

# THESE

*en vue de l'obtention du*

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Chimie Physique

---

Soutenu par Cédric VOGT

le 16 septembre 2011

## Revêtements polymériques adaptatifs pour la biocatalyse et la libération de molécules

---

### JURY

*Directeur de thèse :* **Philippe LAVALLE**, Chargé de recherches, INSERM

*Rapporteurs :* **Catherine PICART**, Professeur, INP Grenoble

**Vincent ROUCOULES**, Maître de conférences, Université de Haute-Alsace

*Examineurs :* **Sylvie BEGIN-COLIN**, Professeur, Université de Strasbourg

**Pierre SCHAAF**, Professeur, Université de Strasbourg

**Viola VOGEL**, Professeur, ETH Zürich

*Membre invité :* **Bernard SENGER**, Directeur de recherches, INSERM

---



« *L'art c'est moi ; la science c'est nous.* »

*Introduction à l'étude de la médecine expérimentale,*  
Claude Bernard (1813-1878).



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude à Philippe Laval, mon directeur de thèse, notamment pour m'avoir si bien conseillé et pour avoir toujours été là quand j'avais besoin de ses talents et de ses idées. Ensemble, nous avons réussi à avancer dans des chemins scientifiques semés d'embûches. Je lui suis également reconnaissant car il m'a permis de présenter mes travaux au bout du monde à plusieurs reprises ; ces voyages ont été de vraies bouffées d'oxygène !

Ensuite, je veux remercier Jean-Claude Voegel, directeur de l'UMR 977, de m'avoir accueilli et soutenu durant ces années de travail dans son laboratoire. Je n'ai financièrement pour mes expériences jamais été dans le besoin, c'est en grande partie grâce à lui. Je suis également reconnaissant envers les personnels techniques du laboratoire qui m'ont apporté leur aide.

Un grand merci à Bernard Senger. Ses grandes connaissances et son honnêteté scientifique sans faille m'ont très souvent été utiles et déterminants pour progresser. Il a toujours été disponible pour répondre à mes nombreuses questions, par ailleurs d'ordres très divers.

Qu'aurait été cette thèse sans les idées et l'impulsion de Pierre Schaaf ? Elle aurait sans aucun doute été moins audacieuse et moins remplie de défis ! Merci à lui de nous avoir aidés et guidés dans les projets.

Je remercie les membres du jury Catherine Picart, Vincent Roucoules, Viola Vogel et Sylvie Begin, qui me font l'honneur de juger ces trois années de recherches.

Mes remerciements vont également à Joseph Hemmerlé et Karim Benmlih, sans qui les montages expérimentaux n'auraient jamais été d'une aussi grande qualité, et aussi à Vincent Ball et à Damien Mertz, pour leur aide décisive à divers moments.

Je n'oublie évidemment pas Ying Li et Jérémy Ortscheid, stagiaires d'un temps au laboratoire, qui ont réalisé des expériences capitales pour mon compte. On ne le dit jamais assez, les étudiants sont les forces vives de la recherche scientifique !

Mes collègues de l'ICS, Audrey Parat, César Rios Neyra, Loïc Jierry et Fouzia Boulmedais, avec qui j'ai travaillé sur un beau projet commun, ont également toute ma reconnaissance.

Merci aussi aux personnes suivantes pour leur aide dans mes travaux : Jalal Bacharouche (IS2M), Jérôme Mutterer, Mathieu Erhardt, Jean-Etienne Bassard (IBMP), Benoît Frisch, Gaëlle Creusat (faculté de pharmacie), Christiane Bouthier, Christian Ringwald, Bernard Guerold, Marie-Hélène Metz-Boutigue (UMR 977), Josiane Widmaier (ICS) et Jean-Hervé Lignot (IPHC).

Cette période n'aurait sans doute pas été aussi sympathique et enrichissante – humainement parlant –, si je n'avais pas échangé et ri avec Armelle, Gauthier, Géraldine, Mathias, Gwenaëlle, Audrey, Hajare, Fouzia, Jérémie, Bernard, Ying, Zhenhua, César, Nadia, Sabine, Alae, Dominique, Leyla, Christophe, Morgane, Christian, Valérie, Engin, Eric, Cosette, Christiane, Falk, Julien, Jalal, Jérémy, Gaëlle, Philippe, Christine et les autres...

Enfin, je remercie Arnaud et Aurélie pour leur soutien, de même que mes parents, sans qui je n'aurais jamais pu en arriver jusque là. Je n'oublie pas non plus mes grands-parents et ma grand-tante qui, tout comme le reste de ma famille, croient en moi.

# Table des matières

<b>Abréviations .....</b>	<b>1</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>3</b>
<b>Chapitre 1 : Revue bibliographique .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Films multicouches biofonctionnalisés.....</b>	<b>8</b>
1.1.1. <i>Films multicouches de polyélectrolytes .....</i>	<i>8</i>
1.1.2. <i>Bioactivité intrinsèque.....</i>	<i>15</i>
1.1.3. <i>Biodétection .....</i>	<i>18</i>
1.1.4. <i>Libération de molécules d'intérêt biologique .....</i>	<i>21</i>
<b>1.2. Films polymériques &amp; molécules sous contrainte mécanique .....</b>	<b>25</b>
1.2.1. <i>Systèmes polymériques mécanosensibles.....</i>	<i>25</i>
1.2.2. <i>Films multicouches sous contrainte mécanique .....</i>	<i>30</i>
1.2.3. <i>Etirement local de molécules .....</i>	<i>36</i>
<b>Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....</b>	<b>39</b>
<b>2.1. Construction et manipulation des films polymériques .....</b>	<b>40</b>
2.1.1. <i>Solutions tampon.....</i>	<i>40</i>
2.1.2. <i>Supports de construction des films.....</i>	<i>40</i>
2.1.3. <i>Construction de films à base de multicouches de polyélectrolytes.....</i>	<i>43</i>
2.1.4. <i>Construction de gels de polyacrylamide .....</i>	<i>45</i>
2.1.5. <i>Biomolécules .....</i>	<i>46</i>
2.1.6. <i>Modifications chimiques de biomolécules ou de polymères .....</i>	<i>49</i>
2.1.7. <i>Etirement des échantillons construits sur silicones .....</i>	<i>51</i>
<b>2.2. Techniques utilisées durant les expériences.....</b>	<b>52</b>
2.2.1. <i>Microscopie confocale à balayage laser .....</i>	<i>52</i>

2.2.2.	<i>Microscopie à force atomique</i> .....	55
2.2.3.	<i>Microbalance à cristal de quartz</i> .....	58
2.2.4.	<i>Méthodes de dosage</i> .....	61
2.2.5	<i>Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment</i> .....	64

### **Chapitre 3 : Revêtements polymériques biocatalytiques mécanosensibles .....67**

<b>3.0.</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>68</b>
<b>3.1.</b>	<b>Revêtements mécanotransductifs pour l'activation réversible d'une biocatalyse</b> .....	<b>69</b>
3.1.1.	<i>Résumé</i> .....	69
3.1.2.	<i>Article publié : Mechanotransductive surfaces for reversible biocatalysis activation</i> .....	70
<b>3.2.</b>	<b>Plateformes enzymatiques tout-en-un induisant une libération « réactive » par étirement</b> .....	<b>93</b>
3.2.1.	<i>Résumé</i> .....	93
3.2.2.	<i>Résultats : Stretch-induced Reactive Release from a layer-by-layer enzymatic platform</i> .....	95
<b>3.3.</b>	<b>Systèmes polymériques manipulables pour l'étirement d'enzymes à l'échelle moléculaire</b> .....	<b>111</b>
3.3.1	<i>Films multicouches réticulés</i> .....	111
3.3.2	<i>Gels de polyacrylamide</i> .....	122

### **Chapitre 4 : Chargement, diffusion et libération de protéines dans un film multicouche de polyelectrolytes.....139**

<b>4.1.</b>	<b>Résumé</b> .....	<b>140</b>
<b>4.2.</b>	<b>Résultats principaux : Mobility of proteins in highly hydrated polyelectrolyte multilayer films</b> .....	<b>141</b>
4.2.1.	<i>Abstract</i> .....	141
4.2.2.	<i>Introduction</i> .....	142
4.2.3.	<i>Materials and methods</i> .....	144
4.2.4.	<i>Computational background</i> .....	146
4.2.5.	<i>Results and discussion</i> .....	151



4.2.6. <i>Conclusion</i> .....	157
4.2.7. <i>Supporting information</i> .....	158
4.3. <b>Résultats complémentaires</b> .....	161
<b>Conclusions &amp; perspectives</b> .....	167
<b>Annexe 1</b> .....	173
<b>Annexe 2</b> .....	177
<b>Annexe 3</b> .....	179
<b>Références bibliographiques</b> .....	183
<b>Publications</b> .....	199
<b>Communications</b> .....	200



# Abréviations

## Composés chimiques

### Macromolécules

ALP	phosphatase alcaline
$\beta$ -GAL	$\beta$ -galactosidase
HA	hyaluronate
HSA	albumine de sérum humain
PDADMA	poly(diallyldiméthyl ammonium)
PDMS	poly(diméthyl siloxane)
PLL	poly(L-lysine)
PSS	poly(styrène sulfonate)

### Autres molécules

F	fluorescéine
FDG	fluorescéine digalactoside
FDP	fluorescéine diphosphate
FITC	fluorescéine isothiocyanate
FMG	fluorescéine monogalactoside
FMP	fluorescéine monophosphate
Rho	rhodamine

## Méthodes

AFM	microscope à force atomique
CLSM	microscope confocal à balayage laser
FRAP	recouvrement de fluorescence après photoblanchiment
QCM	microbalance à cristal de quartz

# Introduction

L'enjeu aujourd'hui dans le domaine des biomatériaux consiste non seulement à les rendre biocompatibles, mais également à leur conférer des propriétés de bioactivité. Dotés d'une activité biologique, leur intégration dans l'organisme peut être améliorée. Une méthode de revêtement est développée depuis plusieurs années pour fonctionnaliser la surface de biomatériaux au sein du laboratoire de Jean-Claude Voegel (INSERM, Unité 977 "Biomatériaux et Ingénierie Tissulaire") : le dépôt couche-par-couche de films à partir de composés de charges électriques opposées. Ce dépôt peut être réalisé avec des polycations et des polyanions, et aboutir à la formation de films de multicouches de polyélectrolytes auto-assemblés. Souvent fabriqués avec des polymères biocompatibles, ceux-ci sont facilement fonctionnalisables notamment avec des molécules d'intérêt thérapeutique. De cette manière, les surfaces sont dotées d'une bioactivité ayant des répercussions directes au niveau du site d'implantation du biomatériau. Ces surfaces sont également utilisables en tant que plateforme pour agir en tant que réservoir et libérer des médicaments dans l'organisme.

Un nouveau défi vise désormais à contrôler cette bioactivité via des stimuli extérieurs, très présents *in vivo*. En 2007, l'équipe de Philippe Lavalle, en collaboration avec celle de Pierre Schaaf, a été pionnière en ce qui concerne l'effet de contraintes mécaniques sur les films multicouches de polyélectrolytes. Cela a ouvert un vaste champ de possibilités pour créer de nouveaux systèmes répondant aux stimuli mécaniques et pouvant être très utiles pour la biomédecine. En effet, les forces mécaniques sont omniprésentes dans l'organisme et participent à notre métabolisme. Il s'agit, entre autre, de créer de véritables surfaces intelligentes capables de répondre chimiquement à des sollicitations mécaniques. Nous souhaitons pour cela utiliser des enzymes et d'autres protéines, qui permettent d'aborder les phénomènes de biocatalyse et de libération stimulée.

Beaucoup d'études ont été réalisées de par le monde sur l'influence d'étirements mécaniques sur la structure ou l'activité chimique de molécules uniques. Parallèlement, le secteur des matériaux mécanosensibles adaptatifs est en plein essor. Conscients de la puissance que présente le mariage des deux secteurs de la recherche que sont la mécanique des molécules uniques et l'étude des matériaux sensibles aux stimuli mécaniques, nous tentons désormais de les

corrélés pour être capable de contrôler la conformation et les propriétés de molécules – comme les enzymes – à partir de manipulations macroscopiques.

Cette thèse de doctorat s'inscrit à la fois dans la continuité de travaux réalisés sur l'amélioration des propriétés surfaciques des biomatériaux et dans une voie naissante de l'ingénierie de systèmes polymériques. La thèse traite de la conception de nouveaux revêtements intelligents contenant des enzymes ou d'autres protéines, capables de réagir de façon contrôlée à des stimuli mécaniques, mais aussi d'aspects physico-chimiques concernant les films multicouches de polyélectrolytes biofonctionnalisés. Une attention toute particulière est portée à l'étude des phénomènes de diffusion de biomolécules dans les films, qui sont centraux pour la compréhension du chargement de biomolécules dans les films et de leur libération.

Cet ouvrage s'articule autour de quatre chapitres. Le premier définit le contexte scientifique et technologique de la thèse, le deuxième expose les matériels et les méthodes utilisés. Le troisième chapitre aborde les résultats obtenus concernant l'élaboration de systèmes biocatalytiques mécanosensibles, et enfin le dernier chapitre présente les résultats relatifs au chargement, à la diffusion et à la libération de protéines dans un film multicouche de polyélectrolytes.

Dans le chapitre 1, une première partie présente l'état de l'art concernant les films construits couche-par-couche à base de composés de charges opposées, et notamment les multicouches de polyélectrolytes. Cette partie dresse également un bilan des études réalisées jusqu'ici sur ces systèmes utilisés comme revêtements bioactifs : les systèmes multicouches dotés d'une bioactivité intrinsèque, ceux utilisés en tant que biodétecteurs, et ceux servant de support à la libération de molécules. Une seconde partie expose ensuite des travaux où des systèmes polymériques sont soumis à des contraintes mécaniques, notamment pour engendrer des réponses mécanostimulées. Enfin, une dernière section évoque la manipulation de molécules uniques dans le but d'engendrer des modifications de conformation impliquant des changements de propriétés chimiques.

Dans le chapitre 2 consacré aux matériels et aux méthodes, la première partie traite de la construction et de la manipulation des films polymériques étudiés. Plus particulièrement sont évoquées les données relatives aux biomolécules utilisées et aux modifications chimiques réalisées sur les molécules et les surfaces en présence. La seconde partie présente les principales techniques utilisées durant ces trois années pour caractériser les échantillons : le microscope

confocal à balayage laser, le microscope à force atomique, la microbalance à quartz, des méthodes de dosage, et la méthode de recouvrement de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP). Cette liste n'est pas exhaustive : les autres méthodes utilisées plus rarement sont détaillées dans les chapitres de résultats.

Le chapitre 3 constitue le premier chapitre des résultats. Il est articulé en trois parties, traitant de trois études qui ont l'objectif commun d'élaborer des revêtements sensibles à l'étirement et dont la capacité à catalyser certaines réactions chimiques peut être modulée par ce biais. La première partie traite d'un système réservoir / barrière construit couche-par-couche à base de polyélectrolytes et contenant des enzymes, dont la biocatalyse intrinsèque peut être activée par étirement. Une deuxième partie présente un système similaire mais contenant à la fois les enzymes et leurs substrats, de façon à induire une libération des produits de la réaction sous étirement. La dernière partie de ce chapitre décrit les solutions proposées au problème suivant : serait-il possible de moduler une réaction biocatalytique en manipulant localement des enzymes – pour les déformer – *via* une action macroscopique ? En plus d'une solution impliquant des films multicouches de polyélectrolytes, une alternative consiste à élaborer des hydrogels mécanosensibles.

Le chapitre 4 est le second chapitre des résultats. Il décrit les travaux réalisés qui concernent le chargement, la diffusion et la libération de protéines dans un film multicouche de polyélectrolytes. Cette étude physico-chimique s'emploie à quantifier les phénomènes de chargement, de diffusion et de libération dans ces films. Pour cela, de nouvelles procédures expérimentales et une nouvelle méthode d'exploitation des résultats de FRAP ont été développées. Cela permet de corréler la diffusion des protéines dans les films à leur libération dans le surnageant.





# **Chapitre 1 :**

## **Revue bibliographique**

### **1.1. Films multicouches biofonctionnalisés**

- 1.1.1. Films multicouches de polyélectrolytes
- 1.1.2. Bioactivité intrinsèque
- 1.1.3. Biodétection
- 1.1.4. Libération de molécules d'intérêt biologique

### **1.2 Films polymériques & molécules sous contrainte mécanique**

- 1.2.1. Systèmes polymériques sous contrainte mécanique
- 1.2.2. Films multicouches sous contrainte mécanique
- 1.2.3. Etirement local de molécules

# 1.1. Films multicouches biofonctionnalisés

## 1.1.1. Films multicouches de polyélectrolytes

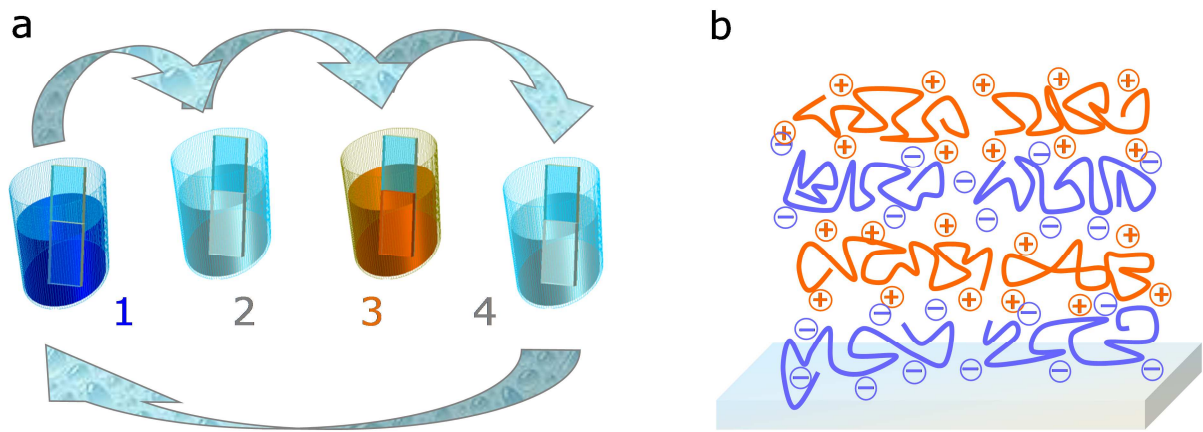
La construction de films de multicouches basée sur l'assemblage électrostatique de particules colloïdales chargées avait été évoquée par Iler en 1966 [Iler 1966]. Cependant, ces travaux étaient tombés dans l'oubli, par manque de techniques de caractérisation et parce que l'on admettait que la construction s'arrêtait dès lors que les charges s'étaient compensées. Ce n'est que dans les années 1990 que la technique de dépôt de films multicouches, basée sur les interactions entre constituants de charges opposées, a commencé à connaître un intérêt ascendant. Les travaux de G. Decher [Decher, Hong et al. 1992] et sa publication dans la revue *Science* [Decher 1997] ont fortement contribué à cela. Aujourd'hui cette méthode est l'objet de très nombreux travaux à travers le monde et on estime que 3 articles sont publiés dans ce domaine chaque jour.

### 1.1.1.1. Principe

La construction de films multicouches de polyélectrolytes fait appel à la méthode couche-par-couche (LbL de l'anglais « Layer-by-Layer ») qui consiste à déposer successivement des polyélectrolytes de charges opposées (figure 1.1). Un substrat chargé, par exemple positivement, est d'abord mis au contact d'une solution de polyanions pendant un certain temps. Ainsi, les polyanions s'adsorbent sur la surface, les molécules non adsorbées étant éliminées par rinçage. Après rinçage, la surface est chargée négativement. L'adsorption de polycations à partir d'une solution est alors possible. Après ce second dépôt suivi d'un rinçage, la charge de la surface est positive. Il est alors possible de poursuivre la construction jusqu'à atteindre l'épaisseur voulue en procédant à de nouveaux dépôts de polyanions et de polycations.

### 1.1.1.2. Forces motrices

Le phénomène de surcompensation de charge après chaque dépôt a été mis en évidence par des mesures du potentiel  $\zeta$  [Sukhorukov, Donath et al. 1998; Caruso, Lichtenfeld et al. 1999] et a longtemps été considéré comme étant la principale force motrice de la construction des multicouches. Pourtant dès 1999, N. A. Kotov a démontré que de fortes interactions



**Figure 1.1 :** (a) Principe de la méthode de construction de films multicouches de polyélectrolytes. Les étapes 1 et 3 correspondent à l'adsorption des polyanions et des polycations respectivement sur un substrat (ici chargé positivement en surface). Les étapes 2 et 4 correspondent à l'étape de rinçage qui suit l'adsorption d'un type de polyélectrolytes. Ces quatre étapes représentent la séquence de base pour le dépôt d'une paire de couches. La répétition de cette séquence permet d'obtenir le nombre de paires de couches souhaité. (b) Schéma simplifié à l'échelle moléculaire d'un film multicouche constitué de deux paires de couches.

électrostatiques entre substances chargées ne garantissaient pas la formation de multicouches, parlant de la nécessité de prendre en compte des interactions hydrophobes, liées au réarrangement spatial des molécules d'eau et des ions lors de la construction [Kotov 1999]. Des interactions non-électrostatiques entrent donc également en jeu. Plus tard, l'équipe de J. B. Schlenoff a montré que le gain d'entropie dû au départ d'ions lors des dépôts de chaînes de polyélectrolytes constitue une force motrice majeure pour les assemblages couche-par-couche de polyélectrolytes [Bucur, Sui et al. 2006]. Des simulations atomistiques ont d'ailleurs récemment montré que l'entropie devait être prise en compte pour expliquer la formation des « paires d'ions » entre polyélectrolytes [Qiao, Cerdà et al. 2010]. Des travaux de Neff et al. ont également confirmé que l'inversion du potentiel électrostatique de surface n'est pas nécessaire lors de la construction [Neff, Naji et al. 2006].

### 1.1.1.3. Paramètres influençant la construction

Différents paramètres ont une influence sur la construction des films multicouches de polyélectrolytes, notamment sur leur épaisseur et leur densité :

- la densité de charge des polymères [Voigt, Jaeger et al. 2003], influencée directement par le pH [Shiratori & Rubner 2000],

- la distribution de charge le long des chaînes [Voigt, Khrenov et al. 2003],
- l'hydrophobicité du squelette des polyélectrolytes [Neff, Wunderlich et al. 2007],
- la concentration en sel du milieu [Ruths, Essler et al. 2000],
- la nature des contre-ions [El Haitami, Martel et al. 2009].

#### **1.1.1.4. Techniques de construction**

La méthode classique de construction de films multicouches de polyélectrolytes consiste en l'immersion successive d'un substrat dans les solutions de polyélectrolytes et dans les solutions de rinçage [Decher 1997].

Une autre méthode, censée être plus rapide et plus facilement utilisable de façon industrielle, a également été développée. Il s'agit de la méthode de nébulisation, qui consiste à pulvériser sur les substrats les solutions évoquées précédemment [Schlenoff, Dubas et al. 2000]. Dans les conditions usuelles, les films obtenus ont une structure très proche de ceux obtenus par immersion. Cette méthode, toujours en développement, présente de nombreux avantages et permet parfois de construire des films difficiles à construire par immersion [Izquierdo, Ono et al. 2005]. Par exemple, l'homogénéité d'un système poly(styrène sulfonate) / poly(allylamine) (PSS/PAH) est meilleure avec cette technique qu'avec la technique par immersion, alors que le temps de dépôt n'est que de 6 secondes, contre au moins 4 minutes pour la méthode classique.

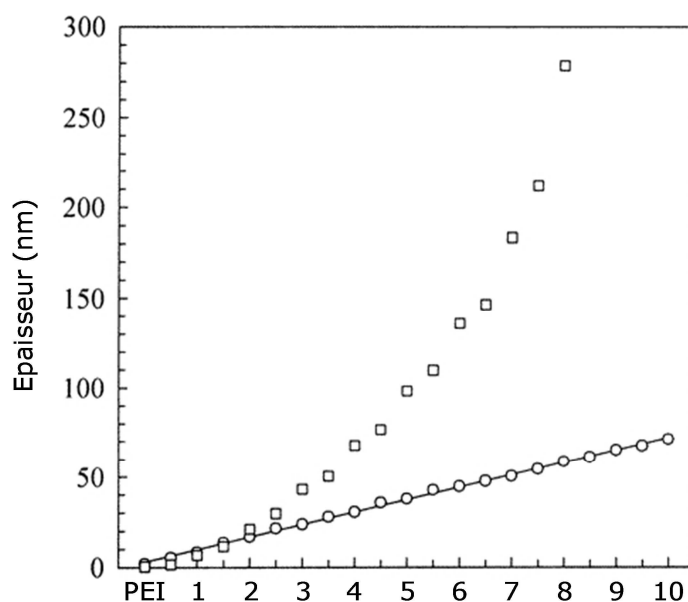
L'enduction centrifuge (plus connue sous le terme anglais « spin coating ») constitue aussi une méthode pour le dépôt couche-par-couche de deux polyélectrolytes de charges opposées [Lee, Hong et al. 2001].

Concernant les substrats utilisables pour déposer des multicouches de polyélectrolytes, les possibilités sont très importantes. Il est notamment possible de construire des films sur le verre [Decher 1997], sur du poly(éthylène téréphthalate) (PET) hydrolysé en surface [Liu, He et al. 2005; Rinckenbach, Hemmerlé et al. 2008] ou encore sur un réseau 3D de microbilles de titane fritté [Vautier, Hemmerlé et al. 2003].

#### **1.1.1.5. Deux modes de croissance**

Il existe deux modes de croissance : la croissance linéaire, où l'épaisseur varie linéairement en fonction du nombre de couches déposées, et la croissance exponentielle, où l'épaisseur ne varie

pas linéairement en fonction du nombre de couches déposées, mais plutôt de façon exponentielle (figure 1.2). Ces deux modes engendrent des films dont les propriétés structurales sont très différentes.



**Figure 1.2 :** Evolution de l'épaisseur d'un film (carrés) PEI/(PGA/PLL)<sub>n</sub> et d'un film (cercles) PEI/(PSS/PAH)<sub>n</sub> en fonction du nombre de paires de couches déposées n, suivie par spectroscopie optique à guide d'onde. Le sigle PEI correspond à poly(éthylène imine), PGA à poly(acide L-glutamique), PLL à poly(L-lysine), PSS à poly(styrène sulfonate) et PAH à poly(allylamine) [Lavalle, Gergely et al. 2002].

### Croissance linéaire

Plusieurs systèmes présentent une croissance de type linéaire : par exemple, poly(allylamine) / poly(styrène sulfonate) (PAH/PSS) et poly(acide acrylique) / poly(allylamine) (PAA/PAH) [Yoo, Shiratori et al. 1998]. Le premier, qui est le plus étudié et qui constitue un modèle, a été caractérisé par réflectométrie des rayons X puis par réflectivité des neutrons, et présente une structure relativement stratifiée, où les interfaces entre strates présentent une certaine rugosité, à cause d'une légère interpénétration des chaînes [Decher 1997; Lösche, Schmitt et al. 1998]. Une récente étude, par spectroscopie vibrationnelle par génération de fréquence somme, a permis de décrire la structure à l'échelle moléculaire [Silva & Miranda 2009]. Ces films présentent un ordre moléculaire durant la construction, puisque les chaînes de la dernière couche déposée ont une orientation bien précise, mais celui-ci ne perdure pas au fur-et-à-mesure que le film se construit, car un réarrangement des chaînes semble avoir lieu à chaque étape.

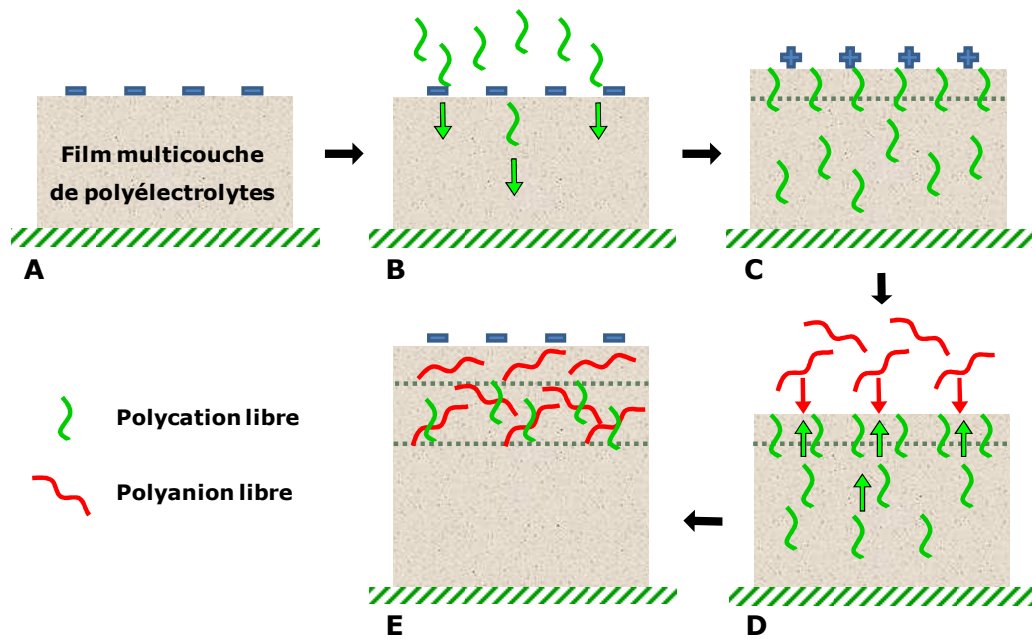
## Croissance exponentielle

Pour les films à croissance exponentielle, les exemples sont également nombreux, que les polyélectrolytes soient d'origine naturelle ou qu'ils soient synthétiques :

- poly(L-lysine) / alginate [Elbert, Herbert et al. 1999],
- poly(L-lysine) / poly(acide acrylique) [Pardo-Yissar, Katz et al. 2001],
- poly(L-lysine) / poly(acide L-glutamique) [Lavalle, Gergely et al. 2002],
- poly(L-lysine) / hyaluronate [Picart, Lavalle et al. 2001],
- poly(allylamine) / copolymère d'acrylamide et de chlorure de [3-(2-méthylpropionamido)propyl]triméthylammonium (MAPTAC) [Schoeler, Poptoshev et al. 2003].

