreover, cells deposited on these buildups can interact with the film and then access to the embedded molecules (Benkirane-Jessel *et al.*, 2005; Benkirane-Jessel *et al.*, 2004).

The poly(L-lysine) (PLL) and hyaluronic acid (HA) multilayer film is exponentially growing (Picart *et al.*, 2002), the reached thicknesses lie in the micron range after a limited number of adsorption cycles (Lavalle *et al.*, 2002; Mertz *et al.*, 2007; Mjahed *et al.*, 2009). Therefore, PLL/HA system could play a reservoir role for drugs delivery (Vodouhê *et al.*,

2006). Both polyelectrolytes (HA and PLL) are considered as weakly charged polymers and thus they are very sensitive to pH and ionic strength changes (Burke and Barrett, 2003; Mjahed *et al.*, 2009). The biological applications of such films involve the contact with physiological medium which often induce a swelling or a degradation of films (Mendelsohn *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003). The control of the degradation kinetics is needed in drug delivery and tissue engineering applications. The evolution of such multilayer films, built in a given condition, once the ionic strength is changed is of particular interest. Because of the reached thickness, their morphological evolution can be easily followed *in situ* by confocal microscopy or comparable techniques (Mjahed *et al.*, 2009).

Previously, we investigated the HA/PLL film evolution once the ionic strength of the medium was increased compared to the buildup conditions and found that within the film holes appeared. The holes formation was attributed to the dissolution of part of the complexes of the film. The free polyelectrolytes appearing in the film induce locally an extra osmotic pressure leading to the formation of holes. With time, the free polyelectrolytes diffuse out of the film leading to an identical pressure in and outside of the film inducing film healing and holes disappearance (Mjahed *et al.*, 2009).

The present work is first aimed to investigate (i) the HA/PLL film growth over a large panel of ionic strengths (ranging from 0.02 M to 0.48 M) and (ii) to study the film behaviour when different strong osmotic stresses are applied by varying the ionic strength of the solution in contact with the film.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Materials**

Polyelectrolyte solutions. Poly(L-lysine) (PLL, ref: P2636,  $M_w = 2.92 \times 10^4$  g/mol,  $M_w/M_n = 1.64$ ) and fluorescein isothiocyanate poly(L-lysine) (PLL<sup>FITC</sup>, ref: P3069,  $M_w = 5.89 \times 10^4$  g/mol,  $M_w/M_n$  (vis) = 2.82) with 0.008 FITC group for one lysine monomer, poly(sodium 4-styrene sulfonate) (PSS,  $M_w = 7.06 \times 10^4$  g/mol) and poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDADMAC,  $M_w = 9.36 \times 10^5$  g/mol) were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Hyaluronic acid (HA, ref: 80190,  $M_w = 3.81 \times 10^5$  g/mol,  $M_w/M_n = 1.76$ ) was purchased from Lifecore (Chaska, MN). The mass distributions of the polyelectrolytes were determined by steric exclusion chromatography – multi angle laser light scattering (SEC-MALLS). FITC-labelled HA was synthesized

according to the following procedure: 41 mmol of FITC, dissolved in 2 mL of DMSO, were added to 18 mL of HA aqueous solution (0.31 mmol) and maintained at pH 9 under stirring for 12 h at room temperature. After addition of 40 mL of MilliQ water, the product was dialyzed against 10 L of MilliQ water during 6 days. HA<sup>FITC</sup> is labeled at 0.01% in FITC (0.0001 FITC group for one di-saccharide). Rhodamine-labelled PSS (PSS<sup>Rho</sup>) was synthesized according to a procedure described elsewhere (Dahne *et al.*, 2001). NaCl aqueous solutions were prepared at 0.01 M, 0.04 M, 0.15 M, 0.225 M, 0.3 M, 0.375 M and 0.48 M, and buffered at pH 7.4 with 1 mM Hepes (Sigma Aldrich, ref: H3375) using ultrapure water (MilliQ- plus system, Millipore) with a resistivity of 18.2 MΩ.cm. Polyelectrolyte solutions were prepared by dissolution of adequate amounts of polyelectrolyte powders (or by dilution of the commercial solution in the case of PDADMAC) in 1 mM Hepes – 0.15 M NaCl buffer at pH 7.4. HA and PLL solutions were prepared at a concentration of  $3 \times 10^{-3}$  M in monomer units. PDADMAC, PSS and PLL<sup>FITC</sup> solutions were prepared at a concentration of 1 mg/mL in 1 mM Hepes 0.15 M NaCl buffer at pH 7.4. PSS<sup>Rho</sup> was used at 1 mg/mL in 0.15 M NaCl solution. At pH 7.4, PLL and PDADMAC are positively charged and HA and PSS are negatively charged.

## 2.2 Build-up of polyelectrolyte multilayers

The PEM films were built with an automatized dipping robot (Riegler & Kirstein GmbH, Potsdam, Germany) on glass slides (coverslips from Menzel GmbH & Co, Braunschweig, Germany). Before polyelectrolyte adsorption, the glass slides were cleaned with 0.1 M sodium dodecyl sulfate (dipping for 15 min), 0.1 M HCl (dipping for 15 min), and pure water. Then, the glass slides were dipped in a polycation solution for 10 min. A rinsing step was performed by dipping the substrate for 10 min in 1 mM Hepes – (0.01 M, 0.02 M, 0.15 M, 0.225 M, 0.3 M, 0.375 M, 0.48 M) NaCl buffer (pH 7.4). The polyanion was then deposited in the same manner. The buildup process was pursued by alternated depositions of the polycation and the polyanion. After deposition of *n* bilayers, the film obtained is denoted (polycation/polyanion)<sub>*n*</sub>. The buildup of the PDADMAC/PSS barrier on the surface of the (PLL/HA)<sub>50</sub> multilayer film was realized directly under the confocal microscope. 200 mL of each polyelectrolyte solution were deposited alternately for 1 min of adsorption. It must be pointed out that the buildup of the barrier may lead to exchange phenomena at the interface with the PLL/HA film. Limiting the adsorption time of PSS and PDADMAC to 1 min should attenuate this exchange and avoid the disorganization of the PLL/HA film. A rinsing step was

performed by adding 200 mL of 1mMHepes – 0.15 M NaCl buffer (pH 7.4) and letting it in contact with the film for 5 min, after each polyion adsorption step. The multilayer films were not dried.

### 2.3 Quartz cristal microbalance and dissipation (QCM-D)

The construction of multilayer films was monitored *in situ* by quartz crystal microbalance with dissipation monitoring QCM-D (Q-Sense E4, Göteborg, Sweden), containing 4-sensor chambers. The QCM technique consists in measuring the resonance frequency changes ( $\Delta f$ ) of a quartz crystal induced by polyelectrolyte adsorption on the crystal, when compared to the crystal in contact with a rinsing solution (aqueous NaCl solution). The quartz crystal is excited at its fundamental frequency (5 MHz), and the measurements are performed at the first, third, fifth and seventh overtones (denoted by  $\nu = 1, 3, 5$  and  $7$ , respectively) corresponding to 5, 15, 25, and 35 MHz, respectively. Changes in the resonance frequencies,  $\Delta f$ , and in the relaxation of the vibration once the excitation is switched off are measured at these four frequencies. The relaxation measurement gives access to the change in the dissipation factor,  $D$ , of the vibration energy stored in the resonator. The crystal used is coated with a  $\sim 50$  nm  $\text{SiO}_2$  film. The four sensors are fixed in removable flow modules with inlet and outlet. The measurement methodology has been addressed in details elsewhere (Zhang *et al.*, 2005). 600  $\mu\text{L}$  of NaCl solution were injected into the measurement cell. After stabilization of the signals, 600  $\mu\text{L}$  of the polycation solution containing NaCl were injected, left in the cell for 5 min, and rinsed with the NaCl solution and left again for 5 min. During the whole process, the frequency shifts were continuously recorded as a function of time. The same procedure was used for the deposition of polyanion by adding 600  $\mu\text{L}$  of its solution also containing NaCl. The construction was pursued by alternate depositions of polycation and polyanion. A positive shift in the opposite of the normalized frequency shift,  $-\Delta f/\nu$ , can be associated, in first approximation, with an increase of the mass adsorbed on the crystal.