Ces films peuvent atteindre une épaisseur allant jusqu'à plusieurs micromètres, après le dépôt d'une vingtaine de paires de couches. L'augmentation exponentielle de l'épaisseur en fonction du nombre de couches déposées a d'abord été expliquée comme étant la conséquence d'une rugosité de plus en plus importante de la surface – et donc d'une augmentation de la densité de charge de surface [Ruths, Essler et al. 2000]. Mais des expériences de mesure du potentiel  $\zeta$  ont montré que celui-ci bascule entre deux valeurs constantes lors de chaque dépôt [Picart, Lavalle et al. 2001; Lavalle, Gergely et al. 2002], ce qui va à l'encontre de la première hypothèse. Des mesures réalisées par microscopie à force atomique ont permis de montrer qu'il y a même une diminution de la rugosité avec le nombre de couches.

Des épaisseurs importantes peuvent être obtenues avec des films à croissance exponentielle et pour un nombre de couche restreint, ce qui permet l'utilisation du microscope confocal à balayage laser pour leur caractérisation. C'est grâce à cette technique que le phénomène de croissance exponentielle a pu être expliqué [Lavalle, Picart et al. 2004]. En effet, il a été constaté qu'un certain nombre de chaînes d'au moins un des polyélectrolytes en présence migrent sur toute la profondeur du film lors de leur dépôt. Lors du dépôt de chaînes de charges opposées, les premières migrent vers l'extérieur pour rencontrer les secondes et former la matrice de la couche suivante (cas de PLL/HA, figure 1.3). Les chaînes qui diffusent dans le film sont en fait plus nombreuses après chaque dépôt d'une paire de couche, car, à concentration constante, elles disposent de davantage de volume à occuper. Cela explique la croissance exponentielle.



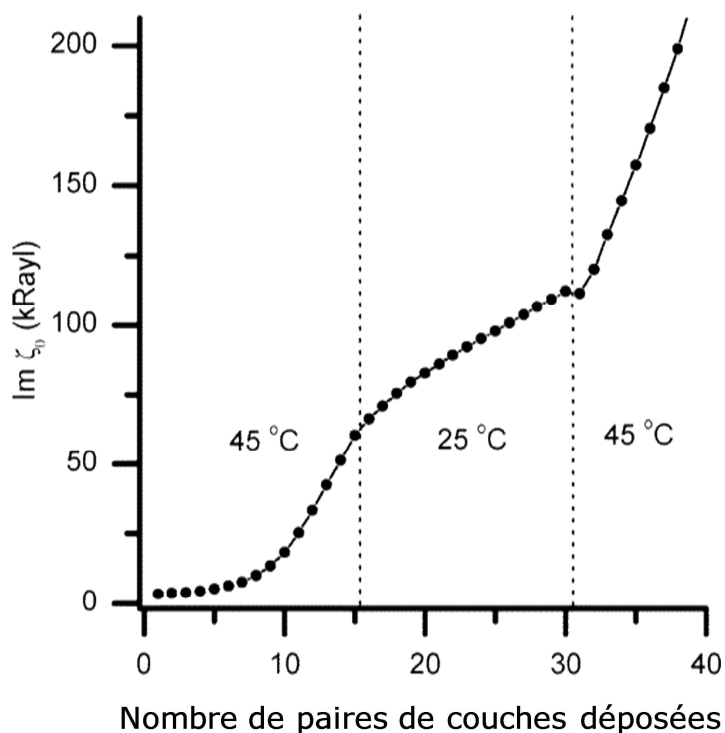
**Figure 1.3 :** Schéma du mécanisme de construction d'un film multicouche de polyélectrolytes PLL/HA, basé sur la diffusion du polycation : (A) le mécanisme est ici décrit à partir d'un film terminant par HA chargé négativement; (B) le film est mis au contact d'une solution de polycations PLL (la plupart des chaînes migrent vers l'intérieur du film et certaines chaînes s'adsorbent à la surface du film, conférant une surcompensation de charge positive au film); (C) après rinçage, des chaînes de PLL libres demeurent dans le film; (D) le film chargé positivement est mis au contact d'une solution de polyanions HA, les chaînes de PLL migrent vers l'extérieur pour complexer les chaînes de HA à l'interface ; (E) fin de l'étape D, induisant une surcompensation de charge négative. Du cycle d'adsorption résulte un film plus épais qu'à l'étape A et chargé négativement en surface [Lavalle, Picart et al. 2004].

Ainsi, il apparaît que ce phénomène est relié à la capacité des chaînes libres à migrer, ce qui implique que la croissance exponentielle pourrait être évitée en réduisant le temps de contact ainsi que les capacités de migration des chaînes [Porcel, Lavalle et al. 2006]. A l'inverse, toute construction peut potentiellement présenter une croissance exponentielle, si le temps de contact et les capacités de migration des chaînes sont très importants [Salomäki, Vinokurov et al. 2005].

### Paramètres influençant le mode de croissance

Une transition d'une croissance linéaire à une croissance exponentielle nécessite d'augmenter la mobilité des chaînes de polyélectrolytes. Ceci peut être fait en augmentant la flexibilité qui permet une meilleure reptation entre les chaînes de la matrice et/ou en diminuant la formation de paires d'ions, ce qui se fait en diminuant le nombre de points de connexion entre

chaînes de charges opposées. Une meilleure reptation peut être obtenue en augmentant la température (figure 1.4) [Salomäki, Vinokurov et al. 2005], tandis que la formation de complexes est amoindrie en augmentant la concentration en sel dans le milieu [McAloney, Sinyor et al. 2001], en diminuant la densité de charge des chaînes [Voigt, Jaeger et al. 2003] ou en utilisant des contre-ions plus cosmotropes [Salomäki, Tervasmäki et al. 2004].



**Figure 1.4 :** Impédance acoustique obtenue par microbalance à cristal de quartz en fonction du nombre de paires de couches PSS/PDADMA déposées (polyélectrolytes dissous dans une solution à 0.1 mol/L de NaBr). Cette grandeur est proportionnelle à la masse déposée [Salomäki, Vinokurov et al. 2005].

### 1.1.1.6. Applications des multicouches de polyélectrolytes

Les multicouches de polyélectrolytes ont fait jusqu'ici l'objet de nombreux travaux à travers le monde, qui ont permis de développer les connaissances mais aussi de développer des systèmes fonctionnels. Cela est dû au fait que leur construction est facile et leur mise en œuvre est simple. Mais c'est aussi parce qu'il est possible de modifier bon nombre de leurs propriétés (épaisseur, rugosité, perméabilité, charge de surface, propriétés mécaniques, etc) en modifiant certains paramètres (nature des polyélectrolytes, force ionique, pH, température, etc). Ainsi, les applications potentielles basées sur ces films sont nombreuses et variées.



Utilisés « bruts », ces films permettent par exemple de réaliser des traitements anti-reflet [Hiller, Mendelsohn et al. 2002] ou anti-corrosion [Farhat & Schlenoff 2002]. Des modifications chimiques de l'un des deux polyélectrolytes utilisés ont permis d'élaborer des surfaces antibactériennes [Boulmedais, Frisch et al. 2004].

Couplés avec une couche de montmorillonite et placés entre deux électrodes, des films de poly(p-phénylènevinylène) et de poly(acide métacrylique) peuvent constituer une diode électroluminescente [Eckle & Decher 2001]. En remplaçant l'un des deux polyélectrolytes par des briques d'argiles, il est possible d'élaborer un film à très haute résistance mécanique [Tang, Kotov et al. 2003]. De même, des surfaces limitant l'adhésion bactérienne et même bactéricides ont été élaborées en utilisant de l'héparine avec du chitosane [Fu, Ji et al. 2005].

Des films ont même déjà trouvé une application commerciale : les revêtements de certaines lentilles de contact de la marque Ciba Vision utilisent les propriétés hautement hydrophiles des films multicouches de polyélectrolytes pour permettre à la surface des lentilles de rester longtemps hydratée [Decher 2002]. De même, un revêtement de préservation de fruits et légumes qui emprisonne l'éthylène, notamment à base de multicouches de polyélectrolytes, a été commercialisé au Japon [Shiratori & Hayashibara 2002].

Outre ces applications, les films multicouches, parfois 100 % biocompatibles, s'avèrent avant tout très efficaces pour ce qui est de stocker des molécules ou des biomolécules, dans l'optique d'obtenir un film :

- doté d'une bioactivité,
- utilisable en tant que biodétecteur,
- ou libérant des composés d'intérêt thérapeutique.

Ces trois aspects vont être développés dans la suite de la partie 1.1.

## **1.1.2. Bioactivité intrinsèque**

### **1.1.2.1. Protéines et multicouches de polyélectrolytes**

L'adsorption de protéines sur des multicouches de polyélectrolytes peut s'avérer utile pour élaborer des systèmes biomédicaux, car ces films agissent parfois comme une éponge pour

ces biomacromolécules. Ce phénomène est relativement complexe, puisqu'il est gouverné par plusieurs types d'interactions, des forces électrostatiques, des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes [Salloum & Schlenoff 2004]. En effet, il est possible de charger des multicouches de polyélectrolytes avec des protéines, sans pour autant que les charges des protéines et du film soient opposées [Ladam, Schaaf et al. 2001]. L'adsorption reste cependant très favorisée lorsqu'il existe une opposition de charge, et la quantité introduite dans les films est alors très importante.

Schwinté et al. ont caractérisé la structure de protéines enfouies par rapport à la structure des mêmes protéines en solution. Alors que la structure secondaire des protéines est modifiée lorsque les protéines et la surface du film ont des charges opposées, celle-ci est quasiment conservée lorsque la charge de surface du film et celle des protéines sont de même signe [Schwinté, Ball et al. 2002].

Szyk et al. ont caractérisé la diffusion de molécules d'albumine adsorbées sur des films PAH/PSS ou enfouies au sein de tels films. Il s'avère que le coefficient de diffusion varie en fonction de la concentration surfacique en protéines et du type de chaînes terminant la construction. Dans tous les cas, les protéines présentent une grande mobilité latérale [Szyk, Schaaf et al. 2001; Szyk, Schwinté et al. 2002].

### **1.1.2.2. Biocatalyse**

La méthode de dépôt couche-par-couche de composés de charges opposées permet d'intégrer des enzymes dans les films. Elles peuvent être soit introduites en tant que composé chargé et participer à la construction d'un film multicouche, soit absorbées dans une multicouche déjà formée à partir d'une solution mise en contact.

Des couches de glucose oxydase (GOD) / poly(éthylèneimine) (PEI) et/ou de peroxydase (POD) / poly(styrène sulfonate) (PSS) ont été déposées sur un film précurseur de PEI/PSS pour former des multicouches enzymatiques actives [Onda, Lvov et al. 1996]. Des films  $(PEI/PSS)_4/(PEI/GOD)_n$  et  $(PEI/PSS)_4/(POD/PSS)_n$  ont ainsi présenté une activité enzymatique et la cinétique des réactions a pu être modulée en jouant sur le nombre de paires de couches  $n$ . De plus, des films contenant les deux enzymes  $(PEI/PSS)_4/(POD/PSS)_2/(PEI/GOD)_2$  ont été construits afin d'obtenir un système catalytique séquentiel.

Construits sur une électrode d'or recouverte de sulfonate de mercaptopropane, des films à base de poly(diallyldiméthyl ammonium) (PDADMA) et de cytochrome P450cam, ou encore de myoglobine et de PSS, permettent d'oxyder des styrènes de façon très efficace [Zu, Lu et al. 1999]. La réduction de O<sub>2</sub> et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est possible *via* l'utilisation de films (chitosane/MWNT/chitosane/MP11)<sub>n</sub> construits par assemblage couche-par-couche de chitosane (un polysaccharide), de nanotubes de carbone multifeuillets (MWNT) et de micropéroxydase 11 (MP11) [Xu, Gao et al. 2005].

Lavalle et al. ont élaboré des membranes autoportées biocatalytiques à base de poly(L-lysine) et de hyaluronate et contenant des enzymes [Lavalle, Boulmedais et al. 2005]. Dans ce cas, l'enzyme a été absorbée dans la multicouche préalablement construite et réticulée.

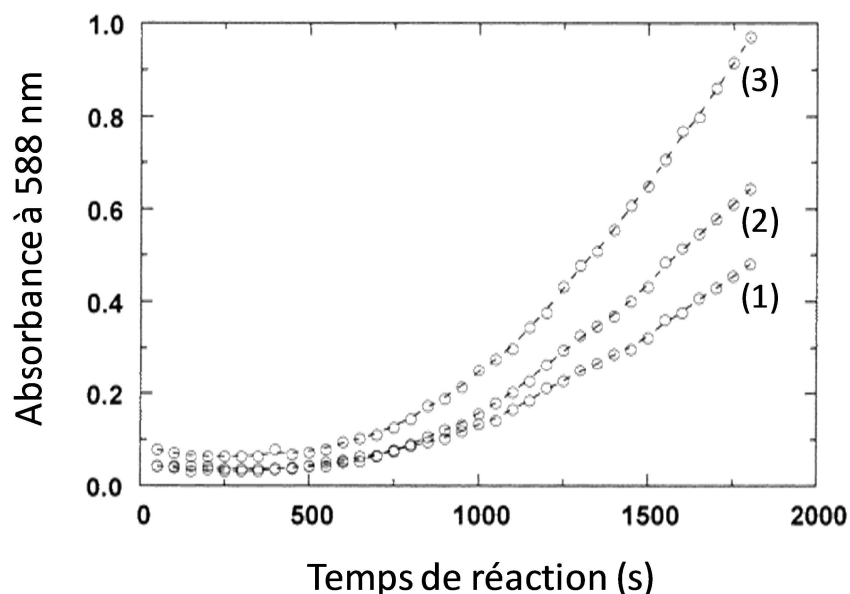
D'autres géométries, non planes, ont également été envisagées pour édifier des multicouches contenant des enzymes. Des biocolloïdes, constitués de billes de latex recouvertes d'un film à base de PDADMA, de PSS et d'uréase ont par exemple été développés [Lvov & Caruso 2001]. Ils possèdent une activité enzymatique, et l'augmentation du nombre de couches contenant l'enzyme implique une augmentation de l'activité catalytique (figure 1.5).

### 1.1.2.3. Photosynthèse

L'insertion de biomolécules lors de la construction de films assemblés couche-par-couche peut également permettre d'élaborer des surfaces photosynthétiques.

Des films multicouches de bactériorhodopsine et de poly(diallyldiméthyl ammonium) (PDADMA) ont ainsi permis de convertir une énergie lumineuse en courant électrique, avec à la clé un photocourant significatif de 80 nA/cm<sup>2</sup>, obtenu pour un système éclairé composé de six paires de couches [He, Samuelson et al. 1998].

Des thylakoïdes ont aussi été associés à des polyélectrolytes pour former des films, dans le but d'obtenir une surface disposant de propriétés photosynthétiques. Le rendement de photosynthèse des thylakoïdes n'a pas été affecté par la présence des polyions [Dementiev, Baikov et al. 2005].



**Figure 1.5 :** Evolution de l'absorbance à 588 nm en fonction du temps d'une solution d'urée et de pourpre de bromocrésol, en contact avec une quantité fixée de sphères de latex recouvertes d'un film à base de PDADMA/PSS et terminé par (1) une, (2) deux ou (3) trois paires de couches uréase/PDADMA. Ce signal peut être assimilé à la production d'ammoniac issue de la réaction enzymatique, puisque cela entraîne une augmentation du pH et donc de l'absorbance à 588 nm du pourpre de bromocrésol [Lvoov & Caruso 2001].

### 1.1.3. Biodétection

#### 1.1.3.1. Biocapteurs basés sur des protéines

##### Biocapteurs à base d'enzymes

Afin de fabriquer des biocapteurs à partir de films de multicouches, deux types d'enzymes ont été relevés dans la littérature : les oxydo-réductases et les non oxydo-réductases.

Pour le premier type, les exemples sont nombreux et se basent sur une détection électrochimique des changements d'états d'oxydation des substrats enzymatiques à l'aide de médiateurs tels que des dérivés osmiés ou des ferrocènes. Ainsi, des biocapteurs spécifiques de molécules de peroxyde d'hydrogène, de fructose ou de méthanol ont été conçus à partir de films contenant des couches de peroxydase, de fructose déshydrogénase ou d'alcool oxydase respectivement et déposés sur des électrodes [Narvaez, Suarez et al. 2000]. Des films (PEI/COX)<sub>n</sub> à

base de poly(éthylèneimine) (PEI) et de cholestérol oxydase (COX) ont également permis de mesurer par ce biais le taux de cholestérol dans le milieu environnant [Ram, Bertoncello et al. 2001]. Dans certains cas, le médiateur a directement été greffé sur un polyélectrolyte afin d'avoir un biocapteur autonome, ne nécessitant pas de médiateur en solution [Calvo, Danilowicz et al. 2002].

Dans le cas de biocapteurs utilisant des enzymes non oxydo-réductases, les méthodes électrochimiques doivent être remplacées par d'autres telles que des mesures de fluorescence du film ou encore de l'absorbance UV du surnageant [Constantine, Mello et al. 2003]. Ainsi, un film multicouche contenant l'aryldialkylphosphatase et un polyélectrolyte fluorescent, le poly(acide thiophène-3-acétique), a été mis au contact d'une solution contenant des molécules de paraoxone. Lorsque l'enzyme réagit avec le paraoxone, elle subit des changements de conformation qui se répercutent sur la configuration spatiale des chaînes du polymère fluorescent. Le polymère se met alors à émettre de façon moins intense. Le dosage consiste donc à mesurer la chute de ce signal de fluorescence, pour évaluer la concentration de paraoxone dans la solution. Une autre méthode de dosage est également possible pour ce système, puisque la réaction catalytique du paraoxone produit du *p*-nitrophénol qui possède un pic d'absorption caractéristique. Ainsi, il suffit de suivre l'absorption de la solution à 400 nm pour déterminer cette concentration.

#### Biocapteurs à base d'anticorps

L'immobilisation d'anticorps dans des films multicouches constitue une voie intéressante pour l'élaboration d'immunocapteurs.

Caruso et al. ont réussi à immobiliser des anti-immunoglobulines (anti-IgG) au sein de multicouches à base de poly(allylamine) (PAH) et de poly(styrène sulfonate) (PSS) pour former des films (PAH/PSS)<sub>2</sub>/(anti-IgG/PSS)<sub>*n*</sub> [Caruso, Niikura et al. 1997]. Les immunoglobulines (IgG) incubées sur le film interagissent alors avec les anti-IgG insérées dans les couches supérieures du film. La capacité d'immunodétection est donc maintenue au sein de tels films. Elle est même accrue à mesure que le nombre de paires de couches *n* est augmenté.

Des films préparés couche-par-couche à base d'anti-péroxydase et de dextrane (un polysaccharide) réticulés avec du glutaraldéhyde ont aussi permis de conserver l'activité immunologique de l'anti-péroxydase à l'égard de la peroxydase. Cette activité a même été

augmentée d'un facteur 2 à 2.5 par rapport à une monocouche d'anti-péroxydase élaborée par physisorption [Brynda, Houska et al. 1998].

Cette approche a également été envisagée dans les thérapies de lutte contre le cancer, en utilisant des anticorps qui se fixent de façon spécifique sur des marqueurs cellulaires de cellules cancéreuses. Ainsi, des microbilles de polystyrène ont été recouvertes d'un film (PAH/PSS)<sub>7</sub>, afin d'y permettre d'adsorption d'anticorps monoclonaux A33. Il s'avère que ces billes fonctionnalisées se lient spécifiquement aux antigènes A33, fortement exprimés par des cellules cancéreuses colorectales [Cortez, Tomaskovic-Crook et al. 2006]. Leur grande efficacité dans le ciblage de ces cellules leur confère un fort potentiel dans le domaine des traitements anticancéreux ciblés, par exemple en associant des traitements par hyperthermie avec des billes dont le cœur est doté de propriétés magnétiques.

#### Biocapteurs à base d'autres protéines

Cette partie traite des biocapteurs basés sur des systèmes multicouches et sur des protéines autres que des enzymes ou des anticorps.

Des cytochromes C associés à du poly(acide phénylaminosulfonique) ont permis de former un film multicouche capable de détecter et de déterminer la concentration de superoxydes présents en solution, grâce au courant électrochimique induit par la réaction enzymatique [Beissenhirtz, Scheller et al. 2004].

Des films multicouches constitués d'une part de nanoclusters d'hémoglobine et de poly(diallyldiamine) et d'autre part de chaînes de poly(styrène sulfonate) ont été construits couche-par-couche sur une électrode de graphite et ont permis de doser la quantité d'oxygène dans le milieu environnant [Liu & Hu 2005]. Cette étude a révélé l'intérêt d'utiliser des nanoclusters de protéines actives dans les films. Effectivement, cela confère au film une meilleure activité électrocatalytique, une plus grande porosité et stabilité.

Afin d'étudier la teneur en sucres et leur nature en solution, une étude de la dégradation d'un film constitué de concanavaline A (anionique) et de glycogène (cationique) a été réalisée. Dans ce cas, la cohésion du film est principalement due à la complexation entre les deux composés. Ainsi, lorsque la concanavaline A s'associe avec les sucres libres en présence, cela implique l'expulsion du glycogène et la désintégration du film. [Sato, Imoto et al. 2005].

### **1.1.3.2 Biocapteurs basés sur de l'ADN**

L'immobilisation d'un oligonucléotide sur l'électrode d'une microbalance à cristal quartz à l'aide d'un film multicouche de polyélectrolytes permet la réalisation d'un système de diagnostic de l'ADN [Zhou, Huang et al. 2001]. L'insertion d'une branche d'ADN, complémentaire de la séquence mutée de la  $\beta$ -thalassémie, a donc permis d'hybrider – et donc de détecter par des changements de masse – les branches d'ADN « défectueuses » présentes en solution.

De plus, Rusling et al. ont incorporé de l'ADN dans des films contenant des polyélectrolytes et des catalyseurs, afin de détecter par voie électrochimique les dommages causés à cet ADN par l'environnement extérieur aux films. Ces films constituent donc des biocapteurs pour caractériser la toxicité chimique vis-à-vis de l'ADN [Rusling 2004].

## **1.1.4. Libération de molécules d'intérêt biologique**

### **1.1.4.1. Libération spontanée**

Les multicouches de polyélectrolytes présentent des caractéristiques intéressantes pour la libération continue et durable de molécules d'intérêt thérapeutique. En effet, bon nombre de paramètres (pH, température, force ionique, etc) ont un effet important sur leur structure, leur épaisseur et sur leur porosité. Les multicouches de polyélectrolytes ont donc d'abord été envisagées comme des membranes à porosité contrôlée.

Des capsules constituées de ces films permettent par exemple de stocker de l'ibuprofène. Ainsi, Möhwald et al. ont étudiés des capsules constituées de différents couples de polyélectrolytes et ont montrés que la perméabilité vis-à-vis de l'ibuprofène n'était pas la même pour tous. Par exemple, les films PSS/sulfate de dextran sont bien plus perméables que les films PSS/PAH, ce qui permet une libération très rapide dans le premier cas (quelques secondes pour vider une capsule de 5 paires de couches) et une libération plus lente dans le second cas (2 minutes pour vider une capsule de 5 paires de couches) [Qiu, Donath et al. 2001].

Le stockage de protéines étant possible directement au sein de films de polyélectrolytes, des lysozymes ont été incorporés dans une structure  $((\text{PAA/PEG})_5/(\text{lysozyme/PEG})_5)_3$  déposée sur

un gel d'agarose, ce qui a permis une libération de lysozymes de façon continue pendant plusieurs semaines [Mehrotra, Lynam et al. 2010].

Un système a récemment été conçu pour stocker et libérer pendant plusieurs semaines des molécules hydrophobes au sein de films construits couche-par-couche. En fait, chaque molécule hydrophobe a été décorée d'une micelle à base d'un copolymère bloc et chargée positivement en surface. Cette dernière a ensuite été déposée alternativement avec du PAA pour former le film final. Une molécule antibactérienne, le triclosan, a été testé de cette façon, et celle-ci a conservé son activité après libération [Nguyen, Zacharia et al. 2007].

Enfin, un film construit couche-par-couche avec PLL et un mélange de HA et d'héparine, puis réticulé, s'est avéré très efficace pour absorber des facteurs de croissance BMP-2 en son sein. Une libération de ces protéines a ensuite été constatée dans le surnageant pendant quelques heures. Tandis que l'épaisseur du film et la quantité chargée augmentent à mesure que la proportion de HA est augmentée, la quantité relative de BMP-2 libérée diminue. [Crouzier, Szarpak et al. 2010].

#### **1.1.4.2. Modulation de fonctions cellulaires**

Les multicouches de PLL/HA réticulées et chargées avec des facteurs de croissance BMP-2 ont par ailleurs continué à libérer localement les protéines durant plusieurs jours, entraînant une différenciation de myoblastes cultivés sur les films en cellules osseuses [Crouzier, Ren et al. 2009].

De même, la protéine A, intégrée dans un film PLL/PGA à plusieurs microns de profondeur, a pu être internalisée par des cellules monocytaires THP-1 incubées en surface du film. Ce phénomène est dû à une dégradation locale du film par les cellules [Jessel, Atalar et al. 2003].

L'introduction d'ADN dans un tel film de polyélectrolytes ne permet cependant pas une transfection de cellules. Par contre, celle-ci a été rendue possible *via* l'incorporation de  $\beta$ -cyclodextrine dans l'architecture, les cavités hydrophobes pouvant recevoir l'agent transfectant sans le dénaturer. La transfection du gène introduit s'est faite à 100 % sur les trois types de cellules testées [Jessel, Oulad-Abdeighani et al. 2006].



### 1.1.4.3. Libération par dégradation de films

De nombreux groupes dans le monde travaillent à l'élaboration de revêtements biocompatibles capables de libérer des principes actifs dans l'organisme. Cependant, la méthode la plus employée est celle qui consiste à libérer des molécules *via* des dégradations chimiques du revêtement en milieu physiologique. A cette fin, des polymères synthétiques, des poly( $\beta$ -amino ester), disposant de liaisons hydrolysables ont été développés. Ces polymères se couplent de façon électrostatique avec des biomolécules comme l'ADN, pour donner des films multicouches. Les produits de leur dégradation, le 1,4-butanediol et des  $\beta$ -acides aminés, ne sont pas toxiques [Lynn & Langer 2000]. Récemment, un de ces poly( $\beta$ -amino ester) (PAE) cationique a été associé à la vancomycine, elle aussi chargée positivement, et à un polyanion de façon à former des films (PAE/polyanion/vancomycine/polyanion)<sub>n</sub>. Lors de cette étude, différents polyanions et différentes techniques de dépôt (immersion ou nébulisation) ont été utilisées pour moduler la vitesse de libération de la vancomycine [Shukla, Avadhany et al. 2010].

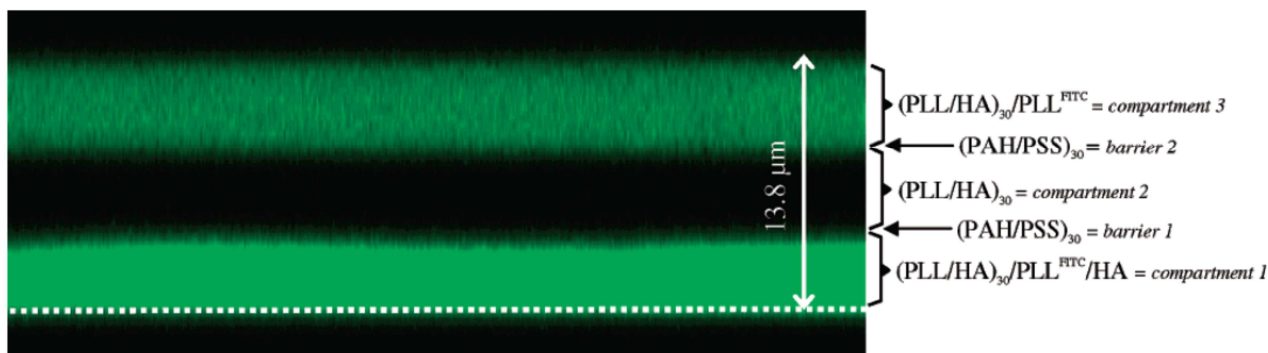
### 1.1.4.4. Réservoirs & barrières

En 2004, des films à croissance exponentielle, très hydratés, et des films à croissance linéaire, assez denses, ont été associés pour former des films multicompartimentés. Ceux-ci sont constitués de réservoirs, à base de PLL et HA par exemple, et de barrières, à base de PAH et PSS par exemple. Dans les premiers, la diffusion de molécules est possible, alors que dans les seconds, la diffusion de molécules est limitée voire impossible (figure 1.6). Ainsi, il est possible de stocker différents types de molécules dans des réservoirs indépendants et séparés par des barrières [Garza, Schaaf et al. 2004].

Ces systèmes présentent un réel intérêt car il est possible de rendre les barrières perméables afin de permettre le passage de molécules au travers. Par exemple, ces barrières peuvent être dégradées par l'action de cellules mises en leur contact [Garza, Jessel et al. 2005].

### 1.1.4.5. Libération sous stimuli

De nombreux travaux ont été relevés dans la littérature concernant la libération de molécules contrôlée par stimuli extérieurs à partir de films construits couche-par-couche.



**Figure 1.6 :** Section verticale réalisée par microscopie confocale d'un film multicompartimenté  $(PLL/HA)_{30}/PLL^{FITC}/HA/(PAH/PSS)_{30}/(PLL/HA)_{30}/(PAH/PSS)_{30}/(PLL/HA)_{30}/PLL^{FITC}$  en contact avec une solution de NaCl à 0.15 mol/L (pH = 5.9). La ligne en pointillés représente l'interface entre le substrat, une lamelle de verre, et le film [Garza, Schaaf et al. 2004].

**pH.** Barrett et al. ont associé l'acide hyaluronique et le PAH pour construire un film. Celui-ci peut gonfler et dégonfler à mesure que l'on change la valeur du pH. De petites molécules hydrophiles ont été chargées dans ce film, et la quantité chargée est elle-aussi fortement dépendante du pH. En effet, celle-ci est maximale lorsque les conditions de pH sont telles que les interactions entre les chaînes et les molécules chargées sont les plus fortes. De plus, la libération de ces molécules est également dépendante du pH : lorsque les conditions de pH favorisent le gonflement du film et diminuent les interactions chaîne/molécule, la libération est maximale [Burke & Barrett 2004].

**Température.** Un assemblage couche-par-couche de microgels de poly(N-isopropylacrylamide-co-acide acrylique) (pNIPAm-AAc) et de PAH a permis d'obtenir un film qui gonfle et dégonfle à mesure que l'on diminue (20 °C) ou augmente (50°C) la température. La doxorubicine a ensuite été chargée au sein de ce film en suivant des cycles de changement de température, qui optimisent le chargement. La libération de cet anticancéreux a ensuite été grandement favorisée en faisant dégonfler le film par augmentation de la température pour expulser les molécules hors du film [Serpe, Yarmey et al. 2005].

**Potentiel électrique.** Des films construits à base de PLL et d'héparine ont pu être « dissous » *via* l'application d'un potentiel de 1.8 V [Boulmedais, Tang et al. 2006]. Plus récemment, des films constitués de multicouches de chitosane, de nanoparticules de bleu de Prusse et de sulfate de gentamicine, se sont avérés très sensibles au potentiel électrique. En effet, le film ne libère qu'une faible quantité de gentamicine sans l'application d'un potentiel. Au-delà

d'un certain seuil de potentiel appliqué, le film libère une quantité plus importante de cette molécule. Ceci semble être dû à une déstabilisation du film par l'application du potentiel électrique [Schmidt, Moskowitz et al. 2010].

## **1.2. Films polymériques & molécules sous contrainte mécanique**

### **1.2.1. Systèmes polymériques mécanosensibles**

Cette partie passe en revue les études réalisées jusqu'à présent sur les systèmes polymériques qui répondent à des stimuli mécaniques macroscopiques. Les systèmes polymériques contenant des protéines soumis à des contraintes mécaniques font l'objet de nombreuses études. Les systèmes mécanochromiques, qui constituent des matériaux intelligents, sont également largement étudiés. Les études sont par contre plus rares en ce qui concerne la libération de molécules sous stimuli mécaniques à partir de systèmes polymériques.

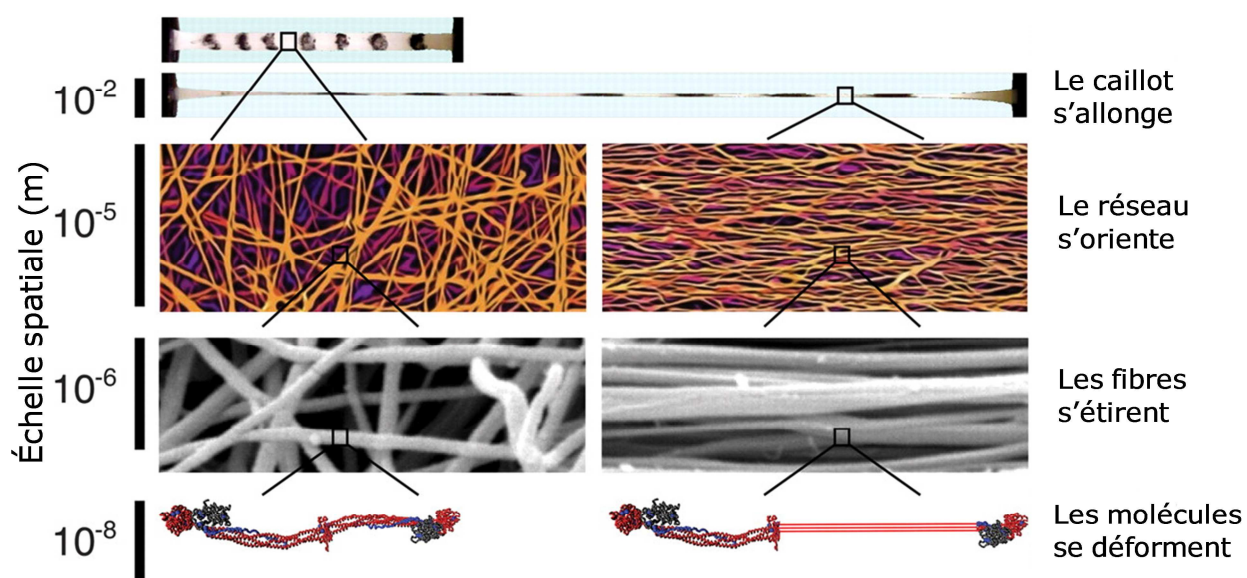
#### **1.2.1.1. Réseaux polymériques à base de protéines sous contrainte mécanique**

Moyennant des réticulations chimiques, des réseaux polymériques peuvent être obtenus à partir de protéines. Par exemple, une solution fortement concentrée de pro-résiline recombinante peut être transformée en un matériau de type caoutchoutique, *via* une réticulation photochimique [Elvin, Carr et al. 2005]. Ce biomatériau a été soumis à des essais mécaniques, afin de déterminer sa résilience, à savoir capacité à retrouver sa forme initiale après application d'une contrainte mécanique. Il est en fait résilient à 92 %, comme une partie du tendon d'ailes de libellules, constitué de résiline naturelle. Cela le rend plus performant que les caoutchoucs synthétiques les plus résilients (80 % au maximum). Ces propriétés mécaniques exceptionnelles sont probablement dues à la haute teneur en eau du matériau – il s'agit d'un gel –, qui sert de plastifiant. Cependant, le module d'élasticité de ce matériau synthétique à base de pro-résiline reste près de 500 fois inférieur à une fibre d'élastine native : 2.5 kPa contre 1200 kPa.

De même, des gels ont été produits par réticulation à partir d'isolats de protéines de soja. Là également, les gels obtenus ont été caractérisés mécaniquement à l'aide de tests de

compressions / relaxations. Plus le taux de réticulation est élevé, plus l'élasticité du matériau est prononcée [Gan, Cheng et al. 2008].

Les caillots de sang consistent principalement en un enchevêtrement de fibres de fibrine. Ils ont été soumis à des étirements mécaniques et leur comportement a été expliqué à tous les niveaux : macroscopique, au niveau supramoléculaire et au niveau moléculaire (figure 1.7). Tout d'abord, une première mesure a montré qu'un tel caillot pouvait être étiré jusqu'à trois fois sa longueur initiale avant rupture, et que sa courbe contrainte/déformation est similaire à celle des matériaux caoutchoutiques. De plus, l'épaisseur de l'échantillon se réduit considérablement sous étirement, à cause d'une forte perte en eau. Weisel et al. ont démontré que l'étirement de l'enchevêtrement de fibres initialement désordonnées à l'échelle macromoléculaire, entraîne un fort alignement des fibres de fibrine selon la direction de l'étirement. De plus, des expériences de diffraction de rayons X ont permis de montrer que les molécules de fibrine sont déformées localement au fur et à mesure de l'étirement. La forte perte d'eau peut ainsi être expliquée : la déformation des protéines entraîne une exposition de sites hydrophobes des protéines [Brown, Litvinov et al. 2009].



*Figure 1.7: Schéma explicatif de l'étirement d'un caillot de sang. La compréhension du comportement mécanique d'un caillot de sang nécessite de s'intéresser aux changements de structures à l'échelle du centimètre jusqu'à celle du nanomètre [Brown, Litvinov et al. 2009].*

Parallèlement aux réseaux formés par des protéines, des gels peuvent être utiles pour orienter des protéines présentes à l'intérieur. En effet, des protéines ont été intégrées dans la

composition de gels de polyacrylamide et ces derniers ont été étirés, entraînant un alignement des protéines selon la direction de l'étirement [Chou, Gaemers et al. 2001].

### 1.2.1.2. Mécanochromisme

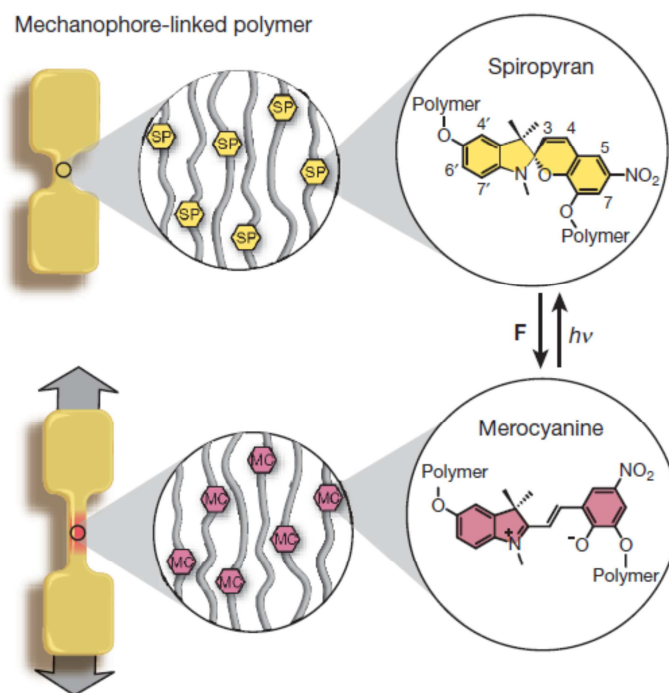
Le mécanochromisme correspond à la propriété d'un matériau de changer de couleur lorsqu'il subit une contrainte mécanique. En 1978 déjà, un premier exemple de polymère mécanochromique a été découvert : en effet, le spectre d'absorption d'un monocristal de poly(diacétylène) a pu être décalé vers les plus hautes énergies sous l'action d'un étirement mécanique [Batchelder & Bloor 1978]. Plus tard, ce polymère a été modifié et introduit dans le domaine dur d'un copolymère à blocs de polyuréthane. Sous l'effet d'un étirement, celui-ci change de couleur. Ceci a été expliqué par une diminution de l'ordre au sein des blocs durs ou même par une transition de phase au sein de ces blocs suite à des étirements [Nallicheri & Rubner 1991].

Il est également possible d'introduire et de fixer des molécules sensibles aux stimuli mécaniques – par exemple des spyropyranes – dans une pièce de polymère, afin de lui conférer des propriétés mécanochromiques (figure 1.8). En effet, l'étirement du réseau polymérique engendre une réaction d'ouverture de cycle, qui implique un changement de couleur du système [Davis, Hamilton et al. 2009].

Des systèmes mécanochromiques sont souvent intégrés dans des pièces de polymère pour détecter craquelures et déformations.

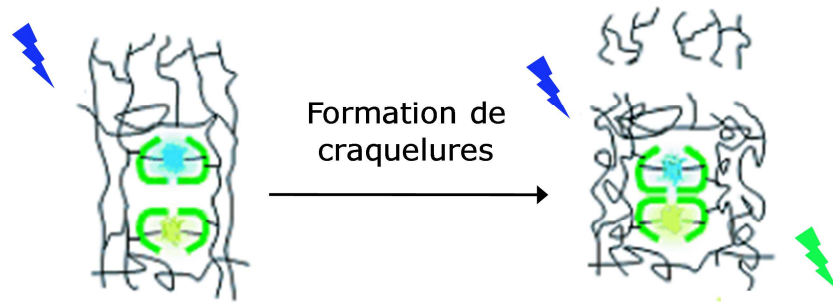
Dans un premier cas, des molécules constituées de deux parties conjuguées liées par un cycle central peu stable ont été introduites dans un réseau polymérique. A l'apparition de craquelures, certaines de ces molécules sont clivées au niveau du cycle central : deux molécules conjuguées bien séparées par la craquelure apparaissent alors et émettent une fluorescence significative [Cho, Kim et al. 2008].

Dans un second cas, ce sont les phénomènes de FRET (*Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer*, transfert d'énergie entre molécules fluorescentes) qui ont été exploités pour détecter fissures ou déformations. Deux études sont décrites ici. Dans la première, une protéine chaperon, le thermosome, a été associée à deux protéines fluorescentes, une donneuse d'énergie et une accepteuse. Le thermosome est basiquement constitué de deux unités sphériques qui



**Figure 1.8 :** Schéma de principe d'un échantillon mécano-chromique préparé à base de poly(méthyl acrylate) et de spiropyrane. Lors de l'application d'une force de traction sur le système, le spiropyrane incolore est transformé en mérocyanine coloré. L'exposition du système à la lumière visible inverse le processus et les spiropyranes sont reformés [Davis, Hamilton et al. 2009].

peuvent contenir chacune une protéine, et un étirement sur le thermosome permet de séparer ses deux parties et donc d'éloigner les deux protéines impliquées dans le FRET, ce qui implique une diminution du signal de fluorescence. Afin d'élaborer un matériau hybride protéines / polymères, le système macromoléculaire a été fixé covalentement dans un réseau acrylamide/bis-acrylamide. La polymérisation induit une déformation du thermosome, ce qui entraîne une séparation des protéines, diminuant le signal FRET. Lorsque le système est étiré, des fissures apparaissent et cela permet de détendre l'environnement immédiat de certains thermosomes et donc de rapprocher certains couples FRET, induisant une augmentation du signal (figure 1.9) [Bruns, Pustelny et al. 2009]. Dans la seconde étude, il s'agit d'un copolymère à blocs de polyuréthane qui a été fonctionnalisé par des molécules tantôt acceptuses sur la matrice amorphe, tantôt donneuses sur les blocs durs. Un étirement du système permet de modifier significativement le signal FRET et il est même possible de quantifier la déformation en fonction de la diminution du signal [Karthikeyan & Sijbesma 2009].



**Figure 1.9 :** Schéma de principe de fonctionnement de la détection de craquelures par émission FRET. Le thermosome est incorporé covalamment dans un réseau polymérique vitreux (gel de polyacrylamide séché). Les contraintes exercées par le matériau hybride entraînent la déformation structurale du thermosome natif et la séparation des deux cavités contenant les protéines impliquées dans le signal FRET. Lors de la formation de fissures (par étirement du système), le polymère et les thermosomes à proximité se relâchent, ce qui peut être détecté par une augmentation du signal FRET [Bruns, Pustelny et al. 2009].

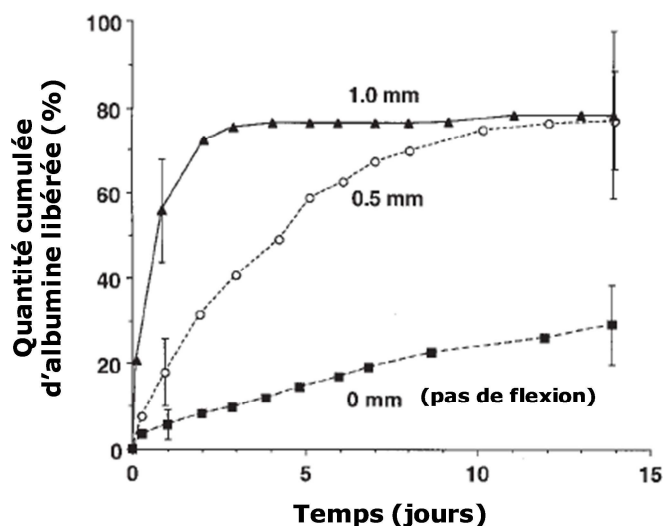
### 1.2.1.3. Libération induite par contrainte mécanique

Il existe très peu d'études relatives à la libération de molécules à partir de films polymériques soumis à des contraintes mécaniques. La plupart des biomatériaux utilisés en tant que plateforme de libération de biomolécules concernent soit une libération spontanée et durable, soit une libération induite par des interactions avec des cellules. D'un point de vue mécanique, les cahiers des charges imposent essentiellement au biomatériau des propriétés de résistance à l'usure, à la rupture, etc.

Une étude de 1997 traite de l'influence de contraintes mécaniques cycliques sur la libération de protéines depuis un implant biocompatible [Arm & Tencer 1997]. Le film, composé d'un copolymère d'acide lactique et d'acide glycolique, contenant soit de l'albumine bovine (66 kDa) soit un inhibiteur de trypsine (20 kDa) et mis au contact d'une solution tampon proche du milieu physiologique, a été soumis à des cycles de flexion de différentes intensités, et le flux de sortie des protéines a été mesuré. Des craquelures ou des pores se forment en surface sous l'effet des flexions et plus leur intensité est importante, plus la libération des protéines est rapide (figure 1.10). Les fissures apparaissent plutôt dans les zones subissant de très fortes contraintes alors que les pores sont plutôt localisés dans les zones à plus faibles contraintes.

Une autre étude traite de la libération stimulée mécaniquement de facteurs de croissance à partir d'hydrogels d'alginate. Il en ressort que la libération de VEGF (facteur de croissance

endothélial vasculaire) est accélérée lorsque les gels sont comprimés. Ces hydrogels ont été implantés *in vivo* dans des souris et des stimulations mécaniques locales ont permis d'augmenter significativement la vascularisation autour de l'implant par rapport à un gel non stimulé [Lee, Peters et al. 2000].



**Figure 1.10 :** Evolution dans le temps de la quantité cumulée en pourcentage d'albumine libérée à partir d'un implant soumis à différentes intensités de flexion. Les valeurs indiquées en millimètre correspondent à la déflexion due à la flexion du centre de l'implant [Arm & Tencer 1997].

Plus récemment, l'influence de forces de compression exercées sur des microcapsules de PDADMA/PSS contenant du dextrane-Alexa Fluor 488 a été étudiée. Les déformations sur les capsules ont été induites par AFM et les propriétés fluorescentes des macromolécules marquées ont permis d'estimer les quantités relatives libérées, avec et sans contraintes. Il est apparu qu'au-delà de 18 % de déformation, qui correspond au début de la déformation plastique, la libération s'accélère très brusquement [Fernandes, Delcea et al. 2010].

## 1.2.2. Films multicouches sous contrainte mécanique

L'utilisation des films multicouches pour obtenir des substrats étirables et répondant aux stimuli mécaniques nécessite une caractérisation précise de leurs propriétés mécaniques, qui peuvent être interprétées physiquement. Outre ces points, cette partie présente un aperçu des études réalisées sur des films multicouches soumis à des contraintes mécaniques.



### 1.2.2.1. Modulation des propriétés mécaniques

Les films multicouches de polyélectrolytes se présentent à température ambiante sous différentes formes de la matière : cela va des gels viscoélastiques aux solides vitreux. Ainsi, il existe en leur sein une grande variété de propriétés mécaniques.

Les films PLL/HA constituent un exemple de gels viscoélastiques qui possèdent à la fois le comportement d'un liquide visqueux, caractérisé par une viscosité, et celui d'un matériau solide avec une certaine rigidité, caractérisée par un module d'Young. Une valeur de 0.1 Pa.s a été estimée pour sa viscosité *via* des mesures de microbalance à quartz [Picart, Lavalley et al. 2001] et son module d'Young est de l'ordre de quelques kPa (caractérisé par microscopie à force atomique en mode indenteur) [Schneider, Francius et al. 2006].

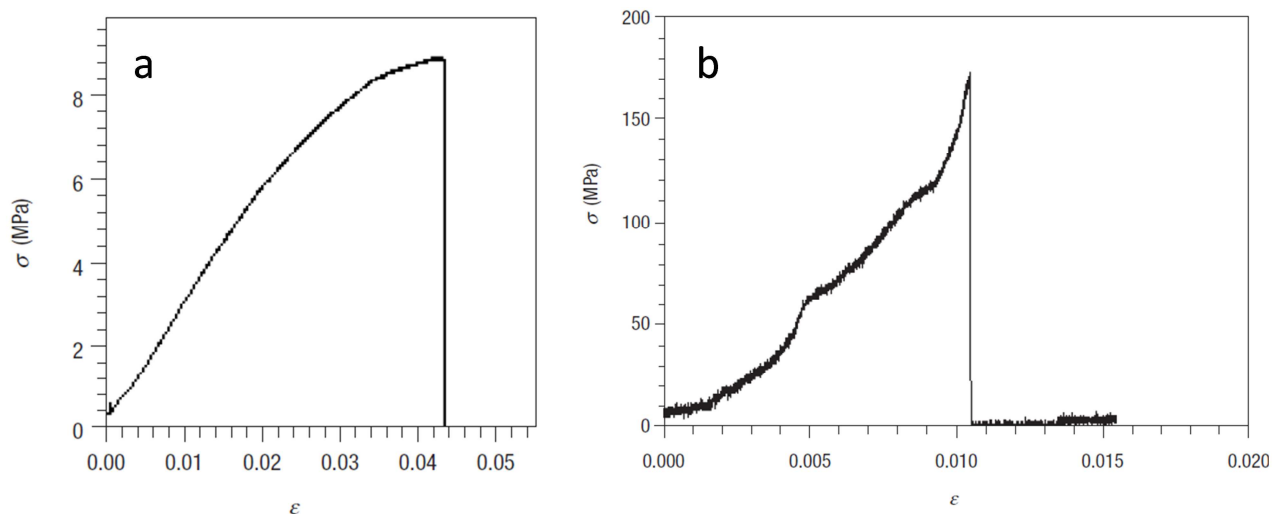
Les films PAH/PSS possèdent les propriétés d'un solide vitreux [Kulcsar, Voegel et al. 2005]. Lorsqu'ils sont déposés sur une feuille de silicone et soumis à un étirement longitudinal, des craquelures apparaissent dès les faibles taux d'étirement [Mertz, Hemmerlé et al. 2007].

Il est possible de moduler les propriétés mécaniques de films PLL/HA en les réticulant chimiquement [Richert, Boulmedais et al. 2003]. Ceci permet d'augmenter le module d'Young d'un facteur allant jusqu'à 40, ce qui signifie que le film est quelque peu rigidifié, sans pour autant atteindre des modules d'élasticité d'un solide vitreux [Collin, Lavalley et al. 2004].

Depuis une dizaine d'années, des films hybrides construits couche-par-couche et présentant de plus grandes rigidités ont été développés à base de polymères et de composés inorganiques. Soumis à un test de traction, ils présentent une caractéristique contrainte / déformation très différente des films de polyélectrolytes vitreux (voir figure 1.11) : alors qu'un film de type PEI/PAA présente une petite zone plastique, un film ((PEI/PAA)/(PEI/nanotubes)<sub>5</sub>)<sub>8</sub> a un comportement complètement élastique avant rupture [Mamedov, Kotov et al. 2002]. Pour ces films construits à base de polyélectrolytes et de nanotubes, le module d'Young s'élève à 35 GPa et la résistance à la rupture à 220 MPa alors que les valeurs sont respectivement de 0.3 GPa et 9 MPa pour PEI/PAA.

Le tableau 1.1 est l'illustration de la très grande variété des propriétés mécaniques des films construits couche-par-couche. Les modules d'élasticité mesurés jusqu'ici sont compris entre

$10^{-5}$  et 125 GPa, tandis que les valeurs de résistances à la rupture en traction vont de 9 MPa pour le film le plus fragile à près de 500 MPa !



**Figure 1.11 :** Mesures de la contrainte ( $\sigma$ ) en fonction de la déformation relative appliquée ( $\epsilon$ ) réalisées par tests de traction des films autosupportés pour : (a) un film organique (PEI/PAA)<sub>40</sub> et (b) un film hybride ((PEI/PAA)/(PEI/nanotubes)<sub>5</sub>)<sub>8</sub>. La température est fixée à 25°C. Dans la gamme 30-100 %, l'humidité relative de l'air ambiant n'a pas d'influence sur ces expériences [Mamedov, Kotov et al. 2002].

### 1.2.2.2. Interprétations physiques des propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques de ces films polymériques peuvent être directement reliées à la mobilité des chaînes à l'intérieur. En effet, de grandes différences ont été relevées concernant la diffusion des chaînes entre des films à croissance linéaire et des films à croissance exponentielle. Le coefficient de diffusion de PAH dans PAH/PSS a été estimé à moins de  $10^{-6}$   $\mu\text{m}^2/\text{s}$  [Nazaran, Bosio et al. 2007] alors que celui de PLL dans PLL/HA a été estimé à des valeurs comprises entre 0.01 et 1  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  [Picart, Mutterer et al. 2005], les modules d'Young correspondants étant de 1 GPa pour PAH/PSS et  $10^{-5}$  GPa pour PLL/HA (tableau 1.1).

La diffusion des chaînes est fortement dépendante :

- des interactions entre chaînes *via* le couplage ionique, qui, en s'intensifiant, tendent à freiner la diffusion;
- de la rigidité des chaînes, qui permet d'éviter leur enroulement et favorise donc la diffusion à une échelle plus grande;
- enfin, de l'état de gonflement et donc d'hydratation du film [Nazaran, Bosio et al. 2007].

Type de film	Module d'Young (GPa)	Résistance à la rupture (MPa)
PLL/HA <sup>a</sup>	0.00001	
PLL/HA réticulé <sup>a,b</sup>	0.0004	
PDADMA/PSS <sup>c,d</sup>	0.02 – 0.14	
PEI/PAA <sup>e</sup>	0.3	9
PAH/PSS <sup>c,f</sup>	0.5 – 1	
(PSS-PAH) <sub>9</sub> -nanoparticules d'or-(PSS-PAH) <sub>9</sub> <sup>f</sup>	10	
(PDADMA/plaquettes d'argile) <sub>100</sub> <sup>g</sup>	10	106
(PEI-PAA-(PEI-nanotubes) <sub>5</sub> ) <sub>8</sub> <sup>e</sup>	35	220
(PVA-plaquettes d'argile) <sub>300</sub> réticulé <sup>h</sup>	125	480
Kevlar® <sup>i</sup>	110	3000
Nanotube de carbone <sup>j</sup>	900	150000

**Tableau 1.1** : Modules de Young et résistances à la traction de différents films construits couche-par-couche (puis éventuellement réticulés) et à titre de comparaison de deux matériaux organiques reconnus pour leur résistance mécanique (en gris). Références : a [Schneider, Francius et al. 2006], b [Collin, Lavalley et al. 2004], c [Gao, Leporatti et al. 2001], d [Jaber & Schlenoff 2006], e [Mamedov, Kotov et al. 2002], f [Jiang, Markutsya et al. 2004], g [Tang, Kotov et al. 2003], h [Podsiadlo, Kaushik et al. 2007], i [Kevlar® technical guide, edited by Dupont] & j [Demczyk, Wang et al. 2002].

Ainsi, il est possible d'influencer directement les propriétés mécaniques des films multicouches de polyélectrolytes en modifiant les interactions électrostatiques entre chaînes. Par exemple, il est possible de diminuer les interactions en augmentant le taux de sel [Dubas & Schlenoff 2001]. Schlenoff et al. ont montré qu'une augmentation du taux de sel dans un film PDADMA/PSS augmentait énormément l'interdiffusion des chaînes entre les couches pseudo-stratifiées [Jomaa & Schlenoff 2005]. Ils ont également montré que le module élastique d'un tel film autosupporté dépendait fortement du taux de sel. En effet, le module élastique a été déterminé pour des films (PADAMA-PSS)<sub>250</sub> construits en présence de NaCl à 1 mol/L puis séchés et reconditionnés en présence de différentes concentrations en sel. Les tests de tractions ont donné des modules d'élasticité très différents allant de 17 MPa pour un film placé dans une solution de concentration nulle en NaCl, à 1 MPa pour un film placé dans une solution de concentration de 1 mol/L [Jaber & Schlenoff 2006].

Il est également possible de modifier grandement les interactions entre chaînes, et donc les propriétés mécaniques (dureté et module élastique), en modifiant les charges des polymères en présence ou en jouant sur le pH des solutions utilisées [Pavoor, Bellare et al. 2004].

Modifier la température d'un film permet également de moduler ses propriétés mécaniques. En effet, il a été montré qu'en chauffant un film PDADMA/PSS, il était possible de faire varier le module d'élasticité de 100 MPa à 1 MPa. Dans ce cas, ce brusque changement a pu être attribué au passage de l'état solide vitreux du film à un état solide mou, qui se produit à 35°C. Le film devenant moins structuré et l'agitation thermique étant plus importante, la diffusion des chaînes est facilitée [Müller, Köhler et al. 2005].

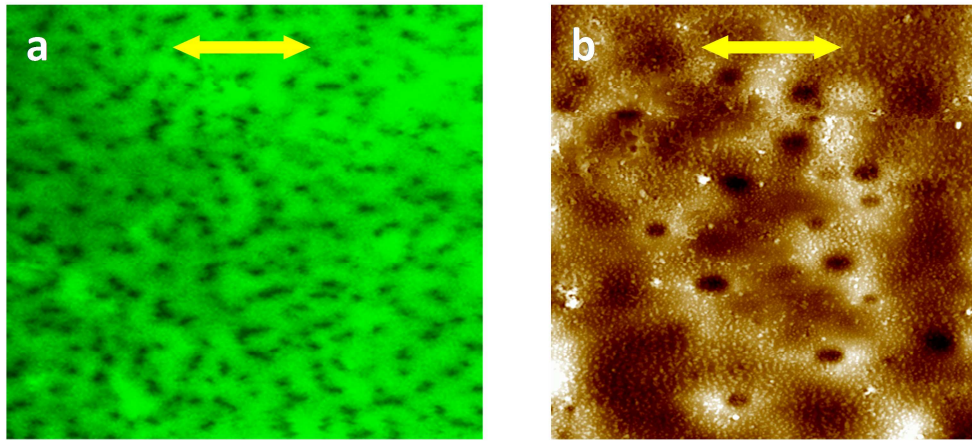
### **1.2.2.3. Mise sous contrainte mécanique d'architectures multicouches**

Il existe plusieurs exemples où des multicouches de polyélectrolytes ont été soumises à des étirements.

Tout d'abord, un film (PAH/Nafion)<sub>4</sub> recouvert par des couches (PAA/PAH)<sub>n</sub> et déposé sur une feuille de silicone a permis d'obtenir une surface relativement hydrophile, avec un angle de contact pour l'eau de 50°. Un simple étirement a ensuite engendré une surface hydrophobe avec un angle de 100°, et ce de façon réversible. Cet angle de contact étant très proche de celui observé pour un film PAH/Nafion, il semblerait que cette hydrophobicité soit obtenue par une restructuration du film due à l'étirement qui entraînerait une migration des chaînes de Nafion vers la surface supérieure du film [Hemmerlé, Roucoules et al. 2005].

Une étude a ensuite été réalisée sur différents films multicouches de polyélectrolytes soumis à des étirements unidirectionnels. PLL/HA, PAH/PSS et PDADMA/PSS ont notamment été testés. Alors que PAH/PSS présentait de nombreuses craquelures consécutives à l'étirement (ce qui peut s'expliquer par le fait qu'il s'agisse d'un film assez dense et rigide), les deux autres types de films ne présentaient pas de défauts après étirement, de par leur nature liquide visqueux ou solide mou respectivement [Mertz, Hemmerlé et al. 2007].

Plus tard, grâce au développement des films construits couche-par-couche multicompartimentés (voir partie 1.1.4.4.) [Garza, Schaaf et al. 2004], il a été possible de créer un film réservoir / barrière sur une feuille de silicone de façon à générer la formation de trous nanométriques dans la barrière par étirement. Les systèmes utilisés, PLL/HA pour le réservoir et PDADMA/PSS pour la barrière, ont permis de construire un réservoir couvert par une barrière munie de valves, dont l'ouverture et la fermeture étaient contrôlables par étirement (figure 1.12) [Mertz, Hemmerlé et al. 2007].



**Figure 1.12 :** (a) Observation de la surface d'un film  $(PLL/HA)_{30}/PLL/(PSS/PDADMA)_5$  sur silicone étiré à 60 % et mis en contact avec une solution de  $PLL^{FITC}$ , réalisée par microscopie confocale à balayage laser (excitation à 488 nm, émission récupérée dans la gamme 505-530 nm). L'image est de taille  $47 \times 47 \mu m^2$ . La flèche jaune indique la direction de l'étirement. (b) Image AFM de taille  $10 \times 10 \mu m^2$  en mode contact d'un film  $(PLL/HA)_{30}/PLL/HA/PLL/(PSS/PDADMA)_5$  sur silicone étiré à 100 %. La flèche jaune indique la direction de l'étirement [Mertz, Hemmerlé et al. 2007].