### 2.4 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Confocal laser scanning microscopy investigations were performed on films in contact with NaCl solution. CLSM observations were carried out with a Zeiss LSM-510 microscope using a 40x/1.4 oil immersion objective and a 0.43 mm z-section interval. For all CLSM

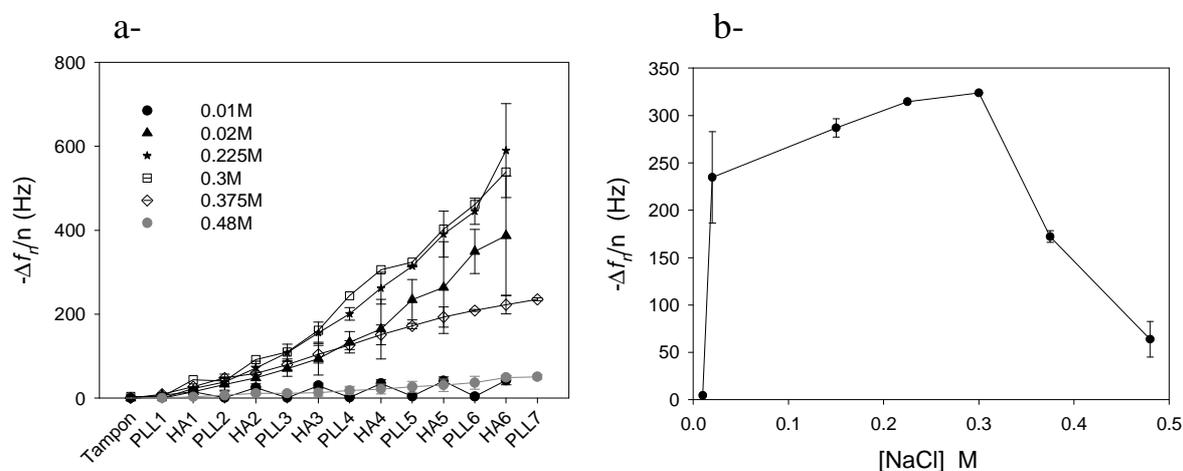
observations unless otherwise stated, the adsorption of PLL<sup>FITC</sup> was performed by dipping the multilayer films for 15 min in a PLL<sup>FITC</sup> solution and rinsing with 1 mM Hepes – 0.15 M NaCl buffer at pH 7.4 before its observation. FITC fluorescence was detected upon excitation at 488 nm, through a cut-off dichroic mirror and an emission bandpass filter of 505–530 nm (green). Rhodamine fluorescence was detected upon excitation at 543 nm and an emission long-pass filter above 585 nm (red emission). Virtual vertical sections can be visualized, allowing the film thickness to be determined.

### **3. Results and Discussions**

#### **3.1 HA/PLL film buildups at different ionic strengths**

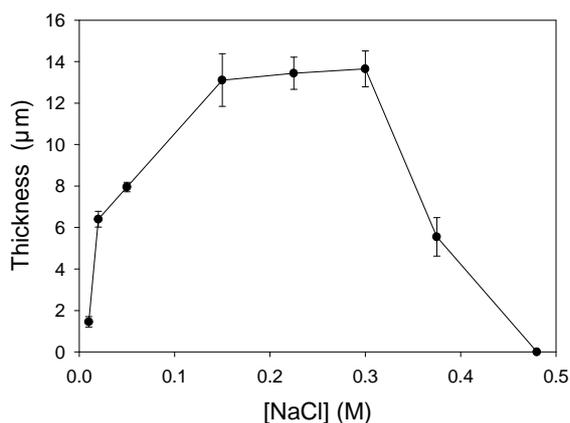
Typical HA/PLL multilayered films built at pH 7.4 in the presence of variable concentrations of NaCl from (0.02 M to 0.48 M) monitored by QCM-D are given in Fig .1. It comes clearly that the signals evolve exponentially or superlinearly for the buildups performed in presence of NaCl ranging from 0.02 M and 0.375 M. Such growth regimes have been described earlier for the same HA/PLL system (Lavalle *et al.*, 2002). It was also shown that the exponentially growing films become linear after roughly twelve adsorption cycles (Porcel *et al.*, 2006). The slope of this second linear regime being quite larger than that of typical linear growing films explaining also why such films reach rapidly  $\mu\text{m}$  thicknesses range. The buildups realized at 0.01 M and 0.48 M possess a particular behaviour and the thickness increases are quite slower with respect to the deposition cycles. The process at 0.01 M clearly indicates a decrease of the  $-\Delta f/v$  signal after each PLL addition constituting a signature for a loss of material during this step. At low ionic strength, the interactions within the film are mainly due to fixed intrinsic charges (Schlenoff *et al.*, 1998) of HA and PLL. A possible origin of the signal decrease could be a kind of “erosion” due to the exchange of the upper complexes by incoming PLL chain forming stronger electrostatic interactions with the underneath layer and lead to soluble charged complexes. The observation of removal during PEM deposition was observed by Sui *et al.* (Sui *et al.*, 2003). These authors explain this phenomenon by the formation of soluble complexes. In the following, polyanion addition step HA is again uptaken and the signal rises again. In the presence of 0.48 M NaCl, the important ionic strength screening leads to a strong decrease of the electrostatic interactions (Dubas and Schlenoff, 2001). Thus, the interactions between complexes are very weak. At the 0.48 M

ionic strength, the adsorption of both PLL and HA, are very low. Moreover, this value constitutes the upper limit of ionic strength for the buildup of the HA/PLL films at pH 7.4.



**Figure 1.** Changes in frequency ( $\Delta f_n/n$ ) at 15 MHz of (a) multilayers film of PLL/HA as a function of layer number at different ionic strength of NaCl solution and (b) values of ( $\Delta f_n/n$ ) at 15 MHz at 5 bilayers of PLL/HA as a function of ionic strength of NaCl solution. Two measurements were made by QCM-D to obtain the average frequency variation and the corresponding standard deviation (error bar).

All these observations do not hold only for the initial film buildup steps (Fig. 1.b) but also for thicker films (Fig. 2) where the thicknesses are estimated from confocal microscopy imaging for (PLL/HA)<sub>50</sub>.



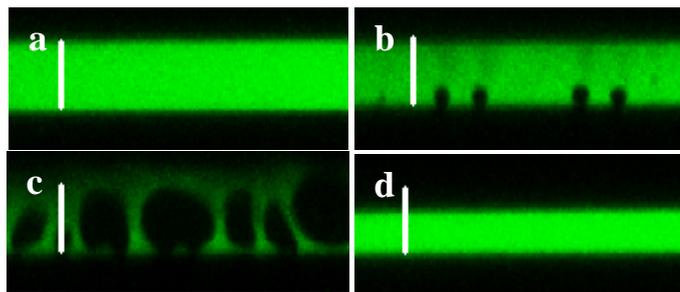
**Figure 2.** Thickness of (PLL/HA)<sub>50</sub> as a function of the buildup concentration of NaCl solution. The thickness was evaluated by CLSM. Three different films were observed by CLSM to obtain the average thickness and the corresponding standard deviation (error bar).

The ionic strength of 0.15 M NaCl is among the ionic strengths explored one the most favourable in terms of growth for the PLL/HA buildup. As most polyelectrolyte-based

systems studies in literature for applications in biological domain, it was of interest to consider more specifically the case of 0.15 M ionic strength. For the next of our studies, all PLL/HA films have been built at 0.15 M NaCl.

### 3.2 PEMs submitted to an osmotic shock by ionic strength decreases

We investigated the film restructuration process and thickness evolutions for (PLL/HA)<sub>50</sub> built in the presence of 0.15M NaCl. We explored two situations: either the ionic strength is (i) rapidly or (ii) slowly decreased. Fig. 3 gives the evolution of the film structure and thickness when the decrease is performed in a rapid manner by a rapid decrease of the ionic strength from 0.15 M to 0.04 M (step b) followed, after one minute, by a further reduction to 0.01 M (step c). Finally, after more minute stabilization, the film is brought back to its initial ionic strength of 0.15 M. The strong ionic strength decrease leads to the formation of large holes observed in step (b) or (c) (Fig. 3).



**Figure 3.** Vertical section images of (PLL/HA)<sub>50</sub>- PLL<sup>FITC</sup> built up at 0.15 M NaCl and observed by CLSM (a) in contact with a 0.15 M NaCl solution, (b) after 1 min in contact with a 0.04 M NaCl solution, (c) after 1 min in contact with a 0.01 M NaCl solution, (d) after 16 hours in contact with a 0.15 M NaCl solution. The initial film was put step by step in contact with decreasingly concentrated NaCl solutions (1 min of contact at each step) before observation. The scale bar represents 10  $\mu$ m.

A possible origin of these holes could be the important counter-ion release involved in the extrinsic charge compensation of polyelectrolytes complexes inside the film. As a consequence, an important destructuration of the complexes is occurring in addition with new complexes formation. These novel complexes could mainly result from interactions *via* intrinsic charges born by both polyelectrolytes. This important restructuration step could be accompanied by free polyelectrolytes and/or solubles complexes formation within the film due to the increase of repulsion forces. The free polyelectrolytes create an excess of osmotic pressure inside the film and therefore induce the formation of holes. The holes sizes depend

on the importance of the shock. Thus, in step (b) small holes are formed, which disappear after about 10 min once the ionic strength is maintained constant (data not shown). However, when the ionic strength is further decreased rapidly, larger holes (step c) are formed probably because of further decomplexation processes. When, one waits, again several minutes (depending on the hole sizes), the holes disappear and a thinner film finally remains (data not shown). Once it is put back to its initial ionic strength of 0.15 M, a homogeneous film recovers after several hours. However, the film thickness decreases by about 50% due to the important loss of polyelectrolytes during the initial osmotic shocks application. This material loss is materialized by the rapid and important fluorescence (PLL<sup>FITC</sup>) appearing during the ionic strength decreases.

When, in the first step (b), a less strong decrease in the ionic strength, from 0.15 M to 0.075 M followed by 0.03 M, is applied (data not shown), the film also decreases in thickness. However, no apparent holes were visible by confocal microscopy, although a loss of material is occurring.

### 3.3 PEMs underwent several osmotic shocks

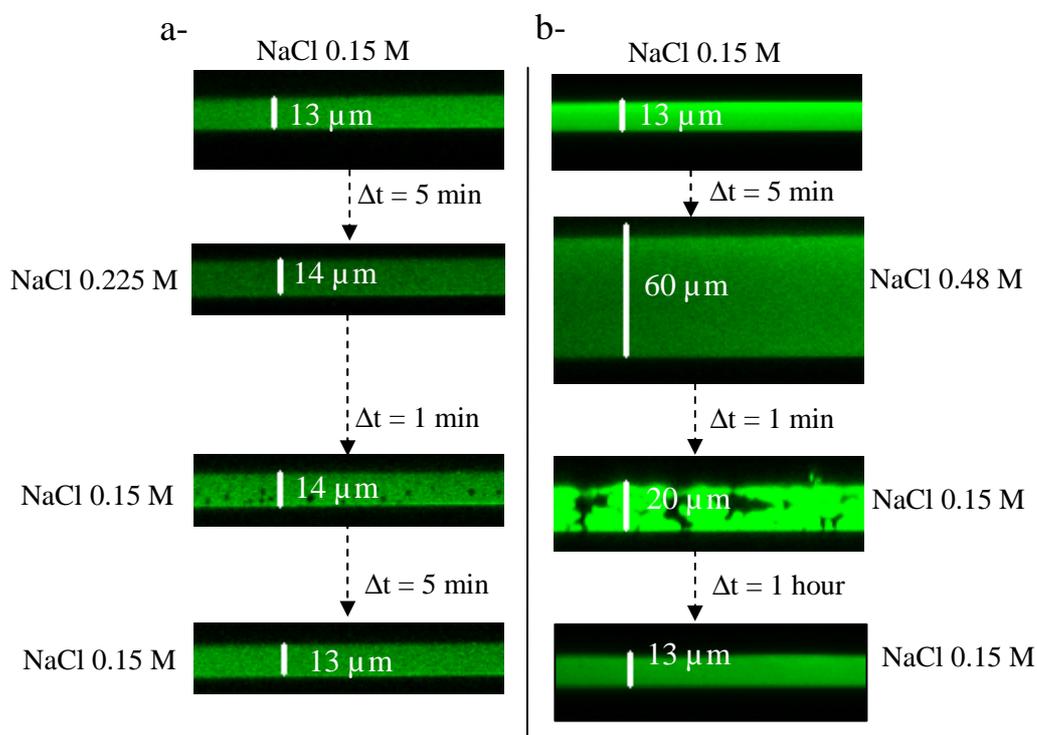
In a second time, we were interested by the behaviour of PEMs after several osmotic shocks.

#### *a. Ionic strength increase followed by a decrease*

In order to evaluate the effect of an increase followed by a decrease of the ionic strength, films built at 0.15 M were either put in contact with a solution at 0.225 M NaCl or progressively brought from 0.15 M to 0.48 M NaCl, with a contact time of 5 min at each step (i.e. at 0.225 M, 0.3 M, 0.375 M and 0.48 M) before to bring them back to the initial solution contact of 0.15 M NaCl (Fig. 4). At 0.48 M NaCl, the film remains homogeneous when the contact time does not exceed 5 min. Otherwise, holes appear inside multilayers film as previously described leading to the dissolution of the film (Mjahed *et al.*, 2009).

It is interesting to notice that in both cases the final film thickness once the film is brought back to 0.15 M NaCl is identical to the initial thickness of the built film. Moreover, no fluorescence release is observed during the experience. However, in both cases, when the ionic strength was brought back to 0.15 M NaCl, we observed that holes with irregular shape appeared throughout the film. The shape of these holes differ totally from the ones found when the ionic strength of the PEMs was increased and maintained for a long period at values

above 0.375 M (Mjahed *et al.*, 2009). An explanation of these holes formation could be as following. The osmotic shock during ionic strength increase induces counter ion flow into the film which swells. When the ionic strength is brought back to 0.15 M NaCl, counter ions are released in the supernatant. This release could lead to a condensation of the complexes which shrink in size and forms cracks through the film. During this process, absolutely no material is lost (absence of fluorescence in solution) suggesting the absence of polyelectrolytes release from the film during the different stages. Because of the large mobility of involved polyelectrolytes, the cracks disappear with time. Finally, the whole film heals and recovers totally its initial thickness in one hour.

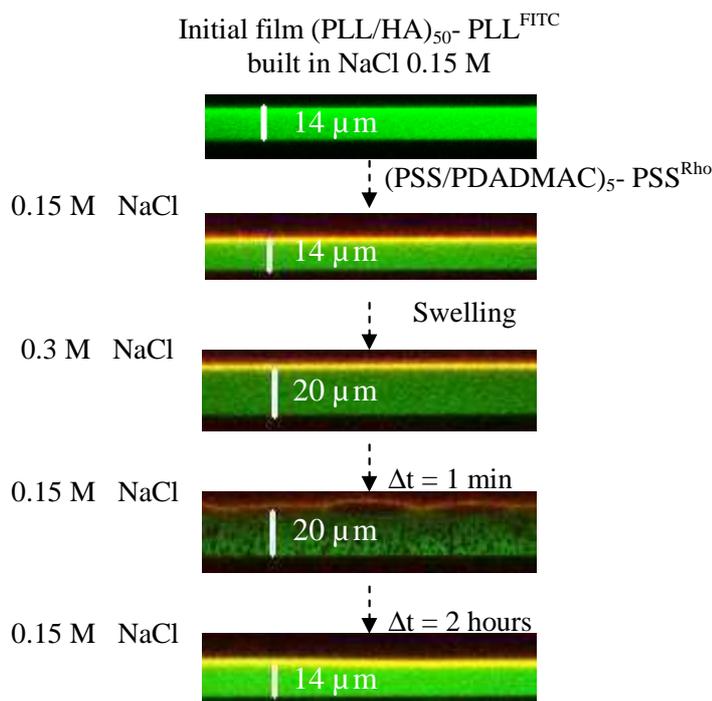


**Figure 4.** Vertical section images of  $(\text{PLL}/\text{HA})_{50}\text{-PLL}^{\text{FITC}}$  built in 0.15 M NaCl and (a) put in contact with a 0.225 M NaCl and brought back to 0.15 M NaCl, or (b) progressively brought to 0.48 M and put back in 0.15 M NaCl.  $\Delta t$  represents the time contact. The bar represents the thickness of the films.

*b. Films capped by a  $(\text{PDADMAC}/\text{PSS})_5$  barrier submitted to increases and decreases of ionic strength*

To try to understand the mechanism of the formation of irregular holes after two osmotic shocks, PDADMAC/PSS multilayers, acting as a barrier of polyelectrolytes diffusion, were built on the top of PLL/HA film.

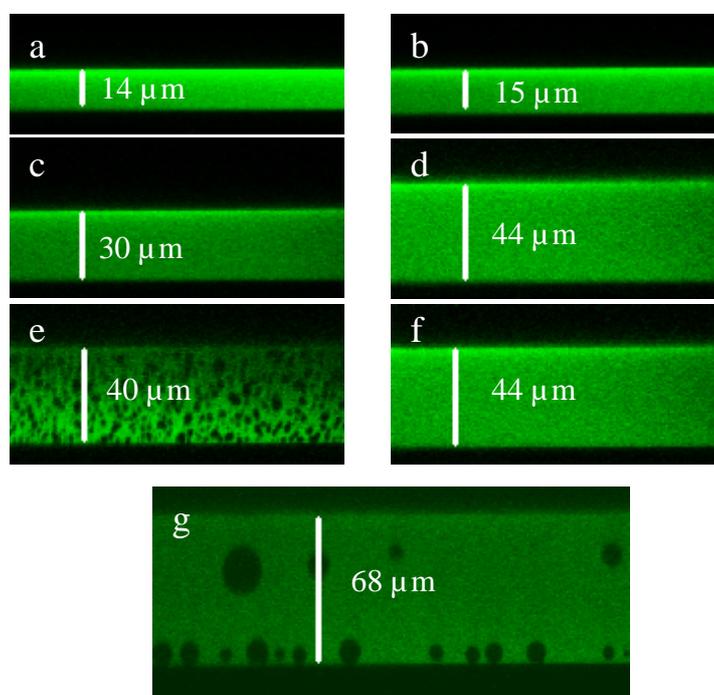
We brought a  $(\text{PLL}/\text{HA})_{50}$  film (Fig. 5), capped by a  $(\text{PSS}/\text{PDADMA})_5$  barrier, progressively to a NaCl solution at 0.3 M. The film increases in thickness. Once it is brought back to 0.15 M NaCl, again numerous irregularly shaped holes appears over the whole film. We observed, as in Fig. 5, a fully similar behaviour than in the absence of the capping film suggesting again that the holes are the consequence of complexes restructuration with ions releases without polyelectrolytes diffusion out of the film. These ion releases could contribute entropically to the film restructuration. A shrinking of the sizes of complexes occurs when ions are releasing and the holes finally disappear after about 2h consequence of the reorganization of the film. Finally a homogeneous film is recovered with a thickness identical to the initial film built at 0.15 M. The absence of any incidence of the capping neither in the process evolution nor in the time evolution clearly comforts the hypothesis of the small ion releases without lost of polyelectrolyte.