Plus récemment, Möhwald et al. ont utilisé des chaînes de PSS modifiées avec des pyrènes afin de comprendre les changements structuraux induits par l'étirement d'un film PDADMA/PSS. Au repos, le film présente un certain enroulement des chaînes de polyélectrolytes entre elles, c'est pourquoi un certain nombre de pyrènes se retrouvent à moins de 5 Å d'autres pyrènes : ils forment des excimères, qui émettent de la fluorescence. Ainsi, il a été possible de mesurer un coefficient de déroulement (« decoiling » en anglais) des chaînes soumises à étirement, en se basant sur la baisse de fluorescence résultant de la destruction des excimères [Früh, Köhler et al. 2010].

Enfin, Schaaf et al. ont élaboré des revêtements à base de multicouches de polyélectrolytes résistants à l'adhésion de cellules fibroblastes. Pour cela, des fonctions éthylène glycol et phosphorylcholine ont été greffées sur les chaînes de PAA terminant un film de base PSS/PAH. L'objectif initial était d'éviter toute adhésion cellulaire, que le substrat en silicone soit au repos ou étiré. Mais l'étude a montré qu'au-delà d'un taux critique d'étirement (environ 150 % de la dimension initiale), les cellules fibroblastiques avaient toutefois tendance à adhérer [Reisch, Hemmerlé et al. 2010].

## 1.2.3. Étirement local de molécules

### 1.2.3.1. Historique

Il est possible depuis bien longtemps de caractériser les propriétés des matériaux *via* des essais de traction, de compression, de cisaillement ou encore de dureté. Cependant, dans le cas de molécules uniques, il n'a été possible d'acquérir le même type d'informations que très récemment. En 1992, Smith et al. ont été les premiers à faire des mesures d'élasticité directement sur un brin d'ADN [Smith, Finzi et al. 1992]. Celui-ci a été fixé à un substrat en verre d'une part, et à une bille magnétique d'autre part, puis soumis à des déformations – mesurables à l'aide d'un microscope optique – sous l'action d'un champ magnétique et d'un flux du milieu liquide. Ainsi, il a été possible d'obtenir le tracé de la courbe force / extension du brin.

Peu après, Florin et al. ont réussi à mesurer la force d'interaction entre un ligand, la biotine, et un récepteur, l'avidine, à l'aide d'un microscope à force atomique (AFM, « Atomic Force Microscope » en anglais). La pointe du cantilever était fonctionnalisée avec de l'avidine et une bille d'agarose (fixée sur une surface) avec de la biotine. La force nécessaire pour séparer la pointe de la bille et donc la force d'interaction entre les deux molécules a pu être estimée à environ 160 pN [Florin, Moy et al. 1994].

Ensuite, la spectroscopie de force AFM a été introduite pour caractériser les propriétés mécaniques d'une chaîne de polysaccharide [Rief, Oesterhelt et al. 1997]. A partir de là, l'AFM est devenue la principale technique de caractérisation pour déterminer les forces d'interactions moléculaires.

Par la suite, les recherches se sont de plus en plus spécialisées. Récemment, l'équipe de J. M. Fernandez s'est intéressée à l'effet de l'étirement d'une protéine contenant une unique liaison disulfide sur sa réactivité vis-à-vis d'une réaction chimique. Il semble que sous étirement, la liaison devienne plus accessible au réactif extérieur ou à l'enzyme impliquée dans la réduction de la liaison. La cinétique de la réaction est également accélérée sous étirement [Wiita, Perez-Jimenez et al. 2007; Liang & Fernández 2009].

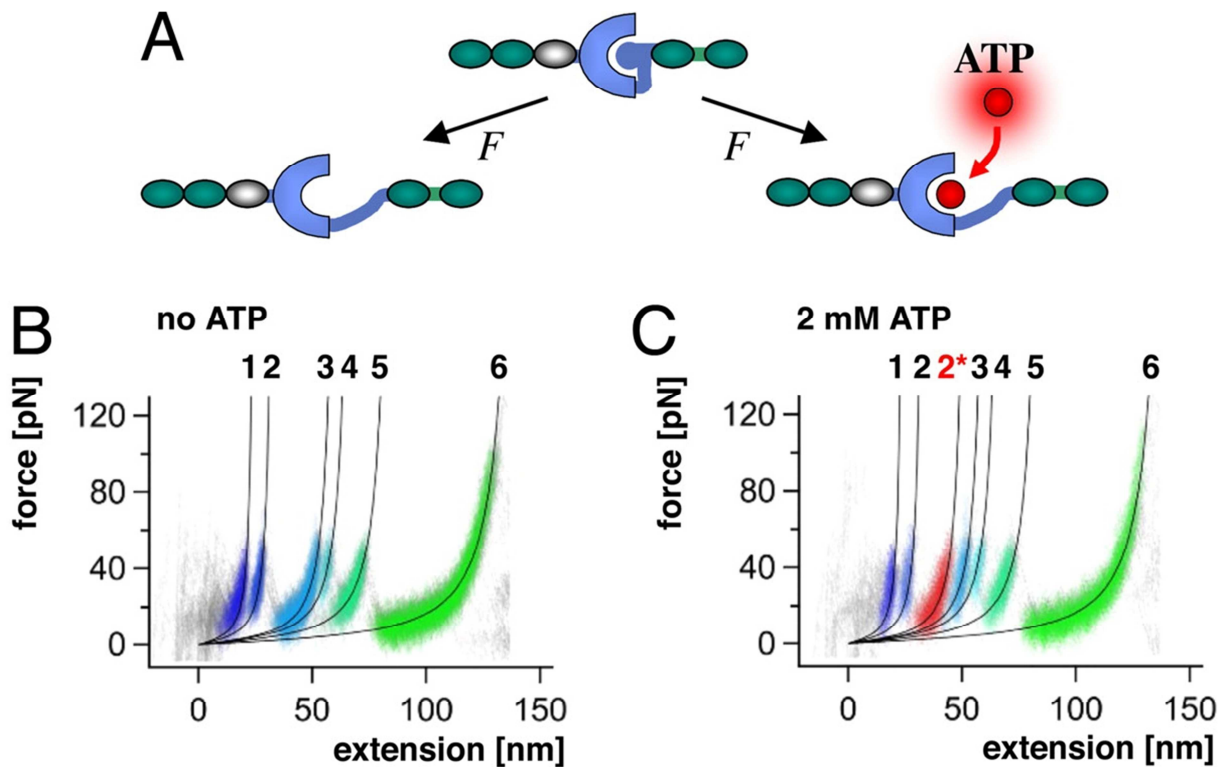
### 1.2.3.2. Étirement local d'enzymes & activité

Plusieurs études soulignent aujourd'hui le rôle joué par les stimuli mécaniques dans les processus biochimiques intracellulaires. Il semblerait notamment qu'un grand nombre de protéines subissent des déformations, ce qui peut induire des mécanismes dits de "mécanotransduction", *via* l'exposition de sites cryptiques [Vogel 2006]. Les sites cryptiques correspondent à des séquences peptidiques enfouies dans la structure de certaines protéines et qui sont exposées et donnent lieu à des réactions chimiques lorsque les protéines sont soumises à des contraintes mécaniques. Des cellules ont par ailleurs été soumises à des étirements, et cela a induit une augmentation de l'activité catalytique de protéines en son sein. Les protéines subissent en fait une déformation locale qui conduit à une exposition de sites cryptiques. Une activité enzymatique – normalement inexistante lorsque le site actif est enfoui – se déclenche alors [Sawada, Tamada et al. 2006].

L'étude de l'effet d'un stimulus mécanique sur une enzyme présente donc un grand intérêt, notamment pour ce qui est de comprendre, à l'échelle moléculaire, comment le signal mécanique « perçu » par la macromolécule peut être converti en réponse biochimique. Plusieurs études sur ce sujet ont déjà été réalisées.

Chez les vertébrés, la titine, une protéine élastique, est impliquée dans la détection des contraintes mécaniques *via* son domaine titine kinase et contribue à l'adaptation du muscle en conséquence. Or la titine kinase possède un site actif pouvant coupler l'adénosine triphosphate (ATP), mais qui est inaccessible – et ne permet donc pas de coupler l'ATP – au repos. Ainsi, la titine kinase a été soumise à un étirement moléculaire par AFM. Cela permet de libérer le site actif et d'induire le couplage avec l'ATP (figure 1.13) puis le déclenchement d'une réaction biochimique en chaîne [Puchner, Alexandrovich et al. 2008].

Grâce à l'utilisation de la spectroscopie de fluorescence monomoléculaire (« single-molecule fluorescence spectroscopy » en anglais) couplée à un AFM [Roeflaers, De Cremer et al. 2007], l'activité d'une enzyme, la lipase B, a été suivie lorsque des contraintes mécaniques cycliques lui ont été appliquées. L'enzyme est désactivée lors de chaque étirement et est réactivée après chaque retour à l'état non étiré. De cette façon, il a été possible de déterminer la durée de relaxation de l'enzyme lui permettant de revenir à une conformation active [Gumpp, Puchner et al. 2009].



**Figure 1.13 :** Profils de déformation de la titine kinase en tant que molécule unique et mise en lumière de son couplage avec l'ATP induit par un étirement mécanique. (A) Une force extérieure peut libérer le site de couplage de l'ATP par déformation du domaine autoinhibitif (boule bleue). (B) La superposition des tracés de 66 évènements de déformation de la titine kinase par AFM montre un nombre limité de types d'évènements, numérotés de 1 à 5. (C) Le couplage de l'ATP induit mécaniquement fait apparaître un nouveau pic de force, 2\*, absent des évènements de déformation en l'absence d'ATP (44 tracés).

### 1.2.3.3. D'une échelle à l'autre

Le contrôle de la conformation et de l'activité de molécules et de nanostructures *via* des manipulations macroscopiques d'échantillons constitue aujourd'hui un secteur captivant des nanotechnologies. L'application de stimuli mécaniques à l'échelle nano ou moléculaire n'est que très peu exploitée jusqu'à présent alors que cela pourrait permettre notamment la compréhension de nombreux phénomènes moléculaires. De plus, de nombreux systèmes fonctionnels restent à inventer pour lier les contraintes macroscopiques mécaniques issues des activités physiques quotidiennes humaines à des effets à l'échelle moléculaire [Ariga, Mori et al. 2011].



# Chapitre 2 :

## Matériels et méthodes

### 2.1. Construction et manipulation des films polymériques

- 2.1.1. Solutions tampon
- 2.1.2. Supports de construction des films
- 2.1.3. Construction de films à base de multicouches de polyélectrolytes
- 2.1.4. Construction de gels de polyacrylamide
- 2.1.5. Biomolécules
- 2.1.6. Modifications chimiques de biomolécules ou polymères
- 2.1.7. Etirement des échantillons construits sur silicones

### 2.2. Techniques utilisées durant les expériences

- 2.2.1. Microscopie confocale à balayage laser
- 2.2.2. Microscopie à force atomique
- 2.2.3. Microbalance à cristal de quartz
- 2.2.4. Méthodes de dosage
- 2.2.5. Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment

## **2.1. Construction et manipulation des films polymériques**

### **2.1.1. Solutions tampon**

La plupart des expériences décrites dans ce rapport sont réalisées en présence d'une solution tampon de trishydroxyméthylaminométhane (TRIS) à 0.01 mol/L et de chlorure de sodium (NaCl) à 0.15 mol/L, préparée à base d'eau ultra-pure (résistivité de 18.2 MΩ.cm, Milli-Q Plus, Millipore, Molsheim, France), et dont le pH a été ajusté à 7.4.

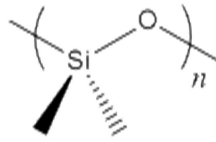
### **2.1.2. Supports de construction des films**

#### **2.1.2.1 Surface de verre**

Des lamelles de verre circulaires de diamètre 12 mm, d'épaisseur 150 µm environ et de rugosité inférieure à 1 nm (Menzel-Gläser, Braunschweig, Allemagne) servent de substrats pour la construction des différents films. Celles-ci sont préalablement lavées à l'éthanol absolu, à l'eau ultra-pure, puis plongées pendant 10 minutes dans une solution de Hellmanex® II à 2 % (v/v) chauffée à 40 °C. Ensuite elles sont rincées à l'eau ultra-pure puis plongées pendant 10 minutes dans une solution d'acide chlorhydrique à 0.1 mol/L chauffée à 40 °C. Les lamelles sont ensuite abondamment rincées à l'eau ultra-pure, avant d'être stockées pour une utilisation ultérieure.

#### **2.1.2.2. Substrat en silicone**

Pour les expériences nécessitant l'utilisation d'un substrat étirable, des feuilles de polydiméthylsiloxane (PDMS, figure 2.1) d'épaisseur 250 µm environ (Specialty Manufacturing Inc., Saginaw, Michigan, Etats-Unis) sont utilisées pour préparer les échantillons. Celles-ci sont découpées en carrés de 18 mm de côté et sont rincées à l'éthanol absolu, puis à l'eau ultra-pure, avant d'être stockées pour une utilisation ultérieure.



*Figure 2.1 : Structure du polydiméthylsiloxane (PDMS).*

### 2.1.2.3. Modifications de surface des silicones

Afin d'augmenter l'adhérence sur les silicones de certains des systèmes polymériques étudiés, plusieurs traitements sont envisagés.

#### Traitements basés sur une irradiation UV

- Irradiation UV : la feuille de silicone est soumise à un rayonnement UV pendant une durée variant de 10 minutes à 2 heures. Pour cela, un appareil de nettoyage UV "Tipcleaner 220" (BioForce Nanosciences Inc., Ames, IA, Etats-Unis), a été utilisé. Ainsi, une exposition à un rayonnement UV de 185 et 254 nm génère de l'oxygène atomique, un agent oxydant très puissant. En fait, de l'ozone est d'abord créé à la longueur d'onde 185 nm, puis l'ozone est converti en oxygène atomique à 254 nm. Un plasma d'oxygène ainsi formé comporte un grand nombre d'électrons et d'atomes radicalaires d'oxygène, qui réagissent avec le polymère du silicone pour former des radicaux libres. Ceci donne lieu à des réactions chimiques qui tendent à détruire les chaînes pour donner du dioxyde de carbone, de l'eau et des molécules organiques volatiles. Le silicium du silicone ne donne pas de molécules volatiles. Il se forme donc un film de  $\text{SiO}_x$  en surface [Ouyang, Yuan et al. 2000]. La présence de silanol et de groupes carboxylique en surface [Xiao, Zhang et al. 2002] implique que la surface est plus hydrophile [de Menezes Atayde & Doi 2010], mais aussi que cette couche d'oxyde peut présenter des craquelures sous étirement [Zhu, Mills et al. 2005].
- Fonctionnalisation par des doubles liaisons : après une irradiation UV de 2 heures, la feuille de PDMS est plongée pendant 1 heure et sous agitation douce dans une solution de 3-méthacryloxypropyltriméthoxysilane (figure 2.2) à 10 % dans l'acétone. Cette molécule réagit avec les alcools présents en surface, ce qui conduit à la fonctionnalisation par des doubles liaisons C=C en surface. Cette méthode est réalisée au sein de l'équipe du Pr. P. Schaaf, de l'Institut Charles Sadron (ICS) à Strasbourg.

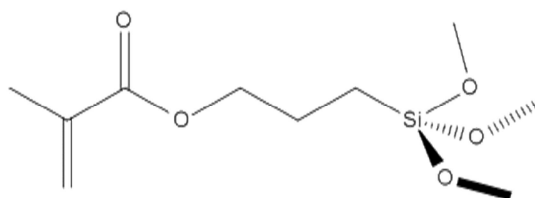


Figure 2.2 : Structure du 3-méthacryloxypropyltriméthoxysilane.

### Traitements basés sur l'utilisation d'un plasma sous atmosphère contrôlée

- Traitement plasma Argon : la feuille de silicone est introduite dans une chambre à vide ensuite remplie d'Argon (1 mbar). Puis un plasma est généré à l'intérieur pendant 1 minute grâce à l'application d'un courant électrique continu de puissance 60 W. Ce type de traitement est réalisé au sein de l'équipe de V. Roucoules, de l'Institut de Science des Matériaux de Mulhouse (IS2M). Il en résulte une surface activée, c'est-à-dire présentant des radicaux en surface. L'angle de contact mesuré pour l'eau sur un silicone traité par cette technique est très proche de  $0^\circ$  [Pinto, Alves et al. 2010].
- Fonctionnalisation par des doubles liaisons : cette technique consiste en un dépôt de polymère plasma d'anhydride maléique par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma pulsé (vide à  $5 \times 10^{-4}$  mbar, 15 W, 816 Hz, 6 minutes) [Siffer, Ponche et al. 2005], suivi d'un dépôt réactif de vapeur d'allylamine (vide à  $5 \times 10^{-4}$  mbar, 2 heures). Ce type de traitement est réalisé au sein de l'équipe de V. Roucoules, de l'IS2M. Les opérations sont schématisées ci-dessous (figure 2.3).

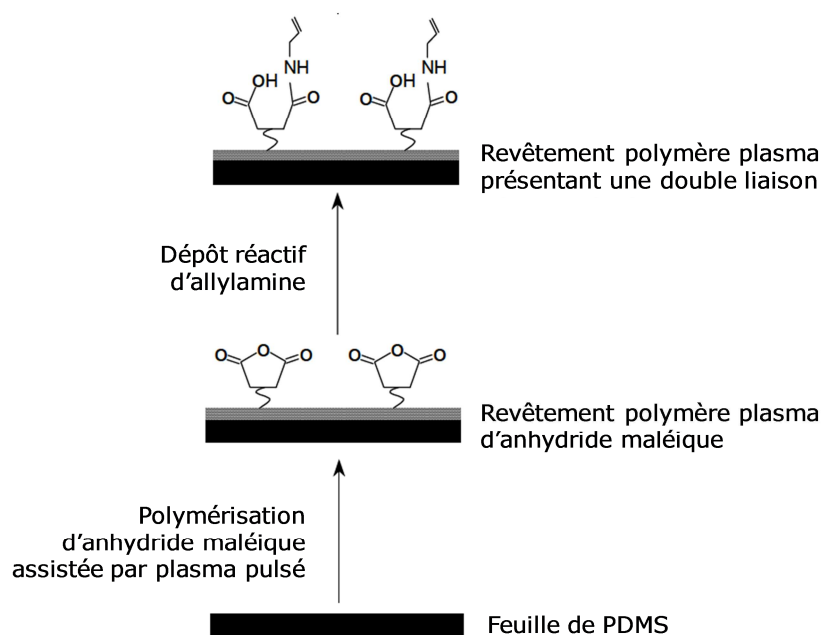


Figure 2.3 : Schéma explicatif de la fonctionnalisation par des alcènes.

## 2.1.3. Construction de films à base de multicouches de polyélectrolytes

### 2.1.3.1. Polyélectrolytes utilisés

Les polyélectrolytes suivants sont utilisés pour réaliser des films multicouches de polyélectrolytes.

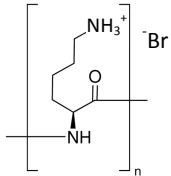
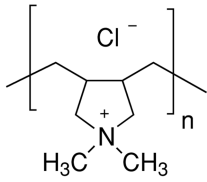
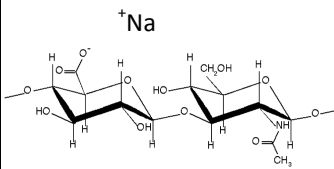
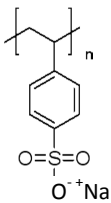
Polyélectrolyte / Notation	Structure moléculaire	M <sub>w</sub> (g/mol)	pKa	Charge à pH=7,4	Fournisseur
Poly(chlorure de L-lysine) PLL		60 000	10,5	(+)	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
Poly(chlorure de diallyldiméthylammonium) PDADMA		350 000	/	(+)	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France
Hyaluronate de sodium HA		130 000	2,9	(-)	Lifecore Biomedical, Chaska, Minnesota, Etats-Unis
Poly(4-styrene-sulfonate de sodium) PSS		70 000	/	(-)	Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France

Tableau 2.1 : Liste des polyélectrolytes utilisés au cours des constructions de films multicouches.

### 2.1.3.2. Construction des films multicouches

Les constructions de films multicouches de polyélectrolytes sont réalisées par immersions du substrat, alternativement :

- dans une solution de polycations à 1 mg/mL,

- puis dans une ou plusieurs solution(s) tampon, pour rincer l'excès de polycations,
- puis dans une solution de polyanions à 1 mg/mL,
- puis dans une ou plusieurs solution(s) tampon, pour rincer l'excès de polyanions.

Ces quatre étapes peuvent être répétées plusieurs fois jusqu'à obtenir le dépôt du nombre de paires de couches souhaité. Le premier polyélectrolyte à être déposé est le polycation, car les deux types de substrat utilisés, le verre et le PDMS, présentent une charge de surface négative (vérifiée par mesure du potentiel zêta). Les durées de dépôt et de rinçage, ainsi que le nombre de solutions de rinçage utilisées ont variés selon le type de film à construire. Pour un film de type PLL/HA, le temps de chaque dépôt est de 5 minutes et est suivi de deux rinçages successifs de 5 minutes chacun dans des solutions tampon. Ce type de construction, qui dure environ cinq heures si l'on souhaite construire une dizaine de paires de couches, a été réalisé à l'aide d'un robot (Dipping Robot DR3, Riegler & Kirstein GmbH, Potsdam, Allemagne). Pour un film de type PDADMA/PSS construit manuellement, le temps pour chaque dépôt est de 1 minute environ, tout comme le temps de rinçage, qui est réalisé dans ce cas en utilisant une seule solution tampon.

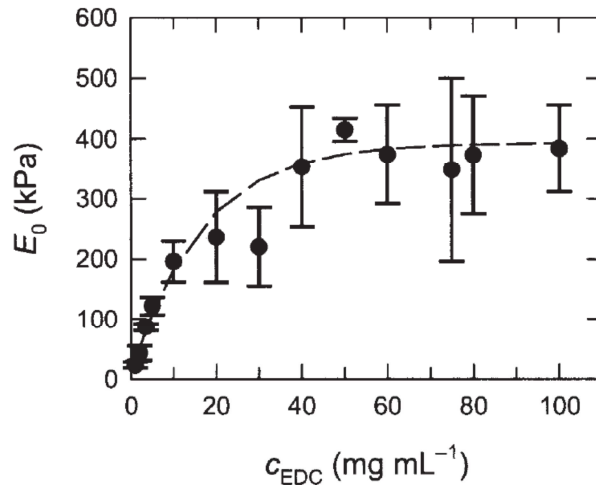
A la fin de la construction, le film est stocké dans une solution tampon à une température comprise entre 20 et 25 °C.

### **2.1.3.3. Réticulation**

Certaines manipulations nécessitent de réticuler chimiquement des films PLL/HA. Pour cela, un mélange de 1-éthyl-3-(3-diméthyl aminopropyl)carbodiimide (EDC) et de N-hydrosulfosuccinimide (sulfo-NHS) est utilisé, avec des concentrations en EDC pouvant être comprises entre 5 et 500 mmol/L (soit de 1 à 100 mg/mL) et une concentration de sulfo-NHS fixée à 50 mmol/L (soit 11 mg/mL) [Francius, Hemmerlé et al. 2006]. Le graphique ci-dessous (figure 2.4) montre l'effet de la concentration de EDC sur le module d'Young d'un film (PLL/HA)<sub>24</sub>.

Ces réticulations sont réalisées dans un milieu exclusivement salin, avec NaCl à 0,15 mol/L, dont le pH est ajusté à 5.5.

Un état de l'art concernant la réticulation est placé en début de partie 3.3.1.



**Figure 2.4:** Valeurs du module d'Young  $E_0$  d'un film  $(\text{PLL}/\text{HA})_{24}$  réticulé à l'aide d'un mélange EDC/sulfo-NHS, en fonction de la concentration en EDC. La concentration en sulfo-NHS est fixée à 11 mg/mL. Le module d'Young a ici été déterminé par microscope à force atomique (AFM) en mode indentateur [Francius, Hemmerlé et al. 2006].

## 2.1.4. Construction de gels de polyacrylamide

### 2.1.4.1. Réactifs utilisés

Différents réactifs sont nécessaires pour préparer des gels de polyacrylamide, qui sont issus de la polymérisation radicalaire d'un mélange d'acrylamides et de bis-acrylamides [Tanaka 1981] :

- une solution aqueuse d'acrylamide (solution à 40 g / 100 mL, Fluka, Schnelldorf, Allemagne), le monomère qui forme des chaînes de polyacrylamide,
- une solution aqueuse de N-N'-méthylène bisacrylamide (poudre pure à 99 %, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Allemagne), molécules qui forme des ponts entre les chaînes de polyacrylamide,
- du tétra-méthyl-éthylènediamine (TEMED, liquide pur à 99%, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Allemagne), qui catalyse la polymérisation,
- une solution aqueuse de persulfate d'ammonium (poudre de pureté  $\geq 98$  %, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Allemagne), qui initie la réaction *via* la formation de radicaux.

### **2.1.4.2. Elaboration du gel**

L'élaboration d'un gel de polyacrylamide (PAM) consiste donc en un mélange des quatre réactifs cités précédemment, les concentrations et les proportions volumiques des différentes solutions et la masse de TEMED étant des variables ajustables. En effet, les ratios de chaque composant ont un impact direct sur la densité du réseau et donc sur sa rigidité et son élasticité, mais aussi sur la vitesse de polymérisation [Tanaka 1981]. Afin de réaliser un gel, un ordre précis d'ajout des constituants est suivi : ce sont d'abord les acrylamides et bisacrylamides qui sont mélangés, puis ce sont le TEMED, puis les persulfates qui sont ajoutés. Entre chaque ajout, le mixte est homogénéisé par agitation.

Plus de détails sur ces gels sont donnés en début de partie 3.3.2.

## **2.1.5. Biomolécules**

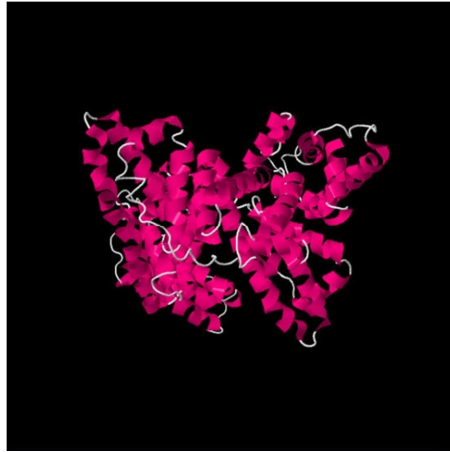
### **2.1.5.1. Protéine**

L'albumine de sérum humain, notée HSA, a été choisie pour servir de protéine modèle pour l'étude du chargement, de la diffusion et de la libération de protéines dans un film multicouche de polyélectrolytes (Chapitre 4). Très présente dans le sang humain où elle représente 55 % de toutes les protéines, cette protéine globulaire a un poids moléculaire de 66 kDa et possède un point isoélectrique de 4.7 (sa structure est décrite sur la figure 2.5) [He & Carter 1992]. C'est sous sa forme marquée à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) qu'elle est utilisée dans cette étude (HSA<sup>FITC</sup> avec 10 moles de FITC par mole de HSA, Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Allemagne).

### **2.1.5.2. Enzymes et substrats enzymatiques**

Les enzymes sont des protéines ayant la capacité de catalyser des réactions chimiques spécifiques. Deux couples « enzyme / substrat enzymatique » sont utilisés durant les expériences décrites au Chapitre 3 :



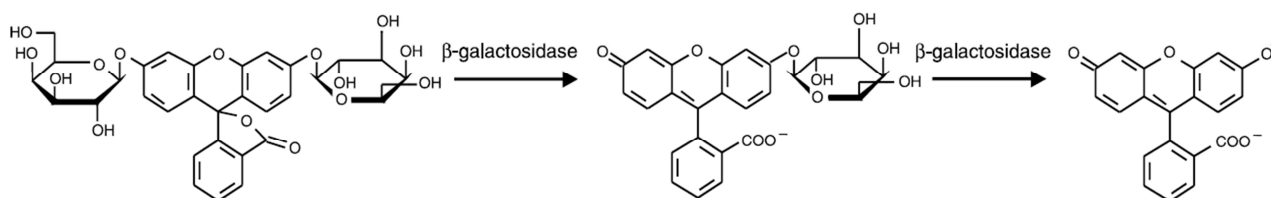


*Figure 2.5 : Structure en trois dimensions de l'albumine de sérum humain (1AO6, RCSB Protein Data Bank).*

- La  $\beta$ -galactosidase (de *Escherichia coli*, poudre partiellement purifiée et lyophilisée, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) (figure 2.6), notée  $\beta$ -GAL, et la fluorescéine di- $\beta$ -D-galactopyranoside (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), notée FDG. Dans ce cas, la  $\beta$ -GAL permet l'hydrolyse de la FDG pour donner séquentiellement la fluorescéine monogalactoside puis la fluorescéine (excitation : 490 nm / émission : 514 nm) (figure 2.7). La  $\beta$ -galactosidase est une protéine tétramérique constituée de 4 sous-unités identiques chacune composée de 1023 acides aminés et formant 5 domaines structuraux. Sa masse moléculaire totale est de 465 kDa. Son point isoélectrique est de 5.5 [Heng & Glatz 1993]. Elle possède quatre sites actifs, principalement situés dans les domaines centraux (3<sup>ème</sup> domaine) de chaque sous-unité [Juers, Jacobson et al. 2000].



*Figure 2.6 : Structure en trois dimensions de la  $\beta$ -galactosidase (1JZ7, RCSB Protein Data Bank).*



**Figure 2.7 :** Schéma réactionnel de l'hydrolyse séquentielle de la fluorescéine di-β-D-galactopyranoside en présence de β-galactosidase. Le premier produit obtenu (molécule du milieu) est la fluorescéine mono-β-D-galactopyranoside (FMG) et la seconde (molécule de droite) est la fluorescéine.

- La phosphatase alcaline (type XXIV de placenta humain, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) (figure 2.8), notée ALP, et la fluorescéine diphosphate (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), notée FDP. La réaction catalytique due à l'ALP consiste en la déphosphorylation de la FDP, qui mène dans un premier temps à la fluorescéine monophosphate, puis dans un deuxième temps à la fluorescéine (figure 2.9). Cette enzyme de 108 kDa est un dimère constitué de deux sous-unités de masse moléculaire 54 kDa et a un point isoélectrique de 6 [Le Du, Stigbrand et al. 2001]. Son site actif est situé dans une poche hydrophobe au milieu des deux sous-unités.