**Figure 5.** Vertical section images of  $(\text{PLL}/\text{HA})_{50}$ - $\text{PLL}^{\text{FITC}}$  built in 0.15 M NaCl and capped by a  $(\text{PSS}/\text{PDADMA})_5$ -  $\text{PSS}^{\text{Rho}}$ . The structure was progressively brought to 0.3 M and put back in 0.15 M NaCl.  $\Delta t$  represents the contact time. The bar represents the thickness of the films.

- c. Films underwent several different osmotic shocks : successively ionic strength increase, decrease and increase

In this part of work, we submitted the PEMs to a cascade of ionic shocks, by increasing, decreasing and increasing again successively the ionic strength of the supernatant solutions (Fig. 6). In such typical experiments the ionic strength is progressively increased from 0.15 M to 0.375 M. Then decreased to 0.3 M NaCl with the characteristic irregular holes formation, without loss of material and healing after several hours. Now, instead of remaining the film at rest, it is brought to 0.375 M, we immediately observed disappearance of holes. At 0.48 M, the characteristic spherical holes due to partial complexes dissolution resulting from the high ionic strength (Mjahed *et al.*, 2009) appear. These holes could be the consequence of an excess of osmotic pressure due to the free polyelectrolytes appearing during complexes dissolution. These holes disappear with time with the diffusion of the free polyelectrolytes in the bulk solution leading to a total dissolution of the film.

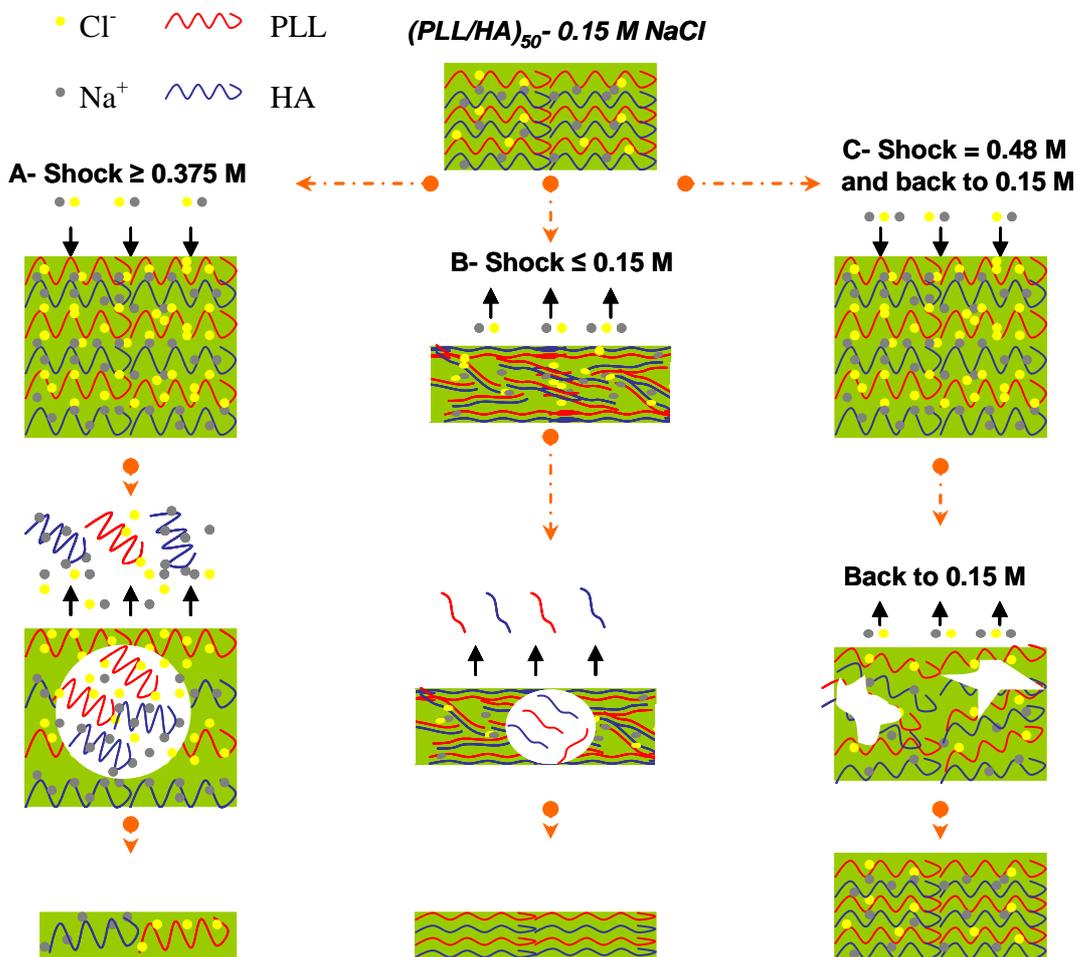


**Figure 6.** Vertical section images of  $(\text{PLL}/\text{HA})_{50}\text{-PLL}^{\text{FITC}}$  built up at 0.15 M NaCl and observed by CLSM (a) in contact with 0.15 M NaCl solution, (b) and after 1 min in contact with 0.225 M NaCl solution, (c) and after 1 min in contact with 0.3 M NaCl solution, (d) and after 1 min in contact with 0.375 M NaCl solution, (e) and after 1 min in contact with 0.3 M NaCl solution, (f) and after 1 min in contact with 0.375 M NaCl solution, (g) and after 8 min in contact with 0.48 M NaCl.

### 3.4 Holes formation in polyelectrolyte films and related mechanisms

We found that as a general rule, the ionic strength changes lead to important multilayered film (re)structurations which can be or not accompanied by film shrinking

materialized by the release of free polyelectrolytes. First of all, when a film is rapidly brought above 0.375 M NaCl (for example 0.48 M), large round shaped holes are formed. These cavities originate most probably from the free polyelectrolytes appearing in the film. Indeed, the dissociation of certain complexes occurred when the ionic strength is increased. Taking into account that the Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> content in the film is identical outside and inside the film, the presence of the free polyelectrolytes inside the film leads to an excess of osmotic pressure in the buildup with formation of holes (Mjahed *et al.*, 2009). However, when the film is in contact with a NaCl solution at 0.48 M for a long period, it dissolves totally (scheme 1, column A).



**Scheme 1.** Schematic representation of holes within a PLL/HA film underwent several osmotic shocks.

A strong osmotic shock can also be applied *via* an important ionic strength decrease. This instantaneously induces an important releasing of ions from the film. This release is followed by an important destructurement of the complexes with free polyelectrolytes present

in the film which diffuse progressively out of it. The free polyelectrolytes in the film induce an extra osmotic pressure creating again large spherical shaped holes. Free polyelectrolytes diffuse out leading to a progressive healing of the film. Its final thickness is smaller than the initial one (scheme 1, column B).

After a short shock at  $[\text{NaCl}] > 0.15 \text{ M}$  and brought back to its initial value (0.15 M), film restructuration is again observed. It is only due to ionic releases. In this case ions are liberated in solution. This ions release does not seem to lead to complexes separation with the formation of free polyelectrolytes able to diffuse outside the structure (no fluorescence labelled molecules appear in the bulk). Constraints occur inside the complexes and lead to interaction *via* more fixed intrinsic charges born by the polyelectrolytes. A film compaction accompanies formation of irregular holes or cracks. With time the film heals, recovers its original thickness when brought back to the initial ionic strength value (scheme 1, column C).

#### **4. Conclusion**

To summarize the buildup of PLL/HA film is, in accordance with previous observations, influenced by the ionic strength. At very low and very high ionic strength, the film doesn't make construct anymore. At low ionic strength, the erosion of the film occurred during the buildup. At high ionic strength, the charges screening avoids the association between polyelectrolytes preventing the PEM buildup. On the other hand, we investigated the behaviour of exponentially growing  $(\text{PLL/HA})_n$  films under several osmotic shocks. We found that when the ionic strength of the solution in contact decreases, the PEM film deswells with a release of polyelectrolytes. During the deswelling, the stepwise plays an important role in holes appearance inside the film. An important jump in ionic strength, contrary to small one, leads to holes formation which disappears with time leading to homogenous film. These holes are probably due to the release of small ions and the increase of repulsive interactions inside the film creating free polyelectrolytes inside the holes. The increase of ionic strength and the return to the initial one lead to holes appearance without material loss leading to the recovery of the initial thickness of the film at 0.15 M NaCl.

## **5. Reference List**

- Benkirane-Jessel, N., Lavallo, P., Hübsch, E., Holl, Y., Senger, B., Haikel, Y., Voegel, J.-C., Ogier, J., and Schaaf, P. (2005). "*Short-time timing of the biological activity of functionalized polyelectrolyte multilayers.*" *Advanced Functional Materials*, 15, 648-654.
- Benkirane-Jessel, N., Lavallo, P., Meyer, F., Audouin, F., Frisch, B., Schaaf, P., Ogier, J., Decher, G., and Voegel, J.-C. (2004). "*Control of monocyte morphology on and response to model surfaces for implants equipped with anti-inflammatory agents.*" *Advanced Materials*, 16, 1507-1511.
- Burke, S. E., and Barrett, C. J. (2003). "*pH-responsive properties of multilayered poly(L-lysine)/hyaluronic acid surfaces.*" *Biomacromolecules*, 4, 1773-1783.
- Chiarelli, P. A., Johal, M. S., Casson, J. L., Roberts, J. B., Robinson, J. M., and Wang, H. L. (2001). "*Controlled fabrication of polyelectrolyte multilayer thin films using spin-assembly.*" *Advanced Materials*, 13, 1167 - 1171.
- Dahne, L., Leporatti, S., Donath, E., and Möhwald, H. (2001). "*Fabrication of micro reaction cages with tailored properties.*" *Journal of American Chemical Society*, 123, 5431-5436.
- Decher, G. (1997). "*Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites.*" *Science*, 277, 1232-1237.
- DeLongchamp, D. M., and Hammond, P. T. (2003). "*Fast ion conduction in layer-by-layer polymer films.*" *Chemistry of Materials*, 15, 1165-1173.
- Dubas, S. T., and Schlenoff, J. B. (2001). "*Polyelectrolyte Multilayers Containing a Weak Polyacid: Construction and Deconstruction.*" *Macromolecules*, 34, 3736-3740.
- Hammond, P. T. (1999). "*Recent explorations in electrostatic multilayer thin film assembly.*" *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 4, 430-442.
- Lavallo, P., Gergely, C., Cuisinier, F. J. G., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Picart, C. (2002). "*Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: An in situ atomic force microscopy study.*" *Macromolecules*, 35, 4458 -4465.
- McAloney, R. A., Sinyor, M., Dudnik, V., and Goh, M. C. (2001). "*Atomic force microscopy studies of salt effects on polyelectrolyte multilayer film morphology.*" *Langmuir*, 17, 6655.
- Mendelsohn, J. D., Yang, S. Y., Hiller, J., Hochbaum, A., and Rubner, M. F. (2003). "*Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films.*" *Biomacromolecules*, 4, 96-106.
- Mertz, D., Hemmerlé, J., Boulmedais, F., Voegel, J.-C., Lavallo, P., and Schaaf, P. (2007). "*Polyelectrolyte multilayer films under mechanical stretch.*" *Soft Matter*, 3, 1413-1420.

- Mjahed, H., Voegel, J. C., Senger, B., Chassepot, A., Rameau, A., Ball, V., Schaaf, P., and Boulmedais, F. (2009). "*Hole formation induced by ionic strength increase in exponentially growing multilayer films.*" *Soft Matter*, 5, 2269-2276.
- Picart, C. (2008). "*Polyelectrolyte multilayer films: From physico-chemical properties to the control of cellular processes.*" *Current Medicinal Chemistry*, 15, 685-697.
- Picart, C., Mutterer, J., Richert, L., Luo, Y., Prestwich, G. D., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Lavallo, P. (2002). "*Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers.*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 12531-12535.
- Porcel, C., Izquierdo, A., Ball, V., Decher, G., Voegel, J.-C., and Schaaf, P. (2005). "*Ultrathin coatings and (poly(glutamic acid)/polyallylamine) films deposited by continuous and simultaneous spraying.*" *Langmuir*, 21, 800-802.
- Porcel, C., Lavallo, P., Ball, V., Decher, G., Senger, B., Voegel, J.-C., and Schaaf, P. (2006). "*From exponential to linear growth in polyelectrolyte multilayers.*" *Langmuir*, 22, 4376-4383.
- Schlenoff, J., Ly, H., and Li, M. (1998). "*Charge and mass balance in polyelectrolyte multilayers.*" *Journal of the American Chemical Society*, 120, 7626-7634.
- Schlenoff, J. B., Dubas, S. T., and Farhat, T. (2000). "*Sprayed polyelectrolyte multilayers.*" *Langmuir*, 16, 9968-9969.
- Sui, Z. J., Salloum, D., and Schlenoff, J. B. (2003). "*Effect of molecular weight on the construction of polyelectrolyte multilayers: Stripping versus sticking.*" *Langmuir*, 19, 2491-2495.
- Tang, Z. Y., Wang, Y., Podsiadlo, P., and Kotov, N. A. (2006). "*Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering.*" *Advanced Materials*, 18, 3203-3224.
- Vodouhê, C., Le Guen, E., Garza, J. M., Francius, G., Dejugnat, C., Ogier, J., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Lavallo, P. (2006). "*Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films.*" *Biomaterials*, 27, 4149-4156.
- Wu, Z. Z., Walish, J., Nolte, A., Zhai, L., Cohen, R. E., and Rubner, M. F. (2006). "*Deformable antireflection coatings from polymer and nanoparticle multilayers.*" *Advanced Materials*, 18, 2699-2702.
- Yang, S. Y., Mendelsohn, J. D., and Rubner, M. F. (2003). "*New class of ultrathin, highly cell-adhesion-resistant polyelectrolyte multilayers with micropatterning capabilities.*" *Biomacromolecules*, 4, 987-994.
- Zhang, J., Senger, B., Vautier, D., Picart, C., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Lavallo, P. (2005). "*Natural polyelectrolyte films based on layer-by layer deposition of collagen and hyaluronic acid.*" *Biomaterials*, 26, 3353-3361.

---

Chapitre V :  
Construction d'un biomatériau micro-stratifié par  
pulvérisation alternée de films multicouches et de gels  
d'alginate

---

**V.1 Résumé.....188**

**V.2 Article 4.....189**

Hajare Mjahed, Claudine Porcel, Bernard Senger, Armelle Chassepot, Patrick Netter, Pierre Gillet, Gero Decher, Jean-Claude Voegel, Pierre Schaaf, Nadia Benkirane-Jessel and Fouzia Boulmedaise, "*Micro-stratified architectures based on successive stacking of alginate gel layers and poly(L-lysine)–hyaluronic acid multilayer films aimed at tissue engineering*", **Soft Matter**, 4, 1422.

**V.3 Article 4 (Supporting information).....197**

**V.4 Résultats complémentaires .....200**

---

## V.1 Résumé

Afin de construire un biomatériau tridimensionnel et micro-stratifié, des dépôts alternés de films multicouches poly (L-lysine) PLL/ acide hyaluronique (HA) et de gels d'alginate (AGLs) ont été réalisés. L'alginate de sodium a la propriété de former un gel au contact des ions bivalents et est largement utilisé dans le domaine biomédical. La solution d'alginate de sodium est tout d'abord nébulisée sur une lamelle de verre, préalablement traitée par une couche de PLL, inclinée de manière à permettre l'élimination par simple drainage de l'excès des polyélectrolytes. L'alginate chargé négativement, s'adsorbe sur la monocouche de la PLL, chargée positivement. L'ALG est ensuite obtenu par réticulation soit par nébulisation de la solution de chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ), soit par immersion du substrat (lamelle de verre et solution d'alginate adsorbée) dans une solution de  $\text{CaCl}_2$ . La microscopie électronique a montré que la nébulisation du  $\text{CaCl}_2$  induit une structure microporeuse alors que le trempage induit un gel plus homogène. L'épaisseur du dépôt d'ALG peut être contrôlée par le temps de nébulisation de la solution d'alginate. Les épaisseurs ont été mesurées par microscopie confocale en utilisant la PLL<sup>FITC</sup> à la fois adsorbée à la surface de la lamelle et au dessus de l'ALG. Dans le but de superposer les films multicouches PLL/HA et les AGLs, nous avons étudié l'influence du film précurseur PLL/HA sur la formation de l'ALG. Lorsque la solution d'alginate est nébulisée sur un film PLL/HA construit en présence d'une solution de  $\text{CaCl}_2$ , ce film précurseur joue le rôle d'un réservoir en ions  $\text{Ca}^{2+}$  et en chaînes de PLL, qui tous les deux diffusent en dehors du film pour complexer l'alginate conduisant à la formation d'un pré-gel d'alginate. Quand cette construction est trempée dans une solution de  $\text{CaCl}_2$ , un gel additionnel ne contenant pas de PLL se forme. Nous avons également montré qu'il est possible de construire un film multicouche PLL/HA à la surface de l'ALG en présence uniquement de  $\text{CaCl}_2$  et non de NaCl. Ainsi, un deuxième dépôt d'ALG a pu être formé afin d'obtenir un biomatériau micro-stratifié et fonctionnalisé. Pour une application dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, les AGLs constituent un biomatériau tridimensionnel dans lesquels les cellules nécessaires à l'ingénierie tissulaire seront introduites et les films multicouches PLL/HA pourront servir de réservoirs de principes actifs capables d'interagir avec ces cellules. Ce nouveau biomatériau est tout à fait original car il permet de mimer la distribution spatiale des différentes couches cellulaires composant un tissu biologique.