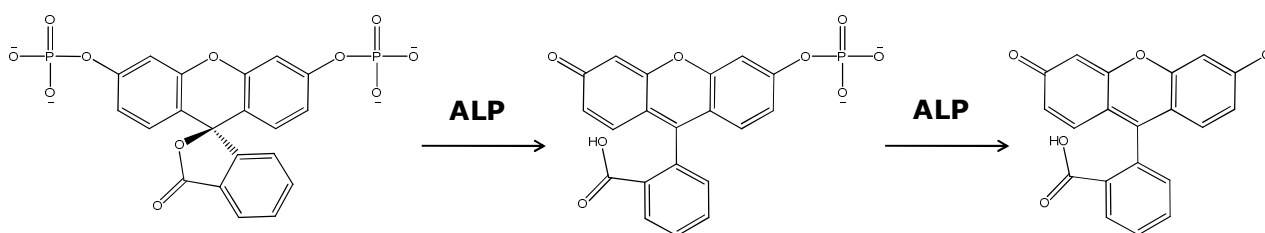


**Figure 2.8 :** Structure en trois dimensions de la phosphatase alcaline (1EW2, RCSB Protein Data Bank).

### 2.1.5.3 Chargement de films

Dans cette thèse, deux types de films sont chargés avec des biomacromolécules : les films multicouches de polyélectrolytes et les gels de PAM. Pour charger les premiers, une solution de concentration fixée est simplement mise en contact du film, afin que les protéines diffusent à l'intérieur. Il apparaît que celles-ci se concentrent au sein de films de polyélectrolytes et y sont

maintenues un certain temps, de par les interactions électrostatiques mises en jeu [Ladam, Gergely et al. 2000]. En ce qui concerne les gels, la méthode de chargement est détaillée dans le Chapitre 3 (partie 3.3.2).



**Figure 2.9 :** Schéma réactionnel de l'hydrolyse séquentielle de la fluorescéine diphosphate en présence de phosphatase alcaline. Le premier produit obtenu (molécule du milieu) est la fluorescéine monophosphate (FMP) et la seconde (molécule de droite) est la fluorescéine.

## 2.1.6. Modifications chimiques de biomolécules ou de polymères

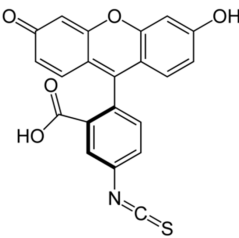
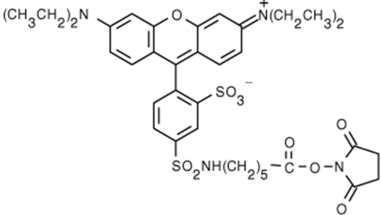
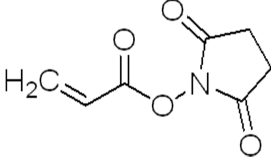
Différentes modifications chimiques d'enzymes ou de polyélectrolytes sont réalisées durant ces études. En particulier, l'ajout d'une sonde fluorescente sur ces molécules permet de les localiser au sein de films avec des techniques telles que la microscopie confocale (voir partie 2.2). A chaque fois, ce sont les amines primaires de polypeptides aminés ou de protéines qui sont sollicités pour réagir. Le tableau (tableau 2.2) ci-dessous détaille les différentes molécules mises en jeu pour les différents types de modifications réalisées.

Ces modifications sont principalement réalisées sur la poly-L-lysine et la  $\beta$ -galactosidase. Dans le cas de la poly-L-lysine, l'expérience est réalisée à pH = 9 environ, de façon à ce qu'elle dispose d'un nombre suffisamment important d'amines primaires non hydrogénées. Pour la  $\beta$ -GAL, le pH du milieu réactionnel est de l'ordre de 8.5.

Pour ce genre de synthèse il faut éviter la formation de produits secondaires. Ainsi, la présence de molécules autres que celles devant être modifiées et disposant d'amines primaires, telles que le TRIS, doit être évitée. Les macromolécules sont donc dissoutes dans une solution exclusivement saline contenant  $\text{NaHCO}_3$  à 0.1 mol/L.

Typiquement, la synthèse est réalisée comme suit : la molécule de marquage/fonctionnalisation est introduite à température ambiante dans la solution de protéines

ou de polypeptides après avoir été dissoute dans un petit volume de DMSO ou de DMF, et le tout est mis sous agitation pendant 1 heure ou plus.

Nom	Schéma	Fournisseur
Fluorescéine isothiocyanate (FITC)		Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France
Ester de succinimide de Rhodamine Red®-X (Rho)		Invitrogen, Cergy Pontoise, France
Ester de succinimide d'acide acrylique		Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France

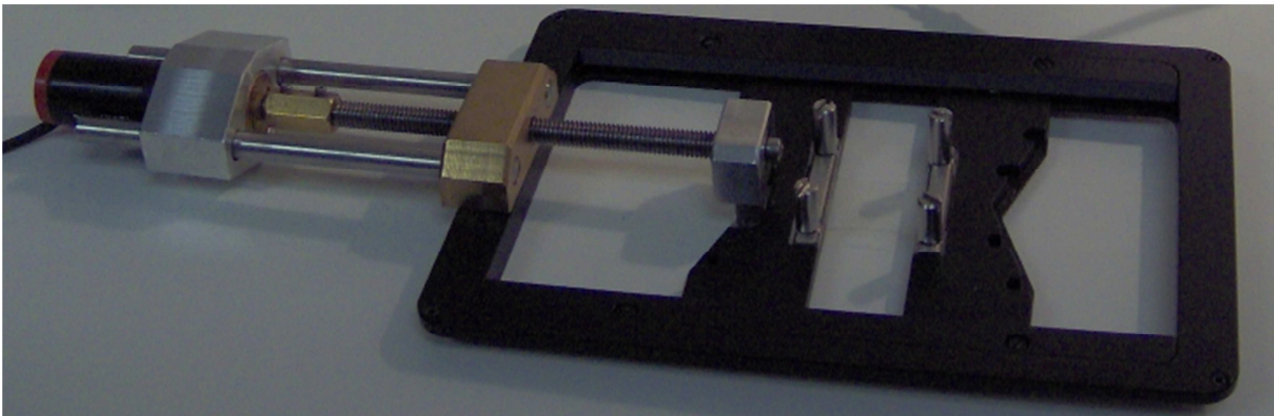
**Tableau 2.2 :** Tableau récapitulatif des molécules utilisées pour les attaques d'amines primaires de polypeptides aminés ou de protéines.

Par ailleurs, les purifications des produits modifiés chimiquement sont réalisées par dialyses successives à une température de 4 °C, à l'aide d'un boudin de dialyse (limite haute des poids moléculaires pouvant traverser la membrane de 8000 à 15000 Da, Spectra Por 7 Dialysis Membrane, Spectrum Europe B.V., Breda, Pays-Bas). Ce boudin est mis en contact avec un grand volume (100 fois plus que le contenu du boudin) de solution saline, renouvelé toutes les 24h. Ce n'est qu'après plusieurs dialyses que le dialysat est remplacé par la solution tampon classique à base de TRIS et de NaCl.

## 2.1.7. Étirement des échantillons construits sur silicones

### 2.1.7.1. Platine d'étirement

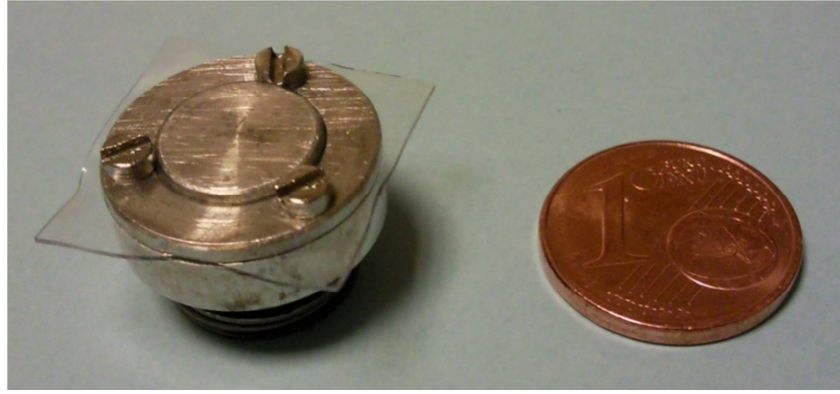
La feuille de PDMS, sur laquelle se trouve le système étudié est fixée à l'aide de mords sur une platine d'étirement (figure 2.10). Celle-ci a été conçue au laboratoire et construite en acier inoxydable. Elle permet d'étirer l'échantillon et de revenir au repos de façon aisée, à l'aide d'une vis et d'un moteur. Ce système d'étirement présente un double avantage : l'échantillon peut rester hydraté, au contact d'une solution tampon, et cet outil est adaptable sur un microscope inversé à épifluorescence ou confocal à balayage laser.



*Figure 2.10 : Photographie de la platine d'étirement adaptée à un microscope inversé (confocal ou à épifluorescence)*

### 2.1.7.2. Observations en microscopie à force atomique

Afin d'imager des échantillons à l'état étiré en microscopie à force atomique (AFM, voir partie 2.2.2.) où l'espace disponible est très restreint, un autre système a été conçu et fabriqué en acier inoxydable (figure 2.11). Celui-ci ne permet pas d'étirer l'échantillon *in situ*, mais seulement de le maintenir à l'état étiré. Ainsi, l'échantillon est d'abord étiré et maintenu en l'état dans la platine précédemment décrite. La partie inférieure du présent système est placée sous la feuille de silicone étirée, puis la partie supérieure est amenée par le dessus afin de plaquer le film de silicone. Les deux parties sont alors vissées l'une à l'autre.



*Figure 2.11 : Photographie du dispositif de maintien d'échantillons en silicone pour AFM.*

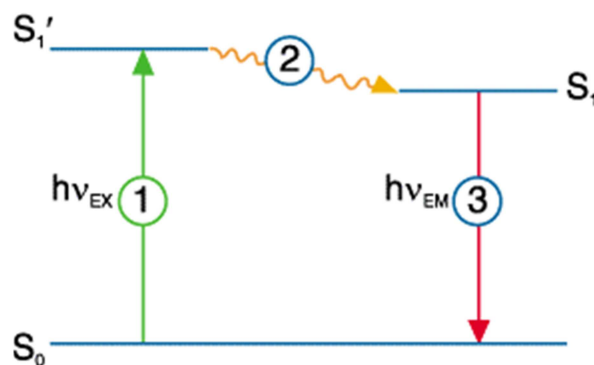
## **2.2. Techniques utilisées durant les expériences**

### **2.2.1. Microscopie confocale à balayage laser**

Il s'agit de la principale technique expérimentale utilisée, pour observer des films marqués avec des agents fluorescents et pour obtenir des sections virtuelles de ces films.

#### **2.2.1.1. Principe de la fluorescence**

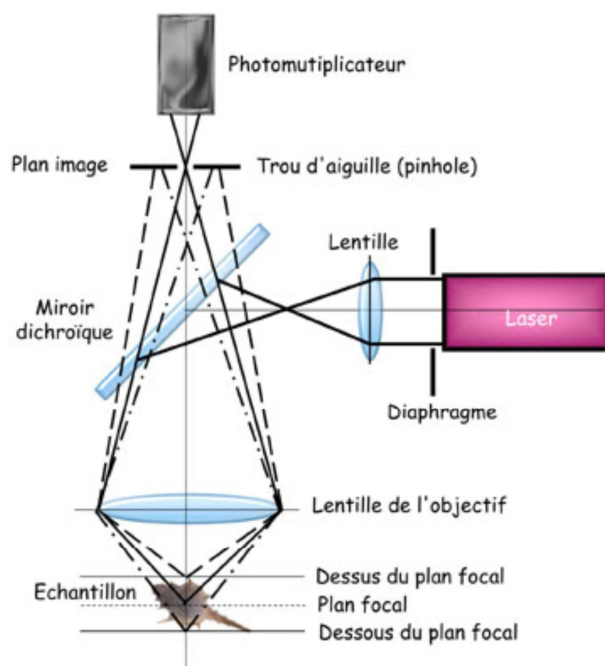
La fluorescence est la propriété d'une molécule à absorber un photon, puis à le réémettre à une longueur d'onde plus élevée (Diagramme de Jablonski, figure 2.12). Soumise à une excitation lumineuse de longueur d'onde donnée, la molécule fluorescente est portée dans un état vibronique excité ( $S_1'$ ). A température ambiante, une partie de l'énergie absorbée est perdue par relaxation vibrationnelle et la molécule se retrouve alors dans un état un peu moins haut en énergie ( $S_1$ ). Le retour de la molécule à son état électronique fondamental ( $S_0$ ) se fait finalement par l'émission d'un photon d'énergie plus faible que l'énergie associée à l'excitation lumineuse, ce qui se traduit par une longueur d'onde d'émission supérieure à la longueur d'onde d'absorption (déplacement de Stokes).



**Figure 2.12 :** Diagramme de Jablonski. La molécule fluorescente initialement à l'état fondamental  $S_0$  absorbe de l'énergie lumineuse (1) et se retrouve à l'état excité  $S_1'$ . Lors de la désexcitation, la molécule perd d'abord de l'énergie par conversion interne (2) (vibrations, chocs moléculaires) et se retrouve à l'état excité d'énergie inférieure  $S_1$  puis subit une transition électronique de l'état  $S_1$  à son état stable  $S_0$  (3). Cette transition correspond à l'émission d'un photon de longueur d'onde plus élevée que la longueur d'onde d'excitation (car l'énergie d'émission est plus faible que celle d'excitation).

### 2.2.1.2. Principe de la technique

Le principe général de la microscopie confocale a été proposé par M. Minsky [Minsky 1961]. 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 épifluorescence (l'excitation se fait au travers de l'objectif). 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) (figure 2.13) est placé en amont du détecteur et ne laisse passer que la lumière en provenance du point focal. Le balayage de l'échantillon en x et y par le laser fournit une image du plan focal. Ce balayage est obtenu à l'aide de miroirs motorisés disposés sur le trajet optique du laser. Pour le balayage 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 et ainsi de reconstituer une structure en trois dimensions. La résolution verticale obtenue peut être de quelques centaines de nanomètres, par exemple pour un objectif ayant une ouverture numérique de 1.4. Cela est particulièrement intéressant pour étudier la structure normale des films multicouches épais (micrométriques) en milieux aqueux [Picart, Mutterer et al. 2002].



*Figure 2.13 : Schéma de principe d'un microscope confocal à balayage laser. La source laser est condensée par l'intermédiaire du miroir dichroïque et de l'objectif en un point focal. La fluorescence 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.*

### 2.2.1.3. Reconstitution d'images

Le faisceau laser se déplace par lignes pour imager un plan (x,y). L'échantillon est également déplacé 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 permet d'imager un plan donné en éliminant les contributions des zones situées au-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 (Carl Zeiss S.A.S., Le Pecq, France).

### 2.2.1.4. Procédure

Le microscope confocal utilisé est de type LSM 510 META (Carl Zeiss S.A.S., Le Pecq, France), monté sur un microscope AxioVert100M (Carl Zeiss S.A.S., Le Pecq, France) associé à des lasers HeNe (543 nm) et Ar (459, 488 et 514 nm). Dans les expériences, les fluorophores couplés aux polyélectrolytes ou aux biomolécules, qui permettent leur localisation, sont la fluorescéine



isothiocyanate (FITC, absorption / émission : 495 nm / 521 nm) ou la rhodamine Red®-X (Rho, absorption / émission : 560 nm / 580 nm).

Pour les films dont au moins l'un des constituants inséré – marqué avec un fluorophore – diffuse à travers l'ensemble de la construction, il est possible de visualiser l'intégralité de l'épaisseur du film. Le microscope confocal utilisé disposant de plusieurs lasers, il est possible d'utiliser sur le même échantillon deux ou trois sondes fluorescentes différentes, afin de localiser les différentes molécules fonctionnalisées avec le fluorophore.

Le logiciel du domaine public Image J (Rasband WS, NIH, Bethesda, Maryland, Etats-Unis, voir la page web "<http://rsbweb.nih.gov/ij/>") est utilisé pour exploiter directement les images des sections. Il permet notamment de calculer la moyenne en niveaux de gris (intensité) à l'intérieur d'une zone rectangulaire de l'image sélectionnée. Cette fonction permet de suivre l'évolution du signal de fluorescence au cours des expériences.

## **2.2.2. Microscopie à force atomique**

### **2.2.2.1. Présentation**

La microscopie à force atomique (AFM, Atomic Force Microscopy) est une microscopie à champ proche. Elle a été développée dans les années 80, en même temps que le microscope à effet tunnel [Binnig, Rohrer et al. 1982] : en effet, l'AFM en est une variante destinée à l'observation de la topographie des surfaces non-conductrices [Binnig, Quate et al. 1986]. Le principe consiste à balayer la surface de l'échantillon avec une pointe et à détecter les interactions entre cette pointe et la surface. L'AFM est ainsi utilisé pour imager des surfaces biologiques avec une résolution latérale (x et y) de l'ordre de la dizaine de nanomètre et normale (en z) de l'ordre de l'Angström [Drake, Prater et al. 1989]. Les évolutions des techniques AFM ont notamment permis la cartographie de diverses propriétés : par exemple, mécaniques [Burnham, Dominguez et al. 1990], électrostatiques et magnétiques [Martin, Williams et al. 1988].

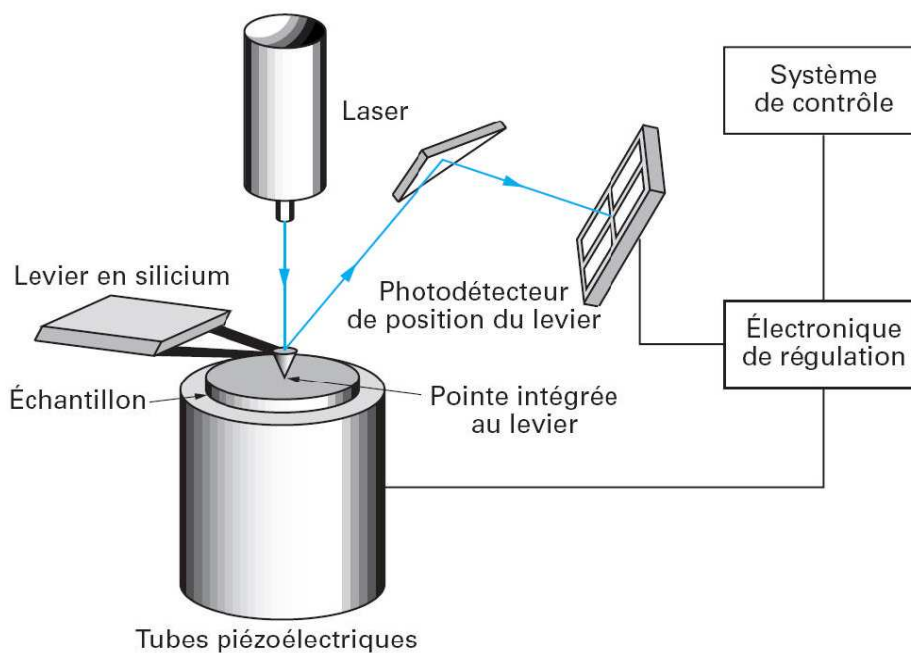
### **2.2.2.2. Principe**

La technique consiste à balayer la surface de l'échantillon avec une sonde fixée à l'extrémité d'un levier à constante de raideur connue, l'ensemble formant le cantilever.

L'échantillon est fixé sur un tube piézo-électrique 3D, qui permet un mouvement dans les 3 dimensions (figure 2.14). Lors du balayage, les interactions de la sonde avec la surface génèrent la déflexion du cantilever. Pour mesurer la déflexion, un faisceau laser est focalisé sur l'extrémité du dos du cantilever, où il est réfléchi vers une photodiode à quatre cadrans. La différence de tension entre les différents quadrants indique alors avec précision la déflexion du cantilever. Cette méthode de mesure de la déflexion présente l'avantage de ne détecter que les variations angulaires du cantilever. En revanche, ce type de mesure est sensible à la dérive thermique et nécessite un temps d'attente afin d'obtenir un signal stable. La loi de Hooke permet de relier la déflexion à la force (F) exercée sur la pointe (formule 2.2.2 - 1).

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

avec  $k_c$  la constante de raideur du cantilever et  $\Delta d$  la déflexion du cantilever.



**Figure 2.14 :** Schéma d'un microscope à force atomique. L'échantillon est fixé sur le tube piézo-électrique. La pointe du cantilever est approchée de la surface. Les interactions entre la pointe et la surface génèrent une déflexion du cantilever qui est mesurée par un faisceau laser. Celui-ci est envoyé sur le dos du cantilever puis est réfléchi sur des photodiodes. Les différences de tension mesurées sur ces photodiodes indiquent la position du cantilever.

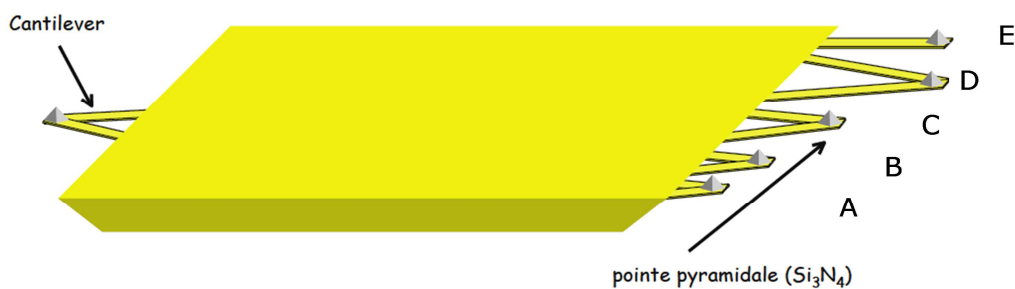
### 2.2.2.3. Obtention de l'image par AFM

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

Dans ce mode, la pointe est maintenue en contact avec la surface de l'échantillon, généralement avec une force constante de l'ordre de 10 nN. Une boucle de rétroaction ajuste en permanence la position en z de l'échantillon à l'aide du déplacement de la céramique piézo-électrique (figure 2.14). Le déplacement vertical (en z) du tube piézo-électrique en fonction de la position (x et y) donne alors l'image topographique de la surface.

### 2.2.2.4. Procédure

La réalisation des images topographiques est effectuée sur un appareillage Nanoscope IIIa (Veeco/Bruker, Santa Barbara, Californie, Etats-Unis) avec des pointes pyramidales montées sur des cantilevers de constante de raideurs variables (figure 2.15). Les observations des films sont réalisées en mode contact à une fréquence de balayage d'environ 2 Hz en utilisant des cantilevers de raideurs  $0.03 \text{ N.m}^{-1}$  (Modèle MSCT-AUHW, Veeco/Bruker).



**Figure 2.15 :** Schéma d'un support de cantilevers à pointes pyramidales de constantes de raideur différentes (Modèle MSCT-AUHW, Veeco). Généralement, seuls les cantilevers C et D à faible raideur sont utilisés pour l'imagerie des films de polymères.

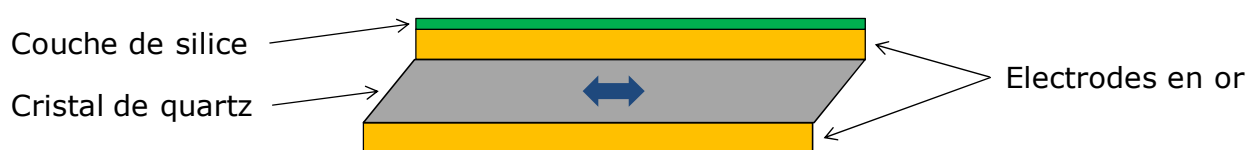
Les observations des films sont réalisées en phase liquide ou à sec. Pour l'observation à sec, les films sont d'abord rincés avec un léger jet d'eau ultra-pure pour éviter la formation de

cristaux salins puis séchés à l'aide d'un léger flux d'air. Les observations en milieu liquide sont réalisées dans la solution utilisée pour le rinçage des films.

## 2.2.3. Microbalance à cristal de quartz

### 2.2.3.1. Principe

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 [Xu & Goodman 1992]. Son principe repose sur les propriétés piézo-électriques du cristal de quartz. En effet le quartz est un matériau qui se déforme sous l'application d'une différence de potentiels électriques et réciproquement une contrainte mécanique entraîne l'apparition d'une polarisation à ses bords. Le cristal se présente sous la forme d'un disque de quartz de 0.3 mm d'épaisseur environ, entouré de deux électrodes en or, l'une d'entre elles étant recouverte de silice (figure 2.16).



*Figure 2.16 : 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 (dans la direction indiquée par la double flèche) au champ électrique appliqué.*

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  $f_r$  définie comme suit :

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

avec  $k$  la constante de raideur du cristal de quartz et  $M$  sa masse. 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 :

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

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

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

où  $C$  est une constante caractéristique de la lame de quartz, appelée constante de Sauerbrey [Sauerbrey 1959] (2.2.3 - 4).

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

Le principe de la microbalance à cristal de quartz consiste à mesurer cette variation de fréquence de résonance  $\Delta f$  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  $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ . De plus, la 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 correspond aussi un changement de fréquence de résonance consécutif au dépôt de matière et  $m$  est relié à  $\Delta f_v$  par la relation de Sauerbrey :

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

Cette relation s'applique de façon approchée, à un dépôt de matériau en milieu liquide [Rodahl, Hook et al. 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 doit être 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. Voinova et al. avaient proposé un premier modèle d'analyse de l'évolution des fréquences et de la dissipation [Voinova, Rodahl et al. 1999]. Ce modèle a été étendu par le Dr. Bernard Senger (INSERM, UMR 977) aux données issues des mesures réalisées avec l'appareillage de QCM-D (Q-Sense). Le programme permet ainsi d'obtenir 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, Chua et al. 2004].

### 2.2.3.2. Appareillage

L'appareil qui a été utilisé est le modèle QCM-D E1 de la marque Q-Sense (Q-Sense AB, Västra Frölunda, Suède). Il comporte un module de mesure (figure 2.17, Q-Sense Flow module 401), thermostaté par un système Pelletier, et une unité électronique reliée à un ordinateur. Ce module a un volume de 140  $\mu\text{L}$  au total, 100  $\mu\text{L}$  de circuit thermostaté à forte conductivité thermique et une chambre au contact du cristal de 40  $\mu\text{L}$ .

Cet appareil fonctionne selon le principe suivant : un générateur de fréquence excite le cristal de quartz avec une tension sinusoïdale de fréquence  $f_i$ . Cette fréquence prend successivement la valeur de la fréquence fondamentale de résonance de la lame (5 MHz) et de ses harmoniques (15, 25, 35, 45, 55 & 65 MHz). L'excitation du cristal est imposée sur une durée très brève (quelques  $\mu\text{s}$ ). Après arrêt de l'excitation, pour chaque résonance ( $\nu = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13$ ), 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. Lors de l'arrêt de la phase d'excitation, ces oscillations sont amorties, comme cela est représenté sur la figure 2.18. 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 7 fréquences d'excitation (5, 15, 25, 35, 45, 55 et 65 MHz). Cette dissipation renseigne en principe sur les propriétés viscoélastiques des films.

### **2.2.3.3. Procédure**

La QCM-D est utilisée pour suivre la construction de multicouches de polyélectrolytes, ainsi que l'adsorption ou l'absorption de molécules par les films précédemment construits.

Les cristaux utilisés sont du type QSX 303 (Q-Sense) : ceux-ci sont recouverts d'un film de SiO<sub>2</sub> de 100 nm d'épaisseur et ils possèdent une fréquence fondamentale de résonance à 5 MHz et des harmoniques à 15, 25, 35, 45, 55 & 65 MHz. La construction d'un film multicouche de polyélectrolytes se fait dans la chambre de mesure de l'appareil QCM-D où se trouve le cristal de quartz. Tout d'abord, la solution de polycations est injectée à l'aide d'une pompe, en continu pendant la durée de dépôt souhaitée dans un circuit thermostaté à 25°C, menant directement à la chambre. L'opération est ensuite répétée avec la solution de rinçage, puis avec la solution de polyanions. Les étapes d'injection et de rinçage sont alors poursuivies jusqu'à obtenir le nombre de couches voulu.

Le logiciel QSoft 401 permet de suivre l'évolution des fréquences et des valeurs de dissipation durant les expériences de construction.

## **2.2.4. Méthodes de dosage**

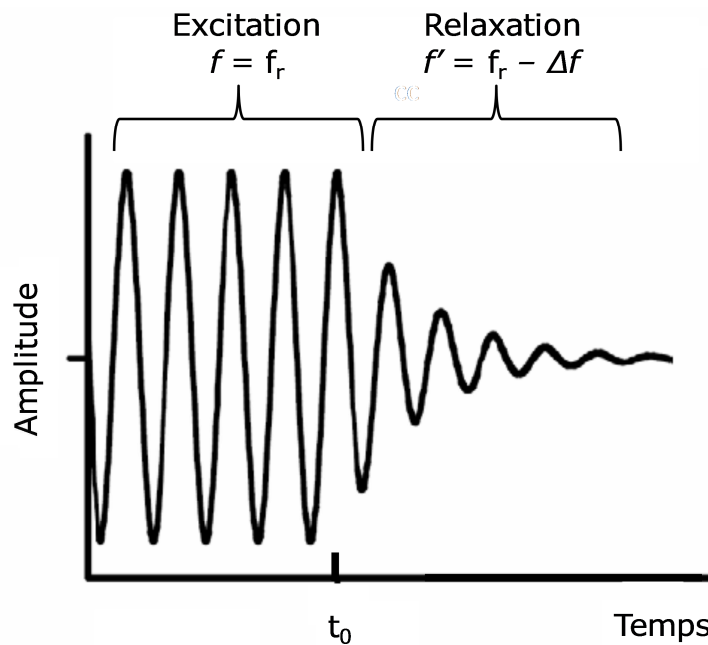
Usuellement, le dosage de molécules fluorescentes au sein de films et dans leur surnageant, peut être réalisé directement, en réalisant à différents temps des coupes virtuelles à l'aide du microscope confocal. Typiquement, l'intensité de la fluorescence de la fluorescéine (excitation 490 nm, émission 520 nm) est suivie dans le surnageant d'échantillons, directement sous le microscope confocal.