*Signalement bibliographique ajouté par le :*

**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**  
**Service Commun de Documentation**

**Micro-stratified architectures based on successive stacking of alginate gel layers and poly(L-lysine)–hyaluronic acid multilayer films aimed at tissue engineering**

Hajare MJAHER, Claudine PORCEL, Bernard SENGER, Armelle CHASSEPOT, Patrick NETTER, Pierre GILLET, Gero DECHER, Jean-Claude VOEGEL, Pierre SCHAAF, Nadia BENKIRANE-JESSEL and Fouzia BOULMEDAIS

**Soft Matter, 2008, vol. 4, pages 1422 – 1429**

© Royal Society of Chemistry 2009

**Pages 189-199 :**

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/10.1039/b801428k>

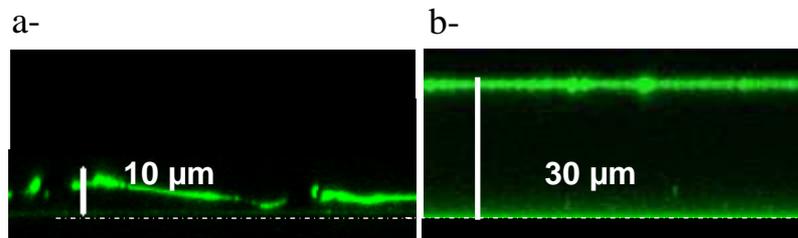
La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

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

## V.4 Résultats complémentaires

### V.4.1 Choix de l'angle du positionnement du substrat pour la nébulisation

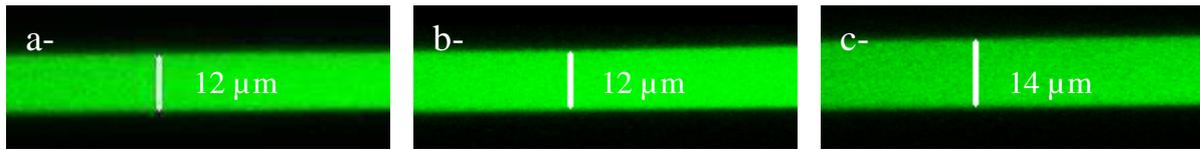
La construction du biomatérialu micro-stratifié, par alternance de films multicouches et de gels d'alginate, a été réalisée par la nébulisation de ces deux constituants. Ainsi, nous avons comparé deux angles d'orientation du substrat (lamelle de verre),  $45^\circ$  et  $90^\circ$  par rapport à l'horizontal. L'angle  $90^\circ$  ne permet pas d'obtenir des gels avec des surfaces planes. De plus, les épaisseurs des gels atteintes sont beaucoup plus faibles que celles obtenues avec une orientation à  $45^\circ$  (Fig. 5.1). Cela est probablement dû à la force de gravité et à la viscosité de la solution d'alginate. Nous avons dès lors placé le substrat à un angle de  $45^\circ$ .



**Figure 5.1 :** Section verticale observée par CLSM de l'architecture :  $(\text{PLL}/\text{HA})_5$ -  $\text{PLL}^{\text{FITC}}$ -gel d'alginate-  $\text{PLL}^{\text{FITC}}$ , construite par nébulisation avec une orientation de (a)  $90^\circ$  du substrat et de (b)  $45^\circ$  par rapport au support vertical. Le temps de pulvérisation de la solution d'alginate est de 10 secondes. Le trait en pointillé blanc correspond à la position de la lamelle de verre servant de substrat de départ. La taille de l'image est (a)  $230 \times 50 \mu\text{m}^2$  et (b)  $230 \times 74 \mu\text{m}^2$ .

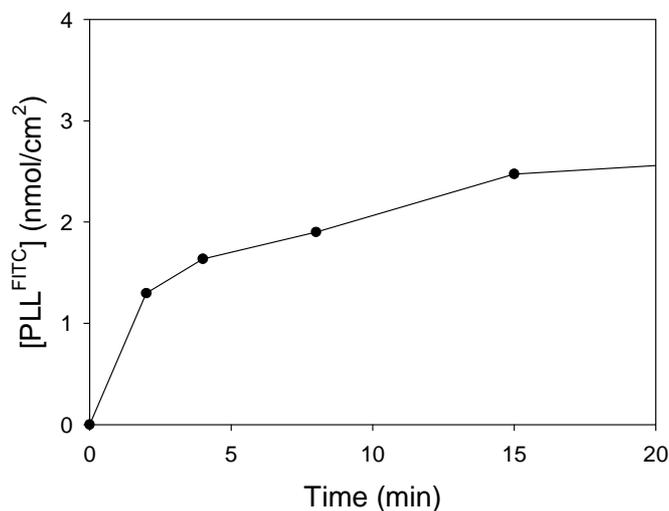
### V.4.2 Effet du milieu de culture sur les films multicouches PLL/HA

Nous avons évalué l'effet du milieu de culture cellulaire sur le film multicouche  $(\text{PLL}/\text{HA})_{50}$  construit dans  $\text{NaCl}$  0.15 M. Le milieu de culture utilisé se compose de 90% de DMEM (Dulbecco's minimal essential medium, constitué d'acides aminés, de vitamines, de minéraux/oligoéléments et de glucoses) enrichi avec 10% du sérum de vœu foetal SVF, dont l'albumine est le constituant majeur. Nous avons observé que l'épaisseur du film multicouche PLL/HA ne variait pas au contact du DMEM seul. Cependant, l'ajout du DMEM supplémenté du SVF induit un gonflement du film multicouche (Fig. 5.2). Plus la teneur en SVF est importante dans le milieu de culture plus le gonflement du film est important.



**Figure 5.2 :** Section verticale observée par CLSM de l'architecture :  $(\text{PLL}/\text{HA})_{50}\text{-PLL}^{\text{FITC}}$ , construite par dans une solution de NaCl à 0.15 M puis observée après un contact (a) d'une solution de NaCl à 0.15 M, (b) du milieu DMEM et (c) du milieu DMEM supplémenté du SVF à 10%. Le trait en pointillé blanc correspond à la position de la lamelle de verre servant de substrat de départ. La taille des images est de  $230 \times 55 \mu\text{m}^2$ .

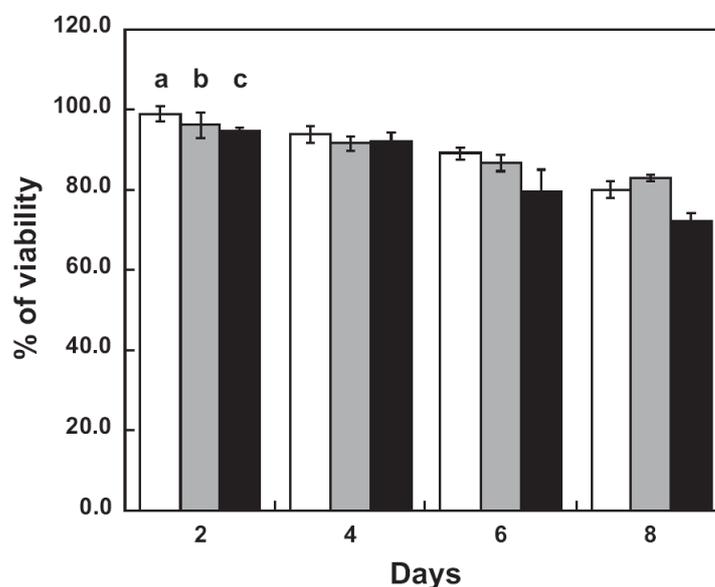
Lorsque le film PLL/HA est mis au contact du DMEM seul, nous ne détectons pas de fluorescence dans le surnageant ( $\text{PLL}^{\text{FITC}}$ ). Tandis que, l'ajout du DMEM supplémenté du SVF induit non seulement un gonflement du film mais également une libération de la  $\text{PLL}^{\text{FITC}}$  dans le surnageant (Fig. 5.3). Ce résultat est à comparer à celui obtenu lorsque nous augmentons la force ionique du surnageant du film multicouches (Mjahed *et al.*, 2009). Les protéines contenues dans le milieu de culture pourraient diffuser dans le film et y induire une augmentation de la pression osmotique. Ainsi, l'augmentation de la force ionique au sein du film entraînerait une solubilisation de certains complexes et une dissociation de ceux-ci puis leur diffusion vers le surnageant.



**Figure 5.3 :** Libération de la  $\text{PLL}^{\text{FITC}}$  en fonction du temps dans le surnageant du film  $(\text{PLL-HA})_{50}\text{-PLL}^{\text{FITC}}$  construit dans NaCl 0.15 M puis mis au contact du milieu de culture DMEM supplémenté à 10% du SVF.

### V.4.3 Viabilité et activité des cellules nébulisées dans le mélange cellules/gel d'alginate

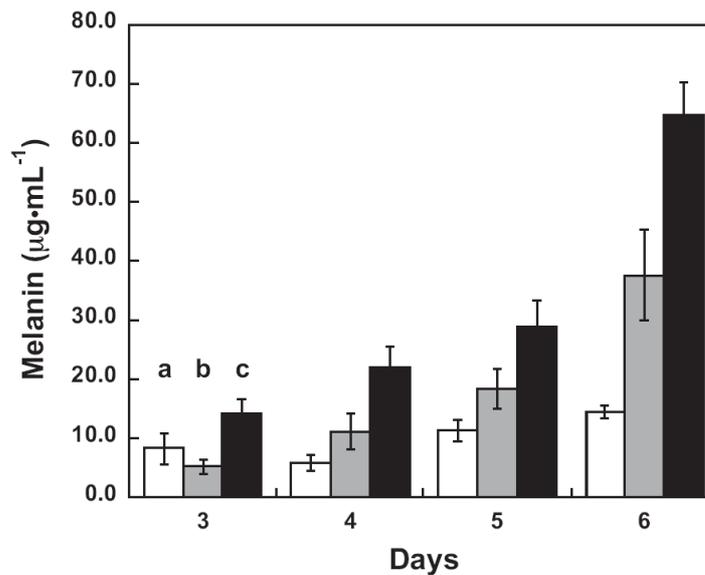
Dans le but de valider les potentialités « biologiques » du biomatériau micro-stratifié que nous avons mis au point, Grossin *et al.*, dans le cadre d'une collaboration inter-laboratoire (UPR 22 CNRS, l'UMR 977 INSERM à Strasbourg et l'UMR 7561 CNRS à Nancy) soutenue par une ANR « cartilspray », ont évalué la viabilité et l'activité de cellules nébulisées dans le gel d'alginate formé. Ainsi, ils ont montré que la viabilité des fibroblastes nébulisés, contenus dans le mélange cellules/gel d'alginate, est comparable à celle des cellules témoins déposées sur du verre (Fig. 5.4). Concernant la conservation du phénotype des cellules nébulisées, les mélanocytes ont été choisis comme modèle d'étude. Lorsque ces cellules sont stimulées par l' $\alpha$ MSH (alpha-melanocytes stimulating hormone), elles produisent la mélanine. Il a été montré que les mélanocytes nébulisés sont capables de répondre à la présence de cette hormone en solution en produisant de la mélanine. Les cellules nébulisées conservent leur phénotype (Grossin *et al.*, 2009). D'autre part, l' $\alpha$ MSH a été covalamment couplée au poly (acide glutamique) (PGA) pour être incorporée dans les films multicouches (Chluba *et al.*, 2001), ce couplage n'altère aucunement la fonction de cette hormone.



**Figure 5.4 :** Viabilité des fibroblastes en fonction du temps. Comparaison entre a) cellules en culture sur une lamelle de verre, contrôle, b) cellules en culture sur la surface d'un gel d'alginate et c) cellules en culture dans le gel d'alginate. (Grossin *et al.*, 2009).

#### V.4.4 Les films multicouches de polyélectrolytes comme réservoir de principe actif

Grossin *et al.* ont montré que les films multicouches à croissance exponentielle peuvent jouer le rôle d'un réservoir biologiquement actif et interagir avec les cellules contenues dans le gel d'alginate. En effet,  $\text{PGA}^{\alpha\text{-MSH}}$  a été incorporé à différents niveaux dans le film multicouche PLL/PGA, construit comme film précurseur. Les mélanocytes ont été nébulisés à la surface du film en présence d'alginate puis la réticulation a été réalisée à l'aide d'une solution de  $\text{CaCl}_2$ . Il a été montré que les cellules présentes dans le gel produisent la mélanine. Cette production augmente en fonction du temps et avec le degré d'incorporation de  $\text{PGA}^{\alpha\text{-MSH}}$ . Il s'agit d'un phénomène de dose-réponse (Fig. 5.5). Ce résultat montre la possibilité de moduler la réponse des cellules contenues dans le gel en variant tout simplement la quantité du principe actif incorporée dans les films multicouches (Grossin *et al.*, 2009).



**Figure 5.5 :** Production de la mélanine par les mélanocytes contenus dans le gel d'alginate nébulisé puis gélifié par nébulisation d'une solution de calcium à la surface du film multicouche (a)  $(\text{PLL}/\text{PGA})_5-(\text{PLL}/\text{PGA}^{\alpha\text{-MSH}})_1$ , (b)  $(\text{PLL}/\text{PGA})_5-(\text{PLL}/\text{PGA}^{\alpha\text{-MSH}})_5$  et (c)  $(\text{PLL}/\text{PGA})_5-(\text{PLL}/\text{PGA}^{\alpha\text{-MSH}})_{10}$ . (Grossin *et al.*, 2009)

#### V.4.5 Références bibliographiques

- Chluba, J., Voegel, J.-C., Decher, G., Erbacher, P., Schaaf, P., and Ogier, J. (2001). "*Peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity.*" *Biomacromolecules*, 2, 800-805.
- Grossin, L., Cortial, D., Saulnier, B., Felix, O., Chassepot, A., Decher, G., Netter, P., Schaaf, P., Gillet, P., Mainard, D., Voegel, J. C., and Benkirane-Jessel, N. (2009). "*Step-by-Step Build-Up of Biologically Active Cell-Containing Stratified Films Aimed at Tissue Engineering.*" *Advanced Materials*, 21, 650 - 655.
- Mjahed, H., Voegel, J. C., Senger, B., Chassepot, A., Rameau, A., Ball, V., Schaaf, P., and Boulmedais, F. (2009). "*Hole formation induced by ionic strength increase in exponentially growing multilayer films.*" *Soft Matter*, 5, 2269-2276.
- Zhang, J., Senger, B., Vautier, D., Picart, C., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Lavalley, P. (2005). "*Natural polyelectrolyte films based on layer-by layer deposition of collagen and hyaluronic acid.*" *Biomaterials*, 26, 3353-3361.

## Conclusions et Perspectives

---

Le concept des films multicouches, basé sur l'adsorption alternée de polyanions et de polycations, ouvrent une nouvelle voie de fonctionnalisation des biomatériaux. Une première partie du travail présenté est consacrée à la comparaison entre la complexation des chaînes de polyélectrolytes de charges opposées en solution et celle dans les films multicouches adsorbés sur un substrat. Un deuxième volet concerne l'étude du comportement des films multicouches soumis à différents chocs osmotiques. Le dernier volet a consisté à mettre au point un biomatériau tridimensionnel et micro-stratifié à base de films multicouches et de gels d'alginate.

Dans la première partie de l'étude (**Chapitre III**), nous avons étudié la formation des complexes de polyélectrolytes en solution, par mesure de la turbidité, ainsi que dans les films multicouches, par QCM-D. Le but initial était de corréler le diagramme de turbidité avec la formation des films multicouches en fonction de la force ionique. Ainsi, par l'étude de six systèmes de polycation/polyanion : PLL/HA, PLL/PSS, PLL/PGA, PAH/PGA, PAH/PSS, PDADMAC/PSS, nous avons pu confirmer la tendance selon laquelle, la formation des complexes en solution et dans les films multicouches sont régis par les mêmes lois. Le maximum de turbidité est obtenu pour une valeur de  $r$  proche de 1. Lorsque les valeurs de turbidité sont tracées en fonction de la force ionique, nous obtenons une courbe en cloche. Une courbe de même allure est obtenue pour l'épaisseur des films en fonction de la force ionique. La valeur maximale du diagramme de turbidité correspond à l'épaisseur maximale du film multicouche. A cette valeur, le film multicouche est caractérisé par une croissance exponentielle. A une force ionique plus importante, les complexes ne se forment plus en solution et n'induisent pas la formation des films multicouches. L'effet de l'écrantage des interactions polycation/polyanion est alors très important et dominant. A faible taux de sel, la complexation des polyélectrolytes se produit en solution et la formation de films multicouches est caractérisée par une croissance plutôt linéaire, où la compensation des charges est essentiellement intrinsèque. L'étude de la turbidité des complexes de polyélectrolytes en solution pourrait constituer un moyen permettant la prédiction de la formation ou non des films multicouches de polyélectrolytes.