### **2.2.4.1. Dosage de molécules fluorescentes en solution**

Dans le cas de concentrations en fluorophores particulièrement basses, le microscope n'est pas assez sensible, car le rapport signal sur bruit devient proche de 1. Ainsi, un fluorimètre de type Bio-Rad Versafluor™ (Marnes-la-Coquette, France), dont le gain est réglé au maximum, est utilisé pour mesurer l'intensité de fluorescence de certaines solutions faiblement concentrées. Cet appareil dispose d'une lampe fluorescente de spectre large ainsi que de filtres, qui permettent de



**Figure 2.17 :** photographie du module Q-Sense Flow module 401. La vue de gauche correspond à une vue extérieure. Celle de droite correspond à une vue du module ouvert. On y voit la face préservée du cristal équipé d'électrodes. L'autre face du cristal, non visible ici, est celle qui reçoit les dépôts.



**Figure 2.18 :** 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 ( $f = f_r$ ). Seconde phase ( $t > t_0$ ) : étude de la relaxation du cristal avec obtention de la nouvelle fréquence de résonance ( $f' = f_r - \Delta f$ ) et du facteur de dissipation visqueuse ( $D$ ) relié à la constante d'amortissement.



réduire la lumière incidente à une raie à 490 nm (largeur 10 nm), et, après émission, de récupérer sur le détecteur une raie à 520 nm (largeur 10 nm).

Afin de rapporter l'intensité mesurée à une concentration, une courbe d'étalonnage doit être réalisée, à l'aide de solutions des molécules concernées préparées à des concentrations connues.

#### **2.2.4.2. Dosage de molécules au sein de film par absorption UV/visible**

Dans le cas d'une très large gamme de concentrations à mesurer, là encore, le microscope confocal a ses limites. En effet, pour un réglage donné du microscope (intensité de laser, gain, ...), il est parfois impossible de pouvoir mesurer un signal significatif pour la plus petite concentration d'une gamme tout en ne saturant pas les mesures pour la concentration la plus élevée.

Ainsi, pour mesurer la concentration de protéines marquées dans des films chargés à partir de solutions de concentrations différentes, un spectroscope UV/visible mc<sup>2</sup>, de marque Safas (Monaco, Principauté de Monaco) est utilisé. Les films concernés sont préalablement déposés sur des lamelles de quartz, transparentes à ces longueurs d'onde, puis chargés avec la protéine. Ensuite, une de ces lamelles est placée perpendiculairement à la direction du faisceau, et un spectre d'absorption entre 200 et 700 nm est réalisé, afin de déterminer le maximum d'absorption du marqueur fluorescent (les autres pics d'absorption étant grandement influencés par les polypeptides contenus dans les films étudiés). La longueur d'onde d'excitation est fixée (maximum d'absorption), et la valeur de l'absorption est mesurée pour chacune des lamelles préparées, sachant que celles-ci sont recouvertes de part et d'autre de films.

Afin de pouvoir convertir les absorptions mesurées en concentrations, il faut déterminer le coefficient d'extinction molaire, à la longueur d'onde concernée, de la protéine marquée. Pour cela, des solutions de concentrations connues sont testés, afin de pouvoir tracer la concentration en fonction de l'absorption, ce qui donne, en prenant en compte l'épaisseur de la solution, le coefficient désiré.

## 2.2.5 Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment

### 2.2.5.1. Présentation

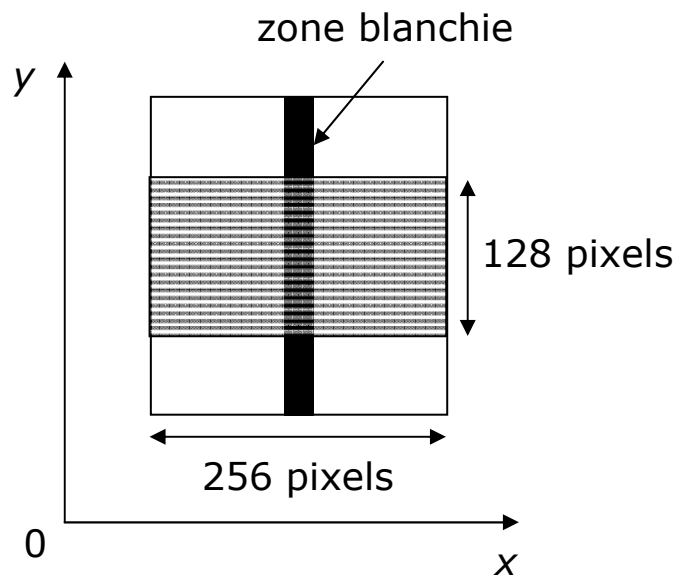
Une méthode pour mettre en évidence et quantifier la mobilité de molécules dans un milieu consiste à réaliser des expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP), en utilisant des molécules marquées préalablement avec des fluorophores.

Cette méthode a été développée il y a trente-sept ans par Peters et al. [Peters, Peters et al. 1974]. Axelrod et al. ont montré comment elle peut être mise à profit pour estimer quantitativement la valeur du coefficient de diffusion d'une espèce marquée [Axelrod, Koppel et al. 1976]. Cette technique a par exemple été utilisée pour étudier la diffusion de PLL<sup>FITC</sup> au sein de films PLL/HA [Picart, Mutterer et al. 2005; Jourdainne, Lecuyer et al. 2008] ou encore la diffusion de protéines dans des films poly(allylamine) / poly(styrène sulfonate) [Szyk, Schaaf et al. 2001; Szyk, Schwinté et al. 2002].

### 2.2.5.2. Protocole expérimental

La méthode de FRAP qui est utilisée pour étudier la mobilité de protéines fluorescentes dans des films multicouches de polyélectrolyte est celle qui consiste à blanchir (« tuer » la fluorescence) partiellement une zone unique de l'échantillon et de suivre l'évolution dans le temps du recouvrement de la fluorescence. Celle-ci est réalisée avec le microscope confocal [Gribbon & Hardingham 1998], ce qui permet également d'avoir les images de l'échantillon dans le temps.

Pour réaliser les expériences, aucune reconstitution d'image n'est nécessaire et ce sont uniquement des images du plan parallèle à la surface ((x,y), voir figure 2.19) qui sont réalisées à mi-hauteur des films. Celles-ci, d'une résolution de 256 pixels × 256 pixels, sont réalisées avec un objectif ×10 d'ouverture numérique de 0.3, et avec un zoom numérique fixé à 3× ou 6×, ce qui correspond à des images de taille 300 μm ou 150 μm.



**Figure 2.19 :** Vue schématique d'une image carrée acquise au microscope confocal (côté de longueur 150 ou 300  $\mu\text{m}$ ) contenant un rectangle partiellement blanchi (10 ou 20 pixels de large; noir). Même immédiatement après le photoblanchiment, les contours du rectangle ne sont en réalité pas aussi bien définis qu'il est suggéré, à cause de la diffusion des molécules fluorescentes durant le blanchiment (effet appelé « effet corona » [Weiss 2004]). Quelques lignes le long desquelles le profil d'intensité de fluorescence est enregistré sont indiquées (lignes parallèle à la direction  $0x$ ).

Une première image est réalisée en faisant en sorte que : 1) l'intensité de fluorescence de l'image ne soit ni trop basse ni trop haute ; 2) le temps d'acquisition nécessaire soit le plus court possible ; 3) l'intensité de laser utilisée pour l'excitation ne soit pas trop importante pour éviter de blanchir les zones fluorescentes durant l'acquisition d'images, ceci, tout en ayant un bon rapport signal sur bruit.

Ensuite, l'échantillon est blanchi en son centre, sur toute sa profondeur, de sorte que sur l'image d'un plan  $(x,y)$ , la forme créée soit un rectangle. Ce blanchiment est réalisé avec une puissance dédiée du laser élevée et sur une durée maximale de 10 secondes, de façon à avoir un bon contraste entre la zone blanchie et celle préservée. La largeur du rectangle (selon  $y$ ) est fixée à 10 ou 20 pixels, alors que la longueur est toujours fixée à la longueur maximale, à savoir 256 pixels. La fin du blanchiment (détectable visuellement) constitue le temps zéro de l'expérience de recouvrement.

A partir de là, une série d'images est réalisée en conservant exactement tous les réglages de la première. Typiquement une douzaine d'images sont acquises sur une durée de 10 à 15 minutes.

### 2.2.5.3. Exploitation des images

Les images sont ensuite analysées à l'aide d'une macro exécutée avec le logiciel "Image J" (Rasband WS, NIH, Bethesda, Maryland, Etats-Unis, voir la page web "<http://rsbweb.nih.gov/ij>"). Pour chaque image, c'est-à-dire pour chaque temps post-blanchiment, le profil d'intensité de fluorescence est déterminé le long des 128 lignes centrales de 1 pixel de large chacune, perpendiculaires au côté long du rectangle blanchi (soit parallèles à l'axe 0x) (figure 2.18). Les 128 lignes restantes de part et d'autre de celles-ci (64 et 64) ne sont pas prises en compte pour éviter les effets de bord dus à la diffusion de molécules *via* le petit côté du rectangle blanchi. Le profil représentatif d'une image peut finalement être obtenu en faisant la moyenne des 128 profils obtenus comme décrit précédemment.

La méthode de traitement des profils recueillis, qui permet d'obtenir des informations sur la diffusion et qui sera décrite dans le chapitre 4, utilise les 128 profils sans faire la moyenne des intensités de fluorescence.

# **Chapitre 3 :**

## **Revêtements polymériques biocatalytiques mécanosensibles**

### **3.0. Introduction**

### **3.1. Revêtements mécanotransductifs pour l'activation réversible d'une biocatalyse**

3.1.1. Résumé

3.1.2. Article publié (en anglais)

### **3.2. Plateformes enzymatiques tout-en-un induisant une libération « réactive » par étirement**

3.2.1. Résumé

3.2.2. Résultats (en anglais)

### **3.3. Systèmes polymériques manipulables pour l'étirement d'enzymes à l'échelle moléculaire**

3.3.1. Films multicouches réticulés

3.3.2. Gels de polyacrylamide

## 3.0. Introduction

Dans ce chapitre, trois études relatives à trois revêtements polymériques biocatalytiques mécanosensibles sont abordées. Le principal objectif visé est d'élaborer des revêtements sensibles à l'étirement dont la capacité à catalyser certaines réactions chimiques peut être modulée par ce biais. Dans tous les cas étudiés, les propriétés biocatalytiques sont issues de la fonctionnalisation des matériaux par des enzymes. A chaque fois, les réactions enzymatiques ont pu être suivies *in situ* par des techniques optiques, car les substrats mis en jeu sont des fluorogènes, c'est-à-dire qu'ils se transforment en molécules fluorescentes grâce aux enzymes.

Une première partie traite d'un système réservoir / barrière construit couche-par-couche à base de polyélectrolytes et contenant des enzymes, dont la biocatalyse intrinsèque peut être activée par étirement.

Une deuxième partie présente un système similaire mais contenant à la fois les enzymes et leurs substrats, de façon à induire une libération des produits de la réaction sous étirement.

La dernière partie de ce chapitre décrit les solutions proposées au problème suivant : serait-il possible de moduler une réaction biocatalytique en manipulant localement des enzymes – pour les déformer – via une action macroscopique ? En plus d'une solution impliquant des films multicouches de polyélectrolytes, une façon alternative d'aborder le problème basée sur l'élaboration d'hydrogels est proposée.

## 3.1. Revêtements mécanotransductifs pour l'activation réversible d'une biocatalyse

### 3.1.1. Résumé

Cette partie traite de l'élaboration d'un film multicouche de polyélectrolytes constitué d'un réservoir PLL/HA chargé avec de la phosphatase alcaline et recouvert d'une barrière PDADMA/PSS (détails sur les produits utilisés et la construction de films dans la partie 2.1). Au repos, cette dernière empêche tout échange de molécules entre le réservoir et l'extérieur du film. Les molécules de FDP, présentes dans la solution surnageante mise en contact avec le film durant les expériences, ne peuvent notamment pas traverser la barrière et atteindre les enzymes.

Une expérience de microbalance à cristal de quartz a d'abord été réalisée pour montrer la construction du film PLL/HA mais surtout le phénomène d'adsorption d'une enzyme, la phosphatase alcaline, dans celui-ci. Une section virtuelle du film PLL/HA chargé par les enzymes marquées avec de la rhodamine (détails sur la synthèse dans la partie 2.1.6) a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser. Cela a permis de montrer que l'enzyme s'adsorbe et diffuse à travers toute l'épaisseur du film PLL/HA.

Le substrat enzymatique utilisé est la FDP (fluorescéine di-phosphate) qui est non fluorescente. Lorsqu'elle réagit avec l'enzyme, le produit résultant est la fluorescéine, très fortement fluorescente (émission de fluorescence dans le vert). Au contact d'une solution de FDP, le film PLL/HA (sans barrière) et fonctionnalisé avec l'enzyme devient fortement vert indiquant que :

- sans barrière, la FDP pénètre dans le réservoir PLL/HA,
- et la FDP est transformée en fluorescéine sous l'action des enzymes enfouies car les enzymes conservent leur activité après insertion dans le film PLL/HA.

Par contre, si une barrière PDADMA/PSS est construite sur le film PLL/HA contenant l'enzyme, cela n'entraîne aucune désorption d'enzymes et aucune réaction n'a lieu lors de la mise au contact du film avec une solution de FDP.

Lorsque ce film, construit sur une feuille de silicone, est étiré au-delà d'un taux de 70 %, une forte émission de fluorescence apparaît en surface du film et dans le surnageant indiquant

que la réaction biocatalytique se produit à l'interface barrière/solution. Ce processus se déroule sans que la FDP ni la fluorescéine produite ne pénètrent dans le réservoir PLL/HA. Le fait d'augmenter davantage le taux d'étirement ne change rien au résultat : l'intensité du saut de fluorescence est la même pour un taux d'étirement supérieur à 70%.

Des expériences complémentaires ont permis de montrer que la brièveté de la production de fluorescéine, et donc de la biocatalyse, est due à un mécanisme de rétro-inhibition des enzymes : les produits de la réaction, notamment les ions phosphates, sont rapidement surconcentrés à proximité des sites actifs de l'enzyme et inhibent toute nouvelle réaction catalytique.

Afin d'esquisser un mécanisme hypothétique, le système a été caractérisé au repos, à l'état étiré, et au retour, par microscopie à force atomique : aucune fissure et aucun pore n'a pu être visualisé. De plus, une expérience d'immunodétection des enzymes en surface a été mise en œuvre. Celle-ci a validé la seule explication envisageable : l'application d'un étirement sur ce film enzymatique permet d'exposer les enzymes en surface de la barrière et de les rendre accessibles aux substrats enzymatiques présents dans le surnageant.

L'étude a ensuite consisté à déterminer l'influence d'une augmentation du nombre de paires de couches PDADMA/PSS de la barrière, jusqu'ici fixé à 6 – valeur minimale pour avoir un véritable effet barrière. Plus ce nombre est augmenté, plus le saut de fluorescence est faible et probablement la quantité d'enzymes exposées est faible.

Enfin, ce système est particulièrement intéressant car il est réversible. En effet, il a été démontré qu'il est possible d'exposer et de ré-enfouir réversiblement des enzymes. Cependant, une fois le premier étirement critique effectué, il est indispensable de rincer la surface à l'état étiré, afin de pouvoir rincer les produits de la réaction qui inhibent les enzymes, avant de revenir à l'état de repos pour réaliser une nouvelle catalyse par étirement.

### **3.1.2. Article publié :** ***Mechanotransductive surfaces for reversible biocatalysis activation***

Cette partie constitue une publication du journal *Nature Materials*, soumise au droit d'auteur et non reproductible sans autorisation des auteurs ou du *Nature Publishing Group*, dont



la référence est : Mertz, D., Vogt, C., Hemmerle, J., Mutterer, J., Ball, V., Voegel, J.-C., Schaaf, P. & Lavalle, P. "**Mechanotransductive surfaces for reversible biocatalysis activation.**" *Nature Materials* 8(9): 731-735 (2009), DOI: 10.1038/nmat2504. Les numéros des figures ont été modifiés pour une meilleure lisibilité de la thèse.

### **3.1.2.1. Abstract**

Fibronectin, like other proteins involved in mechanotransduction, has the ability to exhibit recognition sites under mechanical stretch [Gao, Craig et al. 2003; Smith, Gourdon et al. 2007; Vakonakis, Staunton et al. 2007]. Such cryptic sites are buried inside the protein structure in the native fold and become exposed under an applied force [Vogel & Sheetz 2006], thereby activating specific signalling pathways [Vogel 2006]. Here, we report the design of new active polymeric nanoassembled surfaces that show some similarities to these cryptic sites. These nanoassemblies consist of a first polyelectrolyte multilayer [Decher 1997] stratum loaded with enzymes and capped with a second polyelectrolyte multilayer acting as a mechanically sensitive nanobarrier. The biocatalytic activity of the film is switched on/off reversibly by mechanical stretching, which exposes enzymes through the capping barrier, similarly to mechanisms involved in proteins during mechanotransduction. This first example of a new class of biologically inspired surfaces should have great potential in the design of various devices aimed to trigger and modulate chemical reactions by mechanical action with applications in the field of microfluidic devices or mechanically controlled biopatches for example.

### **3.1.2.2. Main content**

Many proteins involved in mechanotransduction processes share the ability to exhibit specific active peptide sequences when denatured or extended by external forces [Vogel 2006]. Cryptic sites are peptide sequences of these proteins buried in the native fold and force-regulated cryptic sites represent an effective system to convert a mechanical force into a biochemical signal to activate specific signalling pathways. Various routes lead to the exposure of cryptic sites, including conformational changes along complex unravelling pathways. Fascinated by the solutions that nature has developed to transform mechanical forces into chemical processes and with the goal of creating mechanically responsive surfaces, we designed biologically inspired assemblies mimicking this process. We investigated whether nanoassemblies such as

polyelectrolyte multilayer architectures can be tailored to create active surfaces that induce an enzymatic catalysis by applying a mechanical force, namely surface stretching. However, processes occurring in polyelectrolyte multilayer architectures will differ in terms of scale from mechanisms occurring in proteins, although the induction of specific reactions by stretching is a similar cause–consequence effect. In our system, biocatalytic activation will not result from a change in enzyme conformations during stretching but from an unmasking of enzymes by stretching, rendering the enzymes accessible for their substrate in the solution.

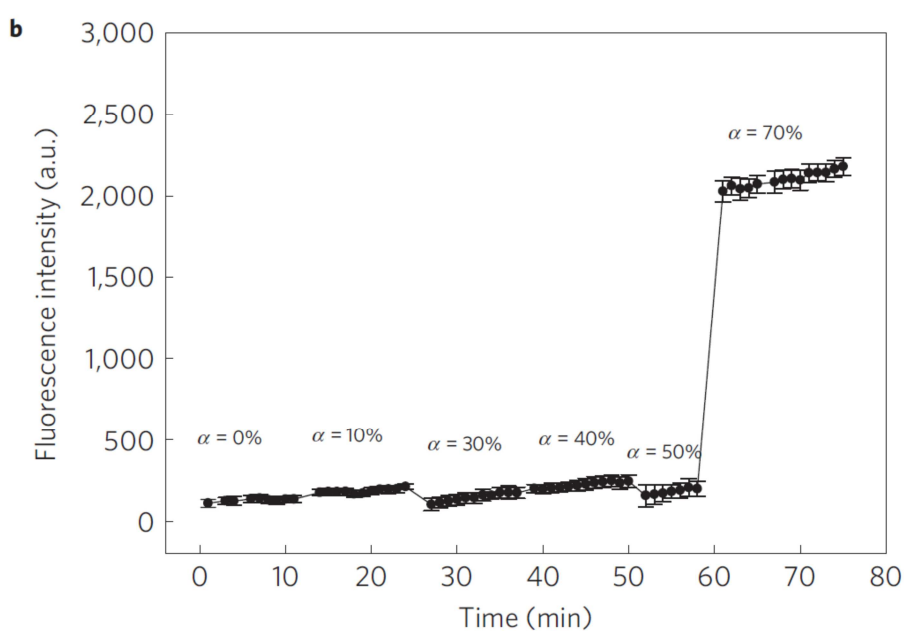
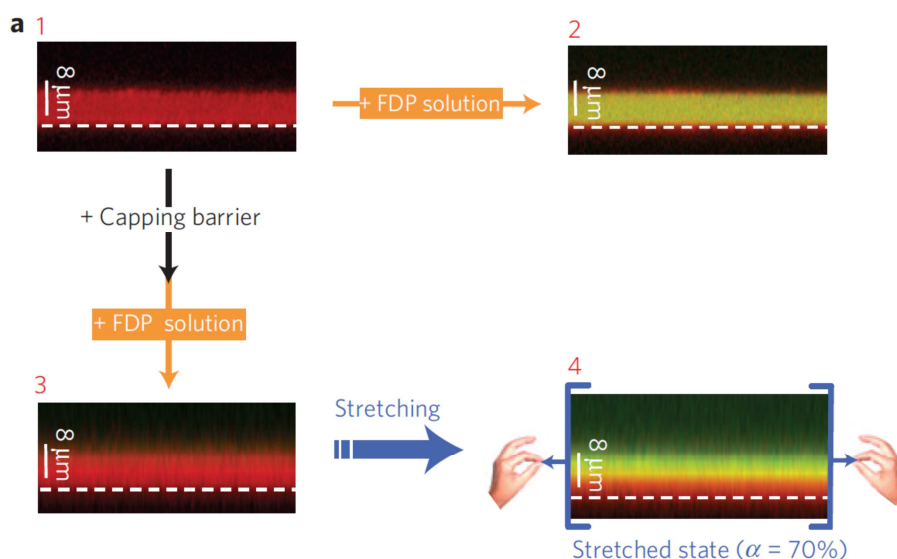
'Polyelectrolyte multilayers' is a generic term for films constructed by the self-assembly of polyanions and polycations through the layer-by-layer technique [Decher 1997]. Widespread applications involve the layer-by-layer technique, ranging from material science [Hiller, Mendelsohn et al. 2002; Jiang, Markutsya et al. 2004; Lee, Cho et al. 2007; Podsiadlo, Kaushik et al. 2007] to the biological domain [Tang, Wang et al. 2006; Wood, Chuang et al. 2006]. Two types of polyelectrolyte multilayer film have been demonstrated: those in which the thickness and mass increase linearly with the number of deposition steps and those in which they grow exponentially [Picart, Mutterer et al. 2002]. The latter films act as micro-containers or reservoirs for active compounds such as drugs, peptides or enzymes that can be loaded at controlled doses wherein their activity is fully maintained. Moreover, active compounds confined in these reservoirs can diffuse through the whole structure and thus keep a major degree of freedom, despite them being embedded in the polymeric matrix. On the other hand, linearly growing films are much denser nanoassemblies than exponentially growing ones. When deposited on top of exponentially growing films, these nanometre-thick multilayers form a capping layer acting as a barrier, preventing the diffusion of polyelectrolytes, biomolecules and even small ions from the solution to the reservoir [Garza, Schaaf et al. 2004]. Alternation of 'exponential' and 'linear' multilayers can lead to multiple strata and compartmentalized films with reservoirs loaded with various active molecules.

Recently, we demonstrated that some barriers capping an exponentially growing multilayer film deposited on silicone sheets can be rendered permeable reversibly by stretching [Mertz, Hemmerlé et al. 2007]. Here, we develop similar types of architecture that remain impermeable during the stretching but where the mechanical force activates a catalysis, namely an enzymatic activity. (PLL/HA)<sub>n</sub> (PLL: poly-(L-lysine), HA: hyaluronic acid) exponentially growing multilayers are used as reservoirs and are capped with the linearly growing multilayers

(PDADMA/PSS)<sub>m</sub> (PDADMA: poly(diallyldimethylammonium); PSS, poly(sodium 4-styrenesulphonate)); *n* and *m* stand for the number of polyanion/polycation deposition cycles. Alkaline phosphatase (ALP) is a hydrolase enzyme responsible for dephosphorylation of many types of molecule, including fluorescein diphosphate (FDP). ALP is widely used in various biological assays such as immunoassays or diagnostics based on enzyme-linked immunosorbent assays, and ALP levels are also monitored in blood to predict breast or bone cancers. FDP is a non-fluorescent substrate and hydrolysis of its two phosphate substituents mediated by ALP yields weakly fluorescent fluorescein monophosphate followed by strongly fluorescent fluorescein.

Here, FDP hydrolysis catalysed by ALP is used as a model enzymatic reaction. To check embedding of ALP in (PLL/HA)<sub>n</sub> reservoirs, the build-up process of PLL/HA multilayer films and adsorption of enzymes during the sequence were monitored in situ by a quartz crystal microbalance (see Supplementary Fig. 3.5). Moreover, a cross-section of a reservoir loaded with enzymes [(PLL/HA)<sub>15</sub>/PLL/ALP<sup>Rho</sup>/(PLL/HA)<sub>15</sub> film] (ALP<sup>Rho</sup>: rhodamine-labelled ALP leading to red fluorescence emission) is observed with a confocal microscope (Fig. 3.1a, image 1). This reservoir (8 μm thick) appears entirely and homogeneously coloured in red, indicating that ALP diffuses through the whole PLL/HA reservoir and the entire film is loaded with ALP. No release of ALP from the reservoir to the solution is observed. Deposition of a (PDADMA/PSS)<sub>6</sub> capping layer on top of this film does not lead to desorption of enzymes from the reservoir, which remains homogeneously loaded (Fig. 3.1a, image 3).

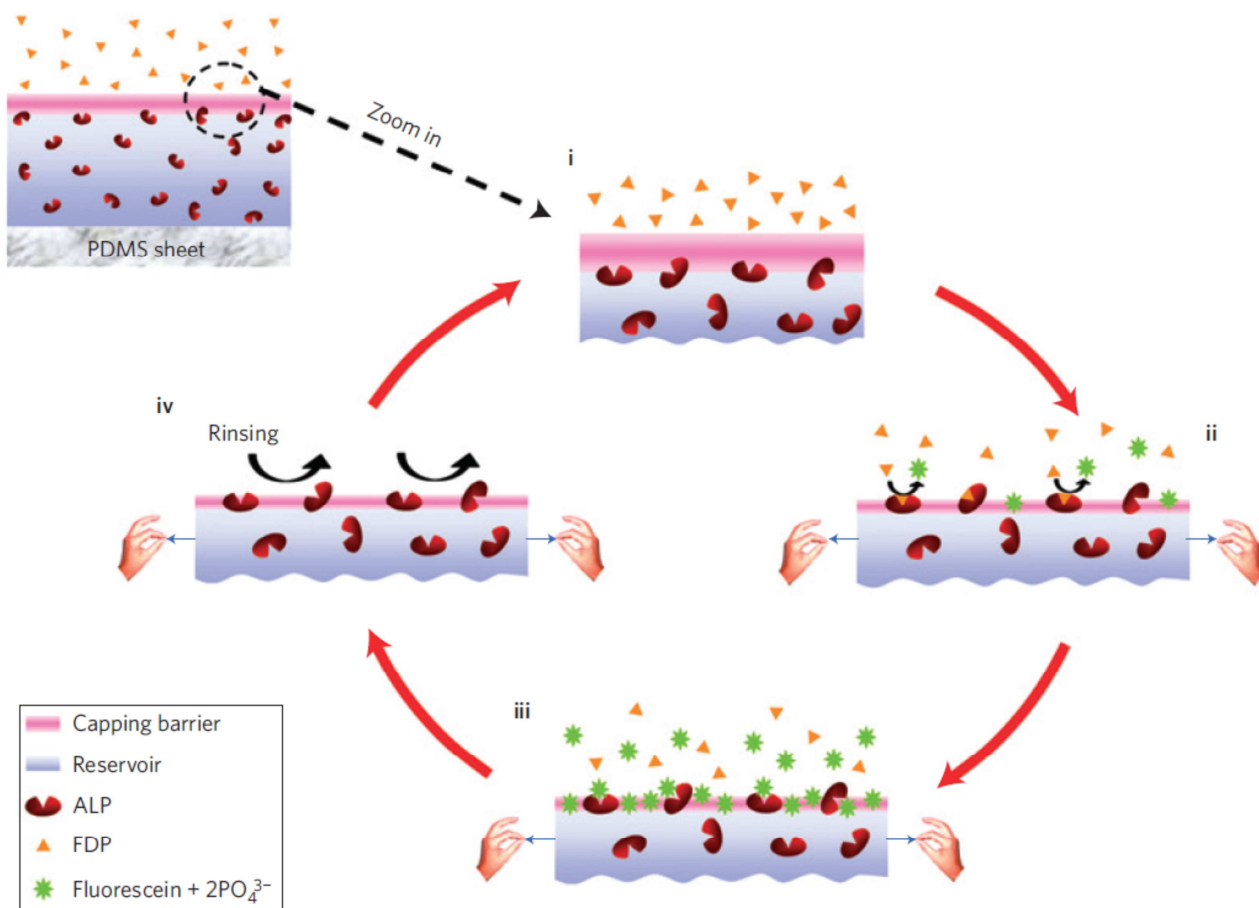
These multilayer architectures are built on a silicone sheet, which can be stretched owing to its elastic properties. When the enzymatic reservoir without PDADMA/PSS capping [(PLL/HA)<sub>15</sub>/PLL/ALP<sup>Rho</sup>/(PLL/HA)<sub>15</sub> film] is in contact with a non-fluorescent FDP solution, the entire film section becomes yellow (combination of green and red) (Fig. 3.1a, image 2). Embedded ALP thus remains active in the multilayer, and FDP molecules diffuse in the entire PLL/HA reservoir and are hydrolysed resulting in the production of fluorescein with green fluorescence emission. On the other hand, when the enzymatic reservoir is capped with PDADMA/PSS layers [(PLL/HA)<sub>15</sub>/PLL/ALP<sup>Rho</sup>/(PLL/HA)<sub>15</sub>/(PDADMA/PSS)<sub>6</sub> film], FDP molecules brought in contact with the film are not hydrolysed in the unstretched state. Indeed, only very weak fluorescence, corresponding to the weak background of the FDP commercial solution, is monitored in solution (Fig. 3.1a, image 3). This proves that FDP does not diffuse through the (PDADMA/PSS)<sub>6</sub> capping



**Figure 3.1:** (a) Confocal microscope section ( $x,z$ ) images of silicone sheets with multilayer films loaded with enzymes. Images 1 and 2: Enzymatic reservoir [(PLL/HA)<sub>15</sub>/PLL/ALP<sup>Rho</sup>/(PLL/HA)<sub>15</sub> film] in buffer solution (image 1) and in contact with FDP solution (image 2). Image 3: Reservoir loaded with enzymes and capped with a barrier, [(PLL/HA)<sub>15</sub>/PLL/ALP<sup>Rho</sup>/(PLL/HA)<sub>15</sub>/(PDADMA/PSS)<sub>6</sub> film], in contact with FDP solution, demonstrating no activation of biocatalysis. Image 4: The film shown in image 3 once a stretching of  $\alpha=70\%$  is applied: biocatalysis is activated. The dashed lines indicate interfaces between silicone sheets and multilayer films. (b) Evolution with time of fluorescence intensity measured in solution above the reservoir loaded with enzymes and capped with a barrier [(PLL/HA)<sub>15</sub>/PLL/ALP<sup>Rho</sup>/(PLL/HA)<sub>15</sub>/(PDADMA/PSS)<sub>6</sub> film] in contact with FDP solution and for various stretching steps ranging from  $\alpha=0\%$  to  $70\%$ . The error bars correspond to standard deviations calculated from image analyses.

and thus the hydrolysis reaction, catalysed by ALP, does not take place.