Dans la deuxième partie de l'étude (**Chapitre IV**), nous nous sommes intéressés à l'influence du changement de force ionique du surnageant sur le film multicouche PLL/HA.

Nous avons observé que l'augmentation progressive de la force ionique du surnageant induit un gonflement du film et une libération des polyélectrolytes. A une force ionique critique, des cavités apparaissent au sein du film. La présence de polyélectrolytes libres dans ces cavités, visualisés par microscopie confocale, augmentent la pression osmotique. Il s'agit d'une phase transitoire, puisqu'au fur et à mesure que les polyélectrolytes diffusent vers le milieu, la pression osmotique chute, les cavités diminuent en taille et finissent par disparaître. A la fin de ce processus, une dissolution complète du film est observée. La construction d'un film barrière, à base de PDADMAC/PSS au dessus du film PLL/HA, bloquent la sortie des polyélectrolytes, l'apparition des cavités est alors précocement observée. Nous avons également évalué l'influence d'une diminution de la force ionique. Nous avons montré que le film multicouche se dégonfle avec une libération des polyélectrolytes dans le surnageant. Lors du dégonflement, les cavités apparaissent à l'intérieur du film. La taille des cavités dépend du choc osmotique subit. Néanmoins, les cavités finissent par disparaître quelle que soit leur taille. La libération des polyélectrolytes suite à différents chocs osmotiques d'arrêtent une fois le film multicouche est remis à la force ionique initiale (de construction).

La troisième partie de l'étude (**Chapitre V**) a été consacrée à la mise au point d'un biomatériau tridimensionnel et micro-stratifié, basé sur la pulvérisation alternée de films multicouches PLL/HA et de gels d'alginate (ALGs). L'ALG a été obtenu par pulvérisation d'une solution d'alginate suivie soit par une phase de gélification au contact d'une solution de  $\text{CaCl}_2$ . Une structure microporeuse est alors obtenue lorsque la solution de  $\text{CaCl}_2$  est pulvérisée. Par contre, la gélification par trempage dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  conduit à un ALG plus homogène. L'épaisseur de l'ALG peut être contrôlée en fonction du temps de nébulisation de la solution d'alginate. Nous avons également montré qu'il est possible de former un ALG au dessus d'un film multicouche de PLL/HA. Ce film précurseur joue le rôle d'un réservoir en ions  $\text{Ca}^{2+}$  et en chaînes de PLL, qui tous les deux diffusent en dehors du film pour complexer avec la solution d'alginate. Nous avons également constaté que la construction d'un film multicouche PLL/HA à la surface de l'ALG n'est possible qu'en présence de  $\text{CaCl}_2$  et non de  $\text{NaCl}$ . L'architecture plus complète est atteinte par pulvérisation d'un deuxième ALG. Dans le but d'une application biologique de ce biomatériau notamment dans l'ingénierie tissulaire, les ALGs constitueront un biomatériau tridimensionnel dans lesquels les cellules nécessaires à l'ingénierie tissulaire pourront être introduites et les films multicouches PLL/HA pourront servir de réservoirs de principes actifs capables d'interagir avec ces cellules.

Le chapitre III a permis de déterminer la force ionique pour laquelle nous obtenons l'épaisseur la plus favorable. En effet, les films multicouches, en particulier PLL/HA, constituent un réservoir potentiel de principes actifs. La quantité de matière pouvant être incluse peut dépendre de l'épaisseur. La libération de ces principes peut être contrôlée par un stimulus externe, notamment, la force ionique. Le quatrième chapitre nous a permis d'étudier l'influence de la force ionique et de préciser le comportement des films en fonction du temps. Le facteur temps est très important dans la cinétique de libération des principes actifs. Les chocs osmotiques via la force ionique constituent une simulation du milieu physiologique. Enfin, ces deux parties nous permettront de mieux comprendre et adapter le fonctionnement du biomatériau micro-stratifié lors de son application en biologie.

Les perspectives de ce travail pourront principalement concerner les applications biomédicales. Des études sont actuellement en cours, à l'IFR 111 à l'UHP (Nancy), dans le domaine de la régénération tissulaire notamment le cartilage et la région ostéochondrale. La partie inférieure du biomatériau contiendrait les cellules caractéristiques de la zone ostéochondrales, au contact de l'os et d'autre part, la partie supérieure contiendrait des chondrocytes. Les films multicouches joueraient le rôle de réservoir de facteurs de croissance cellulaire. Après une période de culture, le biomatériau sous forme de greffon pourrait alors être transplanté chez le patient au niveau de la lésion.

Nous avons également montré qu'il était possible, suite à l'augmentation de la force ionique, d'induire une porosité au sein du film multicouche. Il est connu que dans le domaine des biomatériaux, la porosité du « *scaffold* » est primordiale. Il serait intéressant de contrôler la taille des cavités et surtout de les stabiliser.

L'étude des complexes pourrait être plus approfondie. Plusieurs paramètres pourraient être intéressants à explorer, notamment l'effet de la masse molaire des polyions et du sel du fond sur la formation des complexes en solution. Une étude de granulométrie pourrait apporter des informations sur l'évolution, en fonction du temps, de la taille des complexes en solution, en tenant compte de la force ionique et du rapport polycation/polyanion. L'étude des complexes en solution est très particulièrement importante dans le domaine de l'encapsulation dans le but de concevoir des systèmes de délivrance de principes actifs.

Les multicouches de polyélectrolytes, systèmes auto-assemblés par adsorptions successives de polycations et de polyanions, ouvrent des perspectives dans le domaine de la fonctionnalisation des biomatériaux. L'objectif du présent travail a concerné le développement d'un biomatériau multi-stratifié à base de films multicouches et de gels d'alginate. Les exigences de biocompatibilité et de biodégradabilité nous ont orienté vers des multicouches à base de polypeptides et de polysaccharides.

Nos travaux s'articulent autour de trois axes principaux :

- (i) Tout d'abord, nous avons comparé le comportement des complexes en solution afin de comprendre comment ils interviennent lors de la construction des films multicouches. Cette étude suggère la possibilité de prédire, par un simple mélange des deux polyélectrolytes de signes opposés, s'ils sont susceptibles ou non de former un film multicouche sous certaines conditions de force ionique.
- (ii) Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'influence du changement de force ionique du surnageant sur le film multicouche PLL/HA préformé. Nous avons montré que l'augmentation ou la diminution de la force ionique induit respectivement un gonflement ou un dégonflement du film, accompagné d'une libération des polyélectrolytes avec l'apparition de cavités dans certains cas. Ces changements de force ionique conduisent à la dissolution du film.
- (iii) Le troisième volet a consisté à déterminer les meilleures conditions permettant d'élaborer, par la méthode de pulvérisation, un biomatériau multi-stratifié en vue d'application dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Ainsi, des films multicouches à base de polypeptides et de polysaccharides ont été superposés avec des gels d'alginate. Les films multicouches joueraient le rôle de réservoir de principes actifs et les gels d'alginate contiendraient des cellules.

**Mots Clés :** Multicouches de polyélectrolytes, Complexes de polyélectrolytes, Force ionique, gel d'alginate, Biomatériau.

---

Alternated adsorption of polycations and polyanions allows to form self-assembled systems called polyelectrolyte multilayers. They offer new perspectives in the domain of functionalization of biomaterials. The objective of this work was to elaborate a multi-stratified biomaterial based on multilayer films and alginate gels. Polypeptides and polysaccharides were chosen because of their biocompatibility and biodegradability properties.

This work was performed in three steps:

- (i) First, we tried to show a correlation between the polycation-polyanion complexation behaviour in solution (PECs) and the possible buildup of polyelectrolyte multilayer films (PEM) for the same polyelectrolyte system. This will provide a very convenient and predictive tool for experimentalists to explore novel polycation/polyanion combinations for the buildup of PEM films.
- (ii) Then, we investigated the influence of the ionic strength on the multilayer film architectures. The ionic strength increase or decrease of the contacting solution induce respectively swelling or deswelling of PEMs. This phenomenon is accompanied by polyelectrolyte releases and the formation of holes in certain cases. These variations of ionic strength induce moreover dissolution of the PEMs.
- (iii) Finally, we elaborated new micro-stratified biomaterials aimed to tissue engineering by the spraying method. We determined the best conditions to obtain such architectures and thus, alternated stacking of PEMs and alginate gels could be performed with PEMs playing the role of active molecules reservoir and alginate gels containing the cells.

**Key words :** Polyelectrolyte multilayers, Polyelectrolytes complexes, Ionic strength, Alginate gel, Biomaterials.