The silicone sheet coated with the enzymatic reservoir and the capping barrier is then progressively stretched and in situ sections of the film and solution are observed by confocal microscopy. Once a critical stretching degree of 70% is reached, an immediate and strong jump of green fluorescence is visualized in the very top part of the film and in solution (Fig. 3.1a, image 4). This indicates that enzymatic catalysis is triggered by the applied stretching and that it takes place only at the level of the barrier and not in the entire reservoir (see Supplementary Fig. 3.6). Indeed, the barrier remains tight to FDP even under stretching. Atomic force microscope (AFM) observations of the barrier–solution interface clearly indicate that the stretching step does not induce pore or crack formation (see Supplementary Fig. 3.7). As for recognition sites in mechanotransductive proteins, enzymes become accessible for the substrates under stretching (see Fig. 3.2, steps i and ii for a schematic representation of the proposed mechanism). The evolution of the fluorescence intensity in solution is measured as a function of time for several stretching degrees (Fig. 3.1b). Below a critical stretching degree of 70%, a very weak level of fluorescence is observed without any significant variations on stretching. The jump of fluorescence (of around 2,000 a.u.) is clearly identified for a stretching degree of 70%. Above the critical stretching degree of 70%, further stretching of the film leads to the same high fluorescence levels ('fluorescence plateau') (see Supplementary Fig. 3.8). The fluorescence jump corresponds to a very efficient hydrolysis of FDP molecules with rapid diffusion of fluorescein in the solution. However, concomitantly with this jump of fluorescence in solution, the top of the film becomes intensely green (Fig. 3.1a, image 4), indicating that a fraction of the produced fluorescein is probably adsorbed on or embedded in the PDADMA/PSS barrier in the vicinity of the enzymes. The concentration of phosphate ions produced during hydrolysis should also locally increase in the barrier. This probably leads to a feedback inhibition process of enzymes and explains why, after the jump, a fluorescence plateau is observed when the film is stretched above the critical stretching degree (Fig. 3.1b). To confirm this hypothesis, we carried out similar experiments but with FDP solutions containing  $2 \times 10^{-2}$  M (100 equivalents) of phosphate ions ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (see Supplementary Fig. 3.9). Stretching of the film above 70% resulted then only in a very slight increase in fluorescence, proving that high phosphate concentrations inhibit the activity of ALP in the film.



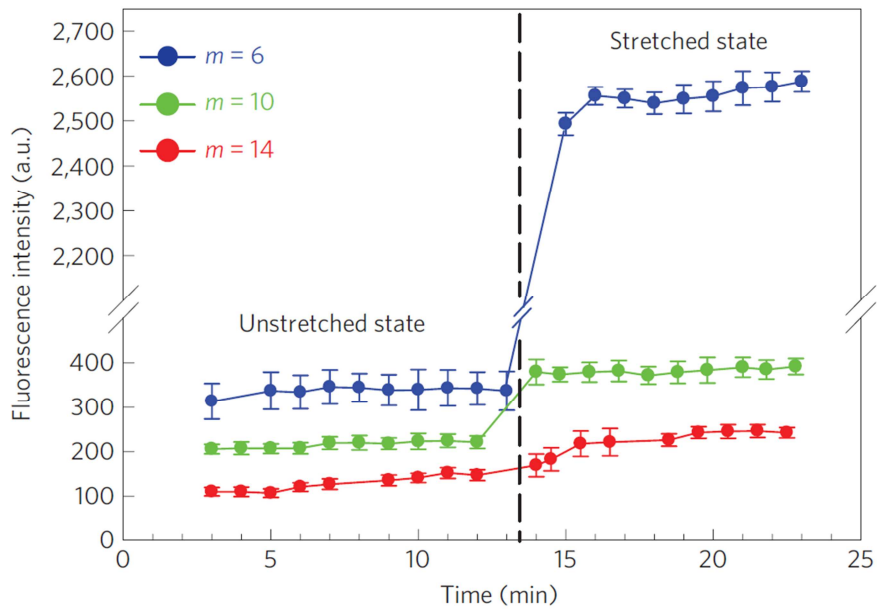
**Figure 3.2:** The designed film is a reservoir loaded with ALP enzymes and capped with a barrier. **(i)** In the unstretched state and in the presence of the FDP substrate, catalysis is off. **(ii)** A critical stretching step is applied, enzymes are exposed and the biocatalysis is switched on, and FDP molecules are hydrolysed into fluorescein molecules and phosphate ions. **(iii)** The high production of fluorescein molecules and phosphate ions leads to their release in solution and also to a strong local increase of their concentration in or close to the barrier. This induces a feedback inhibition of enzymes. **(iv)** A rinsing step with buffer removes fluorescein molecules and phosphate ions from the surface and reactivates enzymes for further catalysis. Once the system is brought back to the unstretched state, enzymes are again masked by the polyelectrolytes from the barrier and the catalysis is switched off.

As FDP does not diffuse through the barrier during stretching, the only remaining mechanism responsible for enzymatic activity during stretching is that enzymes, buried under the barrier in the unstretched state, become unmasked and thus accessible once a critical stretching degree is reached. To demonstrate this mechanism, we carried out immunogold detection of enzymes at the barrier–solution interface in the unstretched and stretched states by AFM (see Supplementary Fig. 3.10). The absence of gold nanoparticles functionalized by specific

antibodies in the non-stretched state and their presence in the stretched state clearly indicate that enzymes become accessible for their substrate, owing to their exposure at the barrier–solution interface during the mechanical stretch.

Until now, reservoirs were capped with a PDADMA/PSS film composed of six bilayers. This number corresponds to the minimal value of bilayers needed to ensure impermeability of the barrier towards FDP diffusion within the reservoir. To further assess if the thickness of the barriers modifies the catalytic activity of the film under stretching, the influence of the number of bilayers  $m$  constituting the capping barrier on the biocatalytic activity was investigated (Fig. 3.3). Whereas for  $m=6$ , a jump of fluorescence (of around 2,000 a.u.) is observed as soon as a stretching of at least  $\alpha=70\%$  is applied, for a thicker barrier ( $m=14$ ), only a small fluorescence increase without a jump is detected. The capping barrier is probably so thick that only very few enzymes are exhibited during stretching. Finally for the  $m=10$  barrier, a catalytic activity leading to a low jump of 150 a.u. is detected as soon as  $\alpha=70\%$  or more. As for  $m=6$ , the jump is also followed by a plateau, indicating that feedback inhibition also occurs. Thicker barriers probably exhibit less enzymes and thus less catalytic sites under stretching, resulting in lower jumps of fluorescence. Changing the thickness of these nanosized barriers thus seems to be a way to tune the amplitude of the catalytic activity triggered by mechanical stimuli.

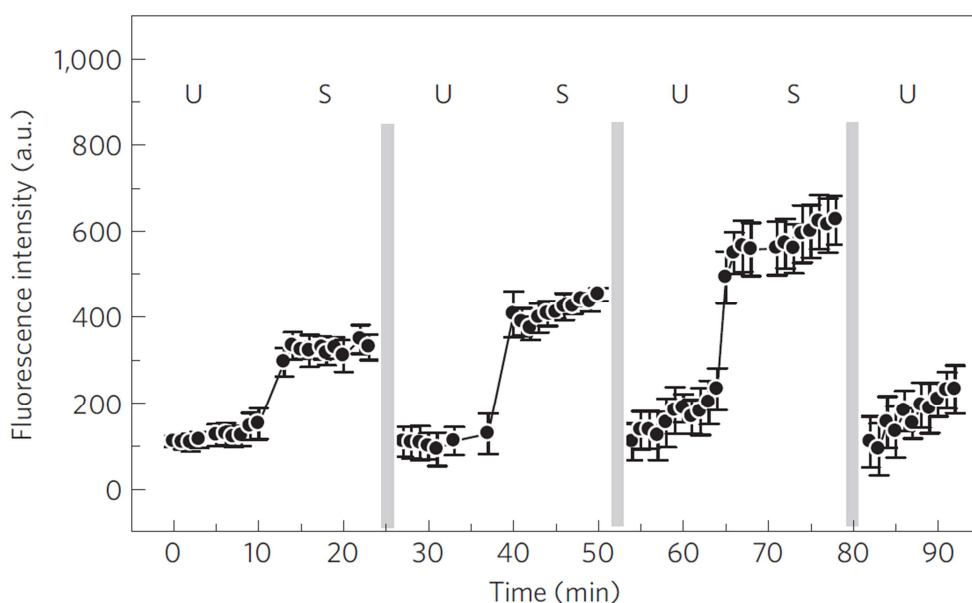
Reversibility of the enzyme exhibition process consists of unmasking/masking by alternating stretched and unstretched states. This reversible activation was tested with a reservoir loaded with enzymes and capped with a barrier [(PLL/HA)<sub>15</sub>/PLL/ALP/(PLL/HA)<sub>15</sub>/(PDADMA/PSS)<sub>10</sub> film] by carrying out three consecutive cycles of the following three-step protocol: (1) film in contact with FDP solution in the unstretched state; (2) film stretched at the critical stretching degree of  $\alpha=70\%$ ; (3) rinsing step with buffer, returning to the unstretched state and back to the initial step (1). The data in Fig. 3.4 demonstrate that the system is reversible: the jump of the fluorescence can be produced at least three times. This indicates that the film becomes enzymatically active as soon as the critical stretching degree is reached and that the activity then stops as soon as the system is brought back to the unstretched state. This activity of the film observed under stretching implies that enzymatic sites become accessible to their substrate. Under stretching, the capping film becomes thinner owing to conservation of matter (Fig. 3.2). The absence of cracks in the barrier suggests that there must exist a critical stretching degree at which enzymes start to be partially uncovered. The



**Figure 3.3:** Evolution with time of fluorescence intensities in solution and for two stretching degrees:  $\alpha=0\%$  (unstretched state) and  $\alpha=110\%$  (above the critical stretching degree of the films). The reservoir loaded with enzymes and capped with a barrier  $[(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/\text{PLL}/\text{ALP}/(\text{PLL}/\text{HA})_{15}/(\text{PDADMA}/\text{PSS})_m]$  film] is deposited on a silicone sheet and is brought in contact with FDP solution. Fluorescence intensities of the solution above the film are measured from confocal microscope section  $(x,z)$  image analyses. Various numbers of bilayers,  $m$ , constituting the nanosized barriers are studied:  $m=6$  (blue),  $m=10$  (green) and  $m=14$  (red). The number of bilayers  $m$  is related to the thickness of the barrier:  $m=6, 10$  and  $14$  correspond to thicknesses of  $84, 140$  and  $196$  nm respectively [Mertz, Hemmerlé et al. 2007]. For the sake of clarity, fluorescence intensities corresponding to  $m=10$  and  $6$  have been shifted by  $+100$  and  $+200$  a.u. respectively. The error bars correspond to standard deviations calculated from image analyses.

barrier is then formed of PDADMA, PSS and of some enzymes. As this barrier is not broken, it remains tied to FDP. After returning to the non-stretched state, polyelectrolytes forming the barrier redistribute themselves over a larger thickness, thus covering again the enzymatic sites. A small proportion of enzymes for which the sites are not fully buried again should remain. This induces a weak enzymatic activity in the non-stretched state that is slightly more pronounced after each stretching/unstretching cycle (Fig. 3.4). Moreover, the rinsing steps carried out during each cycle probably induce the release from the top of the film of reaction products (phosphate ions and fluorescein molecules) responsible for the feedback inhibition of enzymes described above. After rinsing, the enzymes finally regain their potential activity for further stretching steps (Fig. 3.2, steps iii and iv).





**Figure 3.4:** Evolution with time of the fluorescence intensity of the solution and for stretching steps alternating between  $\alpha=0\%$  (unstretched state, U) and  $\alpha=70\%$  (stretched state, S). The reservoir loaded with enzymes and capped with a barrier  $[(PLL/HA)_{15}/PLL/ALP/(PLL/HA)_{15}/(PDADMA/PSS)_{10}]$  film is deposited on a silicone sheet and brought in contact with FDP solutions. The thick grey bars indicate rinsing steps with pure buffer carried out during stretching states. Intensities of the solution above the film are measured from confocal microscope section ( $x,z$ ) image analyses. The error bars correspond to standard deviations calculated from image analyses.

To validate this last hypothesis of product release during rinsing with buffer, we replaced the FDP solution, under stretching, by pure buffer. Then, the fluorescence level observed in solution corresponds to a background level of pure buffer solution (see Supplementary Fig. 3.11). Concomitantly, a strong decrease of the green fluorescence at the upper part of the film was observed, indicating that fluorescein molecules are removed from the top of the film during the rinsing steps (see Supplementary Fig. 3.12). When the film, still in the stretched state, is again brought in contact with FDP solution, a new fluorescence jump of a similar intensity to the first one is again observed (see Supplementary Fig. 3.11). This proves that the enzymes remain exhibited and active on top of the film in the stretched state.

The designed 'cryptic like' surfaces enabled the induction of biochemical reactions by applying a mechanical stress. By using adhesion ligands instead of enzymes, cellular adhesion could be tuned by stretching. We thus anticipate this concept will be developed both in chemistry and in biomaterial domains.

### 3.1.2.3. *Methods*

#### Materials

PLL ( $M_w=5.57 \times 10^4$  Da), PSS ( $M_w=7.0 \times 10^4$  Da) and PDADMA ( $M_w=2.0\text{--}3.5 \times 10^5$  Da) were purchased from Sigma, and HA ( $M_w=4.0 \times 10^5$  Da) from Biolberica. Polyelectrolyte solutions were prepared by dissolution of adequate amounts of polyelectrolyte powders (or by dilution of commercial solution for PDADMA) in 0.15 M NaCl/10 mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) solutions (pH=7.4). The final concentrations of the polyelectrolyte solutions were 1 mg/mL. All solutions were prepared using ultrapure water (Milli Q-plus system, Millipore) with a resistivity of 18.2 M $\Omega$ .cm.

For films loaded with enzymes, ALP (Sigma-Aldrich, P-4002) was also dissolved in a 0.15 M NaCl/10 mM Tris buffer (pH=7.4) at a concentration of 0.5 mg/mL.

ALP<sup>Rho</sup> was obtained by coupling the enzyme (ALP) dissolved at 10 mg/mL in a Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution (0.1 M, pH=8.5) with the red fluorescent dye Rhodamine Red-X, succinimidyl ester (Invitrogen) dissolved in dimethylsulphoxide at 10 mg/mL. We used a ratio of 10 moles of rhodamine per mole of enzyme. These two solutions were gently mixed at room temperature for 1 h. ALP<sup>Rho</sup> was purified by dialysis for three days (Cut Off 12,000–16,000 g/mol Membra-Cel TM, Viskase Companies), and the absence of free rhodamine in the solution was checked by ultraviolet–visible spectroscopy.

#### Build-up of polyelectrolyte multilayers

Multilayer films were built with an automated dipping robot (Riegler & Kirstein GmbH) on silicone sheets (poly(dimethylsiloxane)), 254  $\mu$ m thick (Specialty Manufacturing Inc. SMI). Deposition of polyelectrolyte multilayers on silicone has been described in several studies [Lu, Mohwald et al. 2007; Mertz, Hemmerlé et al. 2007]. Silicone sheets of 18 $\times$ 18 mm<sup>2</sup> were previously cleaned with ethanol and then extensively rinsed with water. These substrates were first dipped in a PLL solution for 8 min. Then, a rinsing step was carried out by dipping them for 5 min in NaCl/Tris solution. The polyanion HA was then deposited in the same manner. The build-up process was pursued by alternated depositions of PLL and HA. After deposition of  $n$  bilayers, the film is denoted (PLL/HA) <sub>$n$</sub> . The same protocol was applied for PDADMA and PSS depositions,

leading to (PDADMA/PSS)<sub>m</sub> multilayers with shorter dipping time (1 min) (*m* stands for the number of bilayers).

Polyelectrolyte multilayers are known to maintain the catalytic activity of enzymes once embedded in the structure [Shutava, Kommireddy et al. 2006]. The enzyme ALP (fluorescently labelled or not) was deposited on the (PLL/HA) film for 10 min at a given stage of the build-up process and then a rinsing step was carried out for 10 min. The build-up of the (PLL/HA) film was then pursued by using the same procedure as described above.

#### Stretching device

A home-made stretching device enabled elongation of the silicone substrates directly under a confocal microscope [Mertz, Hemmerlé et al. 2007]. The stretching degree is defined by the parameter  $\alpha=(\ell-\ell_0)/\ell_0$ , where  $\ell_0$  and  $\ell$  correspond respectively to the initial and to the stretched length of the silicone sheet. The stretching motion is achieved by a precision electric motor at a velocity of 0.74 mm/s. All of the stretching experiments were carried out at ambient temperature in liquid conditions.

#### Confocal laser scanning microscopy

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

#### Measurements of enzymatic activity

The ALP activity of the enzymatic multilayer films deposited on silicone sheets was measured by incubation of the substrate, FDP, tetraammonium salt (Invitrogen, F-2999) solution (200  $\mu\text{l}$ ) at 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 0.15 M NaCl/10 mM Tris buffer (pH=7.4). Concentration and volume ensure a large excess of substrates for the enzymatic reaction. FDP is a colourless and non-fluorescent ALP substrate. Sequential enzymatic hydrolysis of the two phosphate substituents

yields weakly fluorescent fluorescein monophosphate followed by strongly fluorescent fluorescein (excitation/emission=490/515 nm). This fluorescence was then visualized by the confocal microscope and the fluorescence intensity was measured by using the image analysis software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Thereby, the confocal microscope enabled the visualization and the detection of the enzymatic activity even if a background fluorescence of the FDP solutions primarily due to fluorescein monophosphate or fluorescein was initially present at low quantity in the commercial product.

#### **3.1.2.4. Acknowledgements**

Confocal microscopy was carried out in Strasbourg Esplanade Cellular Imaging Facility, funded by CNRS, INSERM, Louis Pasteur University and Alsace Region. We thank K. Benmlih for the build-up of the stretching devices and we are grateful to S. Lesko (Veeco, Dourdan, France) for helping with AFM experiments, D. Vautier and J. H. Lignot for fruitful discussions about immunogold detection, C. Ringwald for designing silicon cells and C. Bouthier for her assistance. We acknowledge support from the Région Alsace for financial contribution to the AFM equipment and P. Schaaf thanks COST D43 for financial support.

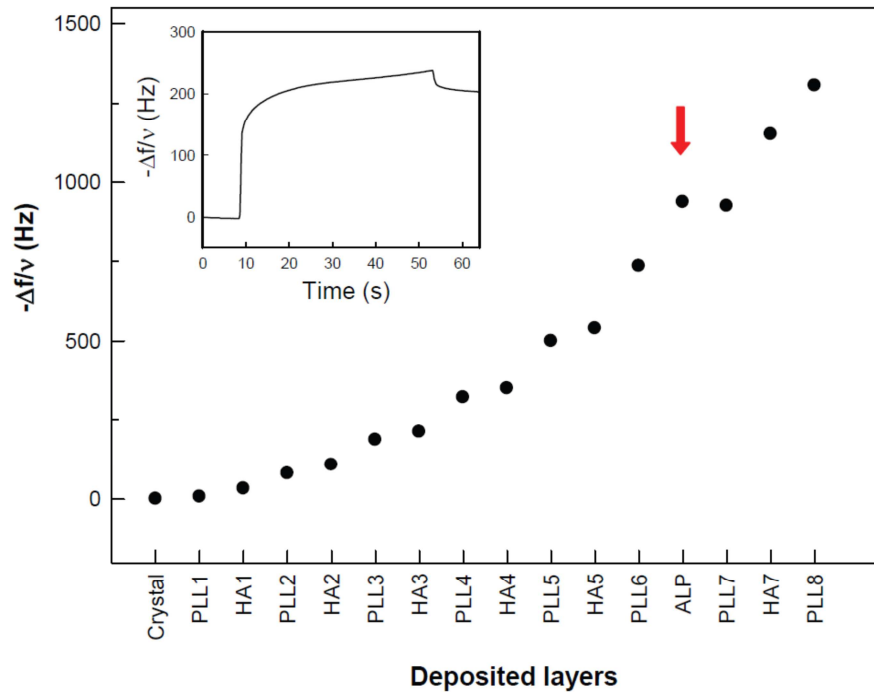
#### **3.1.2.5. Author contributions**

D. Mertz., P. Lavalley and C. Vogt carried out the experiments. P. Schaaf and P. Lavalley brought-up the concept. P. Schaaf, P. Lavalley and J.C. Voegel designed the experiments. J. Hemmerlé designed the experimental set-up. D. Mertz, J. Mutterer and C. Vogt analysed the data. V. Ball proposed the adapted enzymatic model. P. Schaaf and P. Lavalley co-wrote the paper.

#### **3.1.2.6. Supplementary information**

Figures 3.5 to 3.12 are available hereafter.

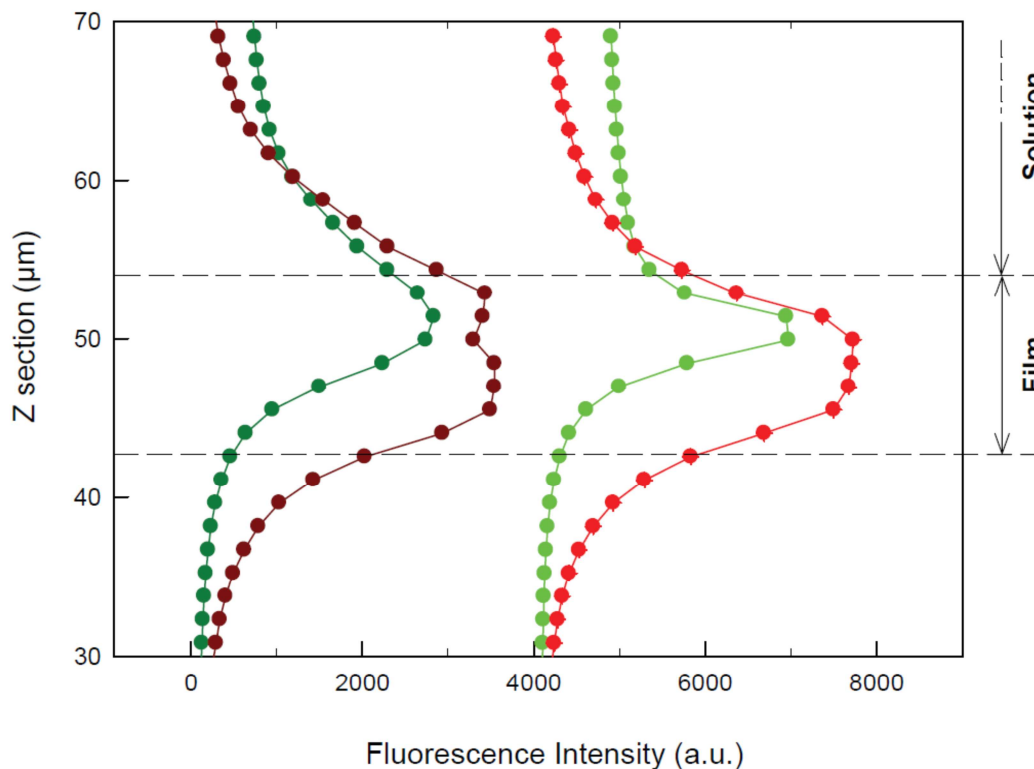
**Figure 3.5:** Quartz crystal microbalance measurements monitoring the build-up of PLL/HA multilayer films and the adsorption of alkaline phosphatase (ALP).



**Figure 3.5:** Quartz crystal microbalance measurements monitoring the build-up of PLL/HA multilayer films and the adsorption of alkaline phosphatase (ALP). The changes in the normalized frequency shifts  $-\Delta f/v$  during the build-up are monitored at 5 MHz. Evolution of the frequency shifts as a function of time during ALP deposition on  $(PLL/HA)_5/PLL$  multilayer film is detailed in the inset.

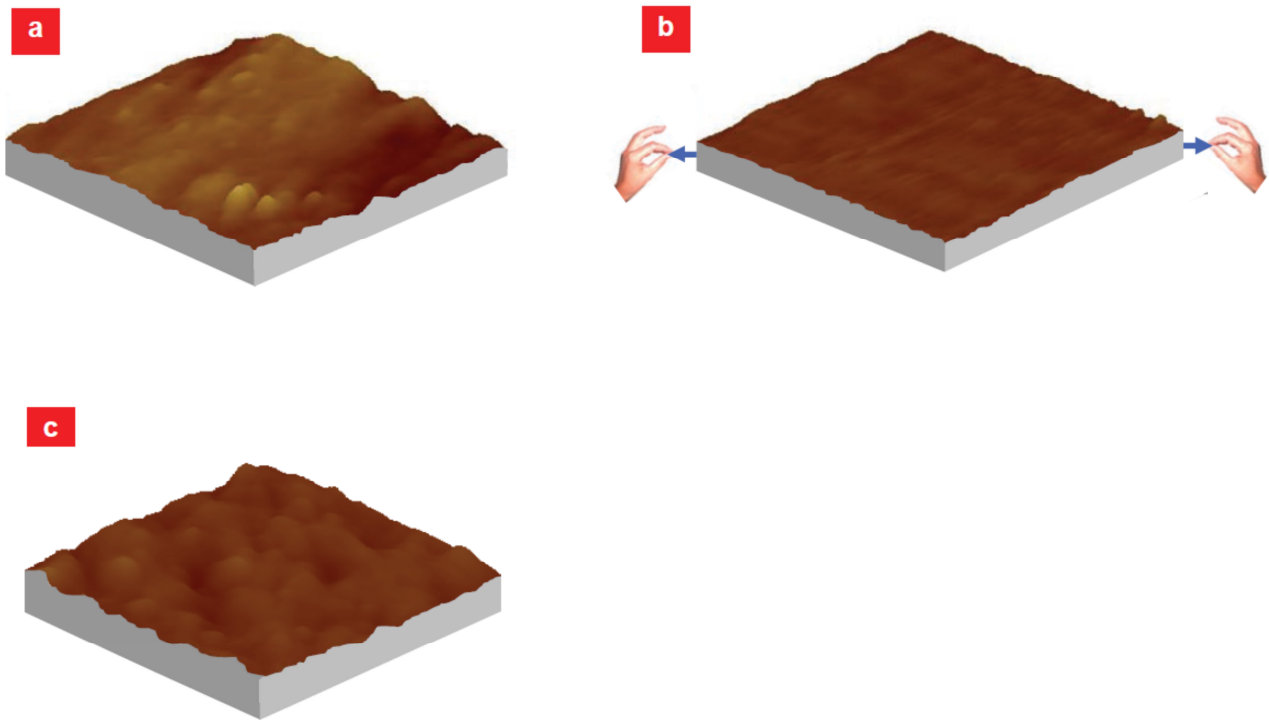
**Quartz Crystal microbalance (QCM).** The build-up process of the multilayered films was monitored in situ by quartz crystal microbalance-dissipation using the axial flow chamber QAFC 302 (QCM-D, D300, QSense, Göteborg, Sweden). The QCM technique consists in measuring the resonance frequency ( $f$ ) of a quartz crystal induced by polyelectrolyte adsorption on the crystal, in comparison with the resonance frequency of the crystal in contact with the rinsing solution. The crystal used here is coated with a 50 nm thick  $SiO_2$  film deposited by active sputter-coating. The quartz crystal is excited at its fundamental frequency and the measurements are performed at this frequency (5 MHz, first overtone,  $v=1$ ). Changes in the resonance frequency,  $\Delta f$  during each adsorption step are measured. A shift in  $\Delta f$  can be associated, in first approximation, with a variation of the mass adsorbed on the crystal. To characterize the film at a given step, only the frequency at the end of the rinsing steps following the exposure to either polycation or polyanion were taken into consideration.

**Figure 3.6:** Fluorescence profiles of the reservoir/barrier films in the unstretched and stretched states.



**Figure 3.6:** Fluorescence profiles of the reservoir/barrier films in the unstretched and stretched states. These profiles are measured with confocal microscope along the Z direction for a  $(PLL/HA)_{15}/PLL/AP^{Rho}/(PLL/HA)_{15}/(PDADMA/PSS)_6$  reservoir/barrier system brought in contact with a fluorescein solution (10 μg/mL) at a non-stretched state (dark green and dark red corresponding respectively to green and red emissions) and at a stretching degree of  $\alpha=80\%$  (light green and light red corresponding respectively to green and red emissions). For sake of clarity, fluorescence intensities corresponding to the stretched state have been shifted by +4000 a.u.

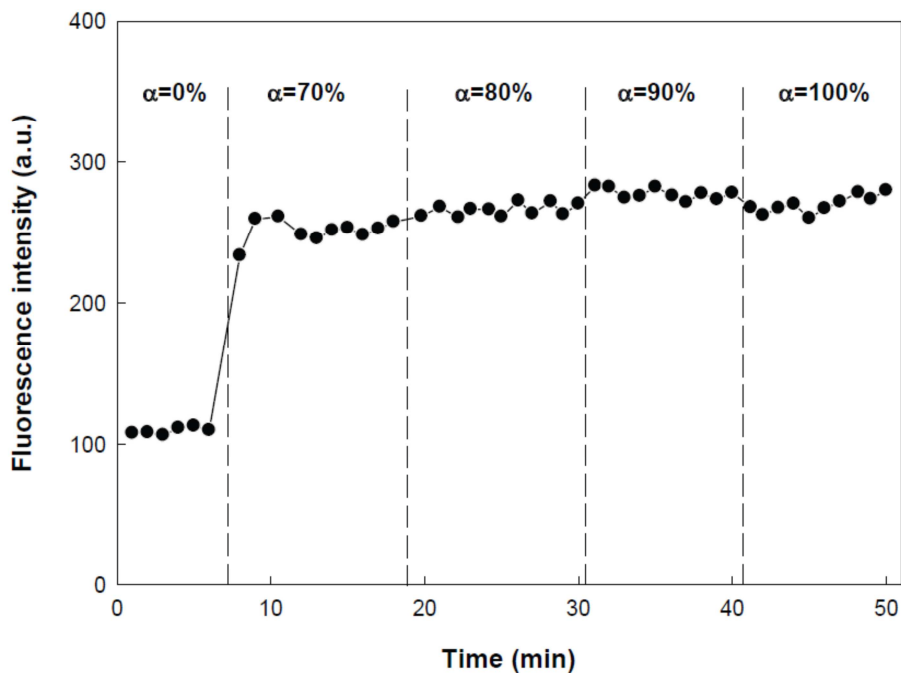
**Figure 3.7:** Atomic force microscope (AFM) observations of the barrier/solution interface in the unstretched and stretched states.



**Figure 3.7:** Atomic force microscope (AFM) observations of the barrier/solution interface in the unstretched and stretched states. AFM images of a reservoir loaded with enzymes and capped with a barrier [(PLL/HA)<sub>15</sub> / PLL / ALP / (PLL/HA)<sub>15</sub> / (PDADMA/PSS)<sub>6</sub>] observed for two stretching degrees:  $\alpha=0\%$  (unstretched state) (a),  $\alpha=100\%$  (stretched state) (b) and back to the unstretched state (c). Images sizes are  $3.6 \times 3.6 \mu\text{m}^2$  and Z scales are 200 nm. The mean roughness ( $R_a$ ) of the sample changes from 14 nm in the unstretched state, to 4 nm after stretching and 15 nm when the film is brought back to the unstretched state.

Atomic force imaging was performed using a Dimension V scanning probe microscope (Veeco, Santa Barbara, CA). The apparatus operated in the tapping mode in liquid condition. Cantilevers with a spring constant of 0.06 N/m and a resonant frequency of 12 kHz ending with a silicon tip were used (Model DNP, Veeco, Santa Barbara, CA).

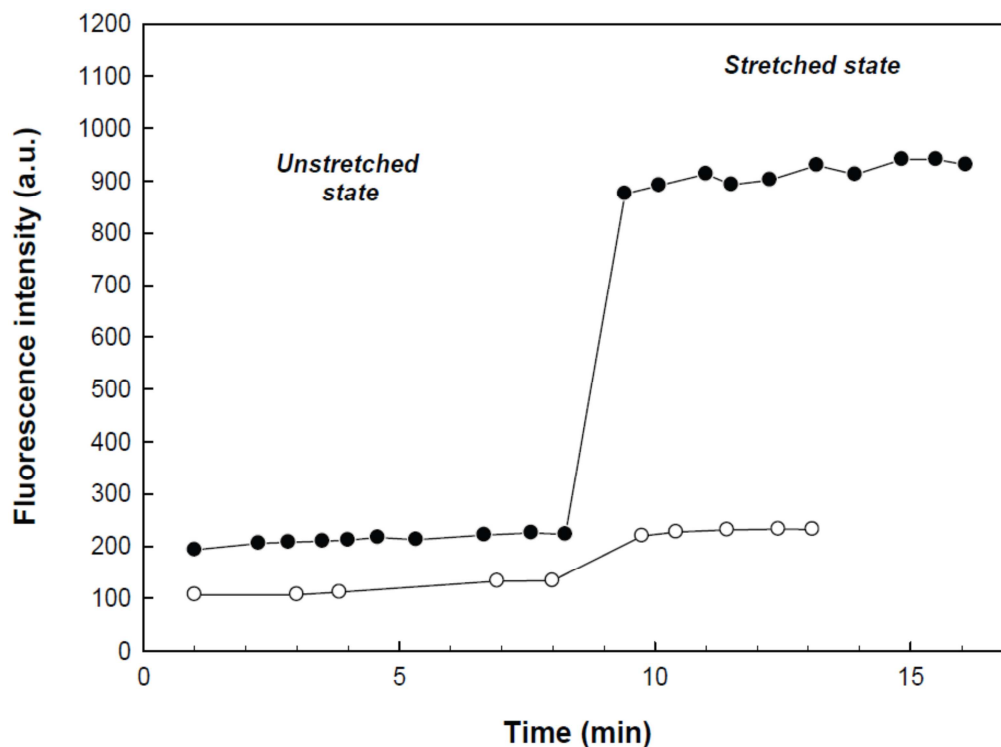
**Figure 3.8:** Triggering of biocatalytic activity on a reservoir/barrier films induced by mechanical stretching.



**Figure 3.8:** *Triggering of biocatalytic activity on a reservoir/barrier films induced by mechanical stretching. Evolution with time of fluorescence intensity in solution above the reservoir loaded with enzymes and capped with a barrier [(PLL/HA)<sub>15</sub> / PLL / ALP / (PLL/HA)<sub>15</sub> / (PDADMA/PSS)<sub>10</sub>] in contact with a FDP solution and for various stretching steps ranging from  $\alpha=0\%$  to  $\alpha=100\%$ . A single jump of fluorescence is observed once a critical stretching step of  $\alpha=70\%$  is reached. Then, the fluorescence level does not change anymore by increasing stretch degree.*

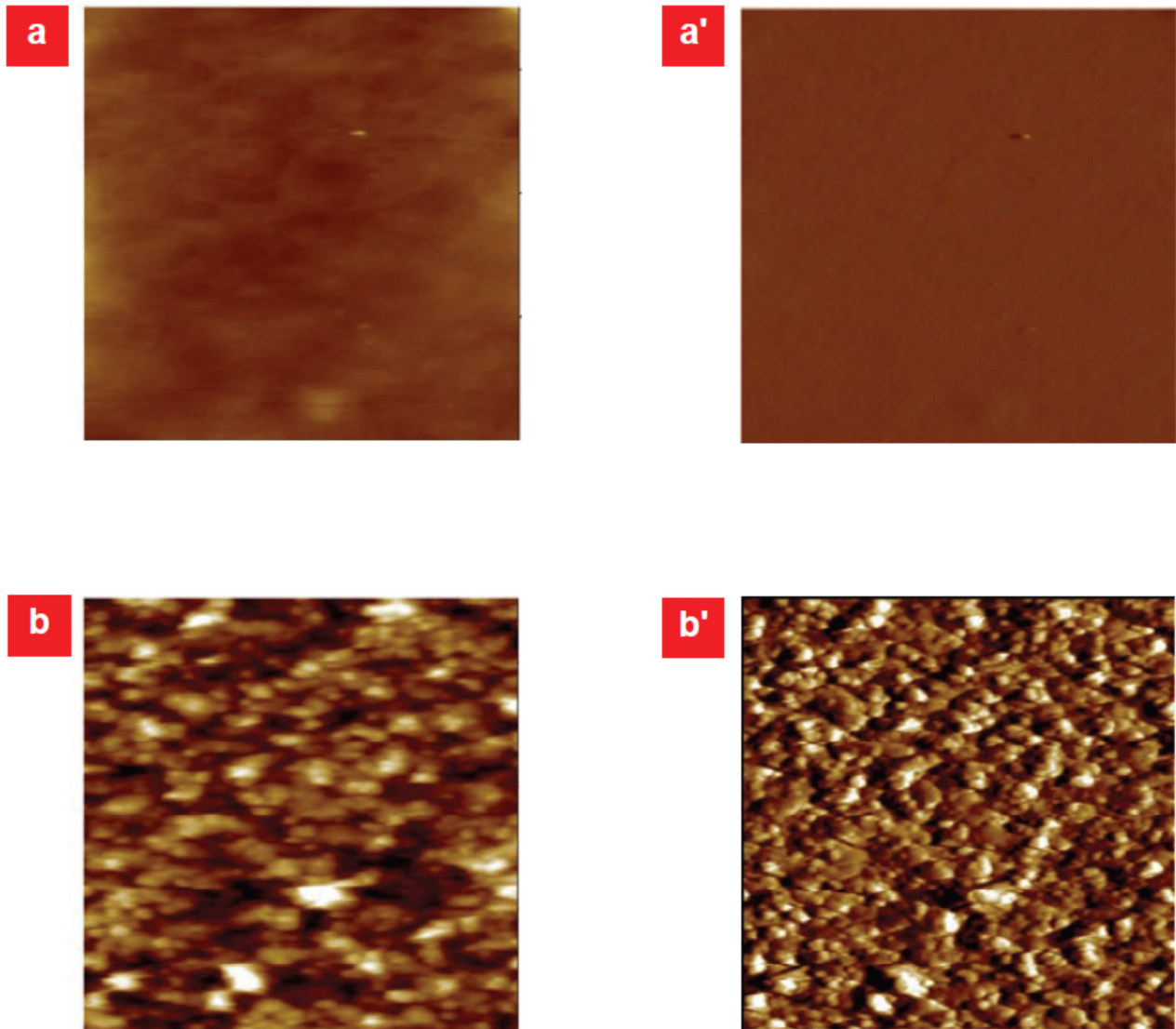


**Figure 3.9:** Inhibition of the biocatalytic activity of reservoir/barrier films by phosphate ions.



**Figure 3.9:** Inhibition of the biocatalytic activity of reservoir/barrier films by phosphate ions. Evolution with time of fluorescence intensities in solution and for two stretching degrees:  $\alpha=0\%$  (unstretched state) and  $\alpha=70\%$  (stretched state). The reservoir loaded with enzymes and capped with a barrier  $[(PLL/HA)_{15} / PLL / ALP / (PLL/HA)_{15} / (PDADMA/PSS)_6]$  is deposited on a silicone sheet and brought in contact with FDP solutions in the absence (filled circles) or in the presence (empty circles) of  $2 \cdot 10^{-2}$  M (100 equivalents) of phosphate ions. Fluorescence intensities of the solution above the film are measured from confocal microscope section (x,z) image analyses. For sake of clarity, fluorescence intensities corresponding to experiments performed in the absence of phosphate ions have been shifted by +100 a.u.

**Figure 3.10:** Immunogold detection of alkaline phosphatase enzyme at the barrier/solution interface in the unstretched and stretched states by Atomic force microscope (AFM).

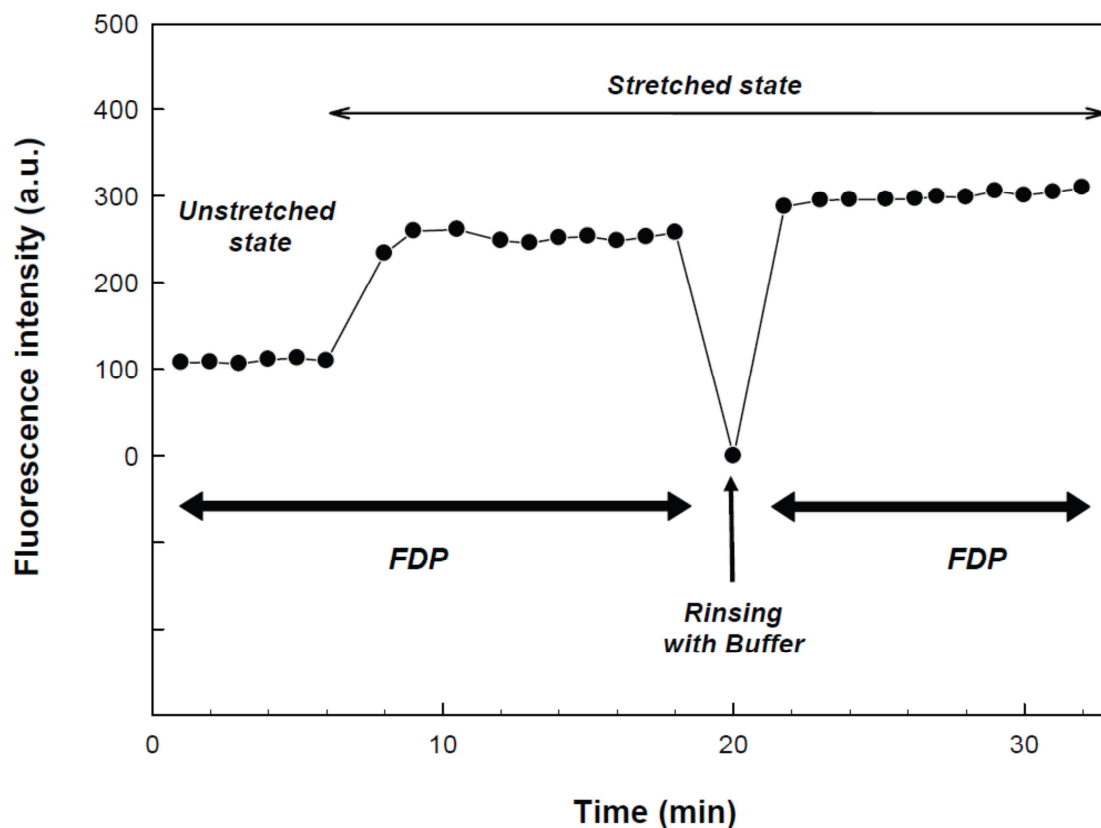


**Figure 3.10:** Immunogold detection of alkaline phosphatase enzyme at the barrier/solution interface in the unstretched and stretched states by Atomic force microscope (AFM). AFM images of a reservoir loaded with enzymes and capped with a barrier  $[(PLL/HA)_{15} / PLL / ALP / (PLL/HA)_{15} / (PDADMA/PSS)_6]$  observed in the unstretched state ( $\alpha=0\%$ ) (a, a'), and for a stretching degree  $\alpha=100\%$  (b, b'). Detection of the enzyme on top of the surface was performed by immunogold using mouse monoclonal anti-alkaline phosphatase as a primary antibody and goat anti-Mouse IgG conjugated gold nanoparticles as a secondary antibody (gold nanoparticles of 40 nm in diameter). Images a) and b) correspond to height mode images (Z scales of 50 and 250 nm respectively) and images a') and b') to deflection mode images (contact mode). Images sizes are  $7.0 \times 7.0 \mu m^2$ .

**Immunogold detection of enzyme with AFM.** Mouse monoclonal Anti-human/mouse/rat Alkaline Phosphatase Antibody (Ab1) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), and Goat anti-Mouse IgG conjugated gold nanoparticles (Ab2, 40 nm diameter) from BBIInternational (Cardiff, UK). A 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ab1 solution was prepared by dissolution of lyophilized Ab1 and a 0.011  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ab2 solution was obtained by dilution of the commercial Ab2 solution. Both, were prepared in 0.15 M NaCl / 10 mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) solution (pH = 7.4). Ab1 solution was first brought in contact with a reservoir/barrier system (stretched or unstretched) during 45 minutes. Then, after a 15 minutes rinsing step with buffer solution, the sample was brought in contact with Ab2 solution during 15 minutes. After incubation, the sample was rinsed five times during 5 minutes with buffer and dried under an air flow. Stretched samples were maintained stretched during AFM observations.

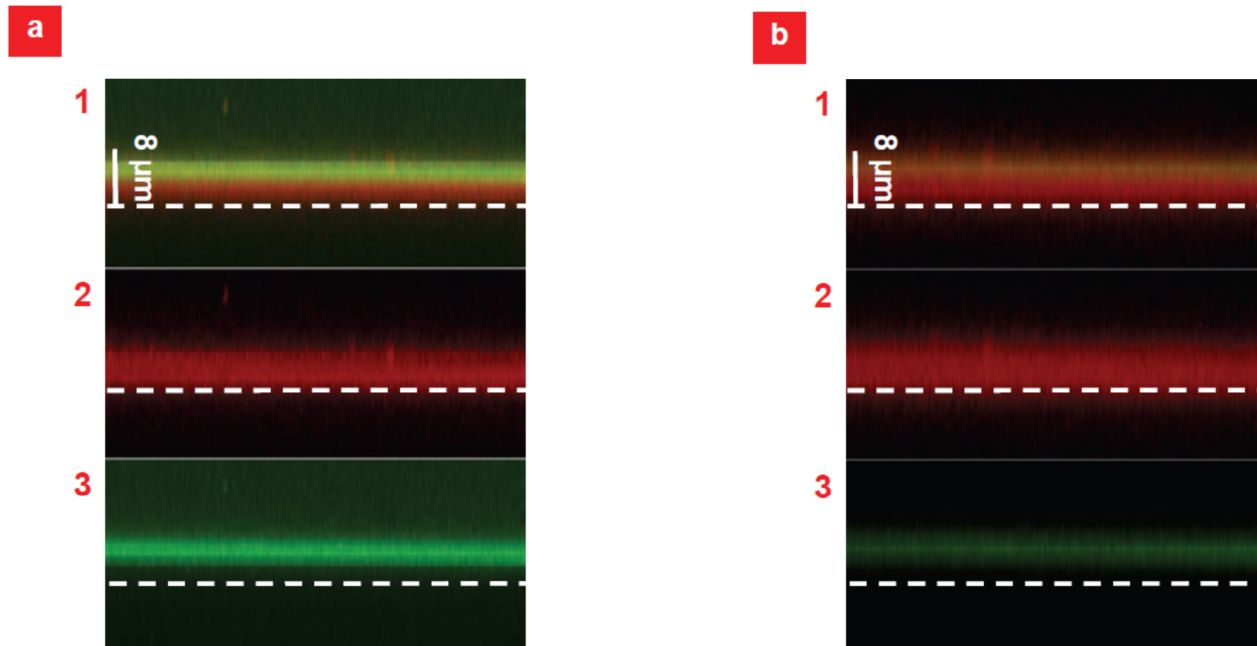
Atomic force imaging was performed using a Multimode scanning probe microscope (Veeco, Santa Barbara, CA). The apparatus operated in the contact mode in dry condition. Cantilevers with a spring constant of 0.03 N/m ending with a silicon tip were used (MSCT model, Veeco, Santa Barbara, CA).

**Figure 3.11:** Release of the inhibitor from the barrier during the rinsing step after a first jump of fluorescence.



**Figure 3.11:** Release of the inhibitor from the barrier during the rinsing step after a first jump of fluorescence. Evolution with time of fluorescence intensity in solution for two stretching degrees:  $\alpha=0\%$  (unstretched state) and  $\alpha=70\%$  (stretched state). The reservoir loaded with enzymes and capped with a barrier  $[(PLL/HA)_{15} / PLL / ALP / (PLL/HA)_{15} / (PDADMA/PSS)_{10}]$  is deposited on a silicone sheet and is brought in contact with FDP solutions. Intensity of the solution above the film is measured from confocal microscope section ( $x,z$ ) image analyses. At  $t=18$  min, FDP solution in contact with the stretched film is replaced by pure buffer. At  $t=22$  min the film, still in the stretched state, is again brought in contact with a new FDP solution. A new jump of fluorescence is then observed. Intensity of this jump is similar to that observed before rinsing with buffer. This proves that after buffer rinsing step, inhibition can be removed and catalysis can start again thanks to release of the inhibition products (phosphate ions and fluorescein) from the barrier.

**Figure 3.12:** Release of fluorescein molecules from the barrier during rinsing step after a jump of fluorescence.



**Figure 3.12:** Release of fluorescein molecules from the barrier during rinsing step after a jump of fluorescence. Confocal microscope section (x,z) images of the reservoir loaded with enzymes and capped with a barrier [(PLL/HA)<sub>15</sub> / PLL / ALP<sup>Rho</sup> / (PLL/HA)<sub>15</sub> / (PDADMA/PSS)<sub>10</sub>]. The multilayer film is deposited on a silicone sheet and is stretched at  $\alpha=70\%$  in presence of FDP solution (a) and then rinsed with buffer solution (b). Once the film is stretched, strong green fluorescence intensity appears in the upper part of the film (a). After rinsing step with buffer solution (b), this green fluorescence decreases strongly. Film sections are observed in the red and green channels (images 1), in the red channel only (images 2), and in the green channel only (images 3).



## 3.2. Plateformes enzymatiques tout-en-un induisant une libération « réactive » par étirement

### 3.2.1. Résumé

Cette partie traite de l'élaboration d'un film multicouche de polyélectrolytes constitué d'un réservoir PLL/HA chargé avec le substrat FDP et recouvert d'une barrière PDADMA/PSS sur laquelle l'enzyme ALP est déposée. Une proposition d'article (format "Lettre") en anglais rassemble ci-dessous les résultats obtenus.

Dans un premier temps, les échantillons ont été visualisés à l'aide d'un microscope confocal (coupe x,z). Ainsi, il a été possible de voir que la FDP en solution mise au contact d'un film (PLL/HA)<sub>30</sub>/PLL diffuse sur toute l'épaisseur et que sa concentration est bien supérieure à l'intérieur par rapport à la solution. Ce réservoir enzymatique a ensuite été recouvert d'un film multicouche (PDADMA/PSS)<sub>10</sub>. Les enzymes ALP ont alors été adsorbées en surface du système. Cela n'entraîne pas de production de fluorescéine (F), ni dans le surnageant, ni dans le film : la FDP et l'ALP sont toutes deux dans le film mais dans deux zones bien distinctes. Le film PDADMA/PSS joue le rôle de barrière.

Afin de déterminer l'influence de l'étirement du système (PLL/HA)<sub>30</sub>/PLL/FDP/(PDADMA/PSS)<sub>10</sub>/ALP sur l'activité biocatalytique et éventuellement sur la libération de produits, l'intensité de fluorescence du surnageant a été suivie dans le temps pour différents taux d'étirement. La pente de la courbe est très faible pour des taux inférieurs ou égaux à 40 % et correspond probablement à un bruit de fond. Par contre, au-delà de 60 %, la pente augmente de façon conséquente. Cela correspond à une production et à une libération de fluorescéine hors du film. Contrairement à ce qui se passe dans l'étude du chapitre 3.1, il n'y a pas d'inhibition rétroactive, le signal augmente de façon continue et durable. Cela est probablement dû au fait que les produits de la réaction, tels que le phosphate, sont très rapidement libérés dans la solution et qu'ils ne sont donc pas confinés à proximité des sites actifs des enzymes.

Une expérience a ensuite permis de comparer le système étudié et un système témoin sans ALP sur la barrière. Il apparaît clairement que la quantité de fluorescéine libérée est bien supérieure dans le cas de la plateforme dotée d'enzymes. En prélevant le surnageant pour les deux échantillons étirés, la fluorescence peut être mesurée puis la déphosphorylation des molécules de FDP peut être forcée en ajoutant un excès d'enzymes. Il apparaît alors que la même quantité de fluorescéine est obtenue pour les deux échantillons. Cela signifie que dans le cas du système enzymatique, il n'y a pas de FDP qui est libérée dans le surnageant sous étirement. Chaque molécule de FDP qui traverse la barrière se transforme en fluorescéine, c'est-à-dire que seuls les produits de la réaction biocatalytique sont libérés suite à l'étirement du système. De plus, ceci implique que les contraintes mécaniques appliquées engendrent une modification de la barrière.

Un retour à l'état de repos ne permet pas de changer la vitesse de sortie de la fluorescéine. La modification de la barrière est donc irréversible. Cependant, aucun pore inhérent à l'étirement n'a pu être visualisé en AFM, ni aucune désorption d'enzyme ou aucun changement significatif du potentiel électrique de surface. La barrière devient certainement définitivement moins dense par étirement du système, ce qui permet le passage de la FDP.

Un rinçage du système ne permet pas non plus d'arrêter définitivement la biocatalyse. En effet, après rinçage, on observe un arrêt d'environ 15 minutes de la catalyse, puis la réaction redémarre à nouveau. Lors du rinçage, les molécules situées dans la partie supérieure du film sont probablement éliminées. Lorsqu'une solution tampon fraîche est mise au contact du film, le gradient de concentration important induit une diffusion des molécules situées plus en profondeur dans le film, ce qui permet aux molécules d'atteindre la barrière au bout de 15 min.

Le mécanisme global du système semble être fortement dépendant des phénomènes de diffusion : 1) diffusion de la FDP au travers de la barrière induite par étirement ; 2) diffusion de la FDP de la partie basse vers la partie haute du réservoir en cas de déséquilibre de concentration. La plateforme enzymatique mise au point permet aux enzymes et aux substrats d'être stockés et préservés au sein du film au repos. Une libération « bioactive » des produits de la réaction peut être induite par simple étirement. Cette plateforme enzymatique constitue un premier pas vers l'administration de « prodrogues » à partir de revêtements de biomatériaux. Les « prodrogues » pourraient être stockées dans le réservoir et seraient transformées en médicaments – qui ne peuvent être stockés dans leur forme native – au passage de la barrière enzymatique, après activation de la libération « réactive » par étirement.



## 3.2.2. Résultats : *Stretch-induced Reactive Release from a layer-by-layer enzymatic platform*

### 3.2.2.1. Main content

The design of responsive materials and in particular mechanosensitive materials is now thoroughly investigated and it emerges as an extremely hot topic. Nanosciences and nanotechnologies allowed recently the development of devices and the implementation of tools to detect a single molecular event originates from a mechanical stimulus. For example, mechanochromic materials, *i.e.* materials that changes colour when it undergoes a tensile stress, have been designed and allow to directly visualize a mechanochemical reaction [Davis, Hamilton et al. 2009]. Another recent application depicts self-reporting hybrid materials where proteins are used as reporter molecules that sense deformation, strain, or mechanical damage in materials [Bruns, Pustelny et al. 2009]. Such mechanical sensitive architectures mimic the natural mechanism implied in mechanotransduction, where cells convert a mechanical stimulus into a cascade of chemical reactions [Katsumi, Orr et al. 2004].

Mimicking nature and designing surfaces that would induce chemical reactions or trigger cellular responses upon stretching the surface would not only be of fundamental interest but could also present numerous potentialities from a technological point of view. Such surfaces could be used, for example, to build sensors that become active or are reactivated under stretching, to control reactions in microfluidic devices upon local stretching of the substrate or to induce specific biological reactions on cells seeded on such devices. A first step was recently undertaken to design a “mechanotransductives” surface [Mertz, Vogt et al. 2009]. To this purpose, a film combining two strata of polyelectrolyte multilayers was built up: a first thick and hydrated stratum acting as a reservoir for enzymes and on the top of this reservoir a second thin and dense stratum which plays the role of barrier. At rest, enzymes are masked and catalytic reaction is “off”. Once a critical stretching degree is applied on the system, biocatalysis turns “on” due to the unmasking of enzymes. However, this system suffers from one drawback: a feedback inhibition process takes place during the catalysis and thus only a burst in substrate production could be monitored instead of a “true” enzyme kinetic.

The effect of mechanical stimuli on the release of compounds from polymeric matrices is a subject of major interest which is the focus of numerous studies. A recent study describes the control of growth factor release from alginate hydrogels with cyclic compression loadings [Lee, Peters et al. 2000; Lee, Peters et al. 2001]. Due to these mechanical stresses, neovascularisation in tissue surrounding stimulated hydrogels can be enhanced. More recently, it has been demonstrated that the release of macromolecules from layer-by-layer capsules is strongly improved by compressions [Fernandes, Delcea et al. 2010].

Other works have been reported on the release of active molecules upon a chemical process such as the prodrug approach [Thierry, Kujawa et al. 2005]. However to our knowledge, no mechanoresponsive device releasing materials upon a chemical process induced by stretch, has not yet been reported. We expect the *stretch-induced reactive release* approach will be of interest because of practical advantages it may provide: i) a macroscopic stretch is a technically simple stimulus and can easily be applied ii) the use of a chemical process brings advantages to release processed-products when these products for example can not be stored under their native form within the device or need to be protected from their environment.

Herein we address the design of an original “all-in-one” platform combining polymers, enzymes and substrates in a unique film, where a polymeric barrier prevents any contact between enzymes and substrates at rest. Upon stretch, an enzymatic catalysis is triggered and a controlled release of catalyzed products occurs from the film to the solution.

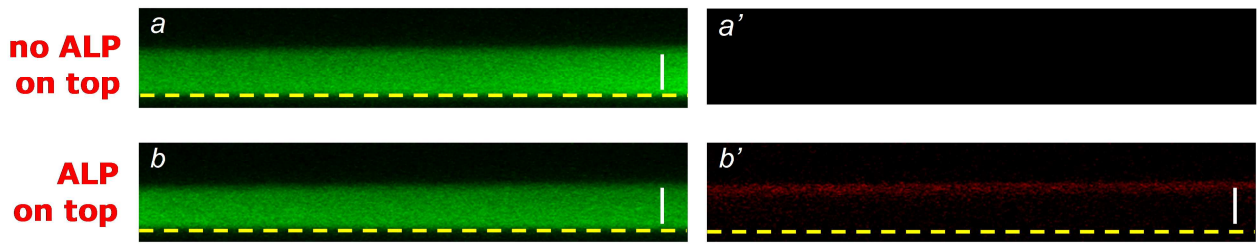
Incorporation of active enzymes in polymeric architectures and more particularly in polyelectrolyte multilayer films can be useful to develop biosensors [Narvaez, Suarez et al. 2000]. Recently, our group has described the incorporation of alkaline phosphatase in exponentially growing polyelectrolyte multilayers and showed that enzymatic activity was maintained [Lavalle, Boulmedais et al. 2005]. These polyelectrolyte multilayers can act as reservoirs of enzymes. In the present study, we used such thick and hydrated polyelectrolyte multilayers, namely poly(L-lysine)/hyaluronic acid (PLL/HA), to embed fluorescein diphosphate (FDP). The FDP molecule is a fluorogenic substrate of alkaline phosphatase enzyme, *i.e.* it becomes strongly fluorescent once the enzyme has catalyzed the dephosphorylation reaction of FDP into fluorescein (F). Figure 3.13 depicts a virtual section obtained by CLSM of the PLL/HA film where FDP was deposited on the top. It shows that FDP molecules, weakly fluorescent in the green wavelength, diffuse inside the reservoir and are concentrated within it. Following FDP

deposition, a capping constituted by (PDADMA/PSS)<sub>10</sub> (PDADMA: poly(diallyldimethylammonium); PSS: poly(sodium 4-styrenesulphonate)) strata was added on the top. The thickness was estimated at around 90 nm from quartz crystal microbalance measurements (QCM) (see Supplementary Fig. 3.19). It is well known that PDADMA/PSS layers act as a barrier and prevent diffusion of polyelectrolytes [Mertz, Hemmerlé et al. 2007] or proteins [Mertz, Vogt et al. 2009] through it. Then, rhodamine-labeled ALP (ALP<sup>Rho</sup>, red emission) was adsorbed as a last layer on top of this barrier. Despite the negative charges of the film due to PSS chains adsorbed as final layer, ALP, also negatively charged, can significantly be adsorbed on the film according to CLSM image (Figure 3.13b') and QCM measurements (Supplementary Fig. 3.19). Moreover, if ALP<sup>Rho</sup> is deposited on a similar film but with a PDADMA terminating layer instead of PSS, the whole film section becomes labeled in red (Supplementary Fig. 3.20). The adsorbed amount of ALP is also five times larger on PDAMA than on PSS, as checked with QCM (Supplementary Fig. 3.19). In this case, the PDAMA/PSS capping layer becomes no more efficient as a barrier and the catalytic reaction occurs in the film. This underlines the sensitivity of the system. Finally, the film [(PLL/HA)<sub>30</sub>/PLL/FDP/(PDADMA/PSS)<sub>10</sub>/ALP<sup>Rho</sup>] constitutes our “enzymatic platform” (Figure 3.14, step a) that is used all along the paper.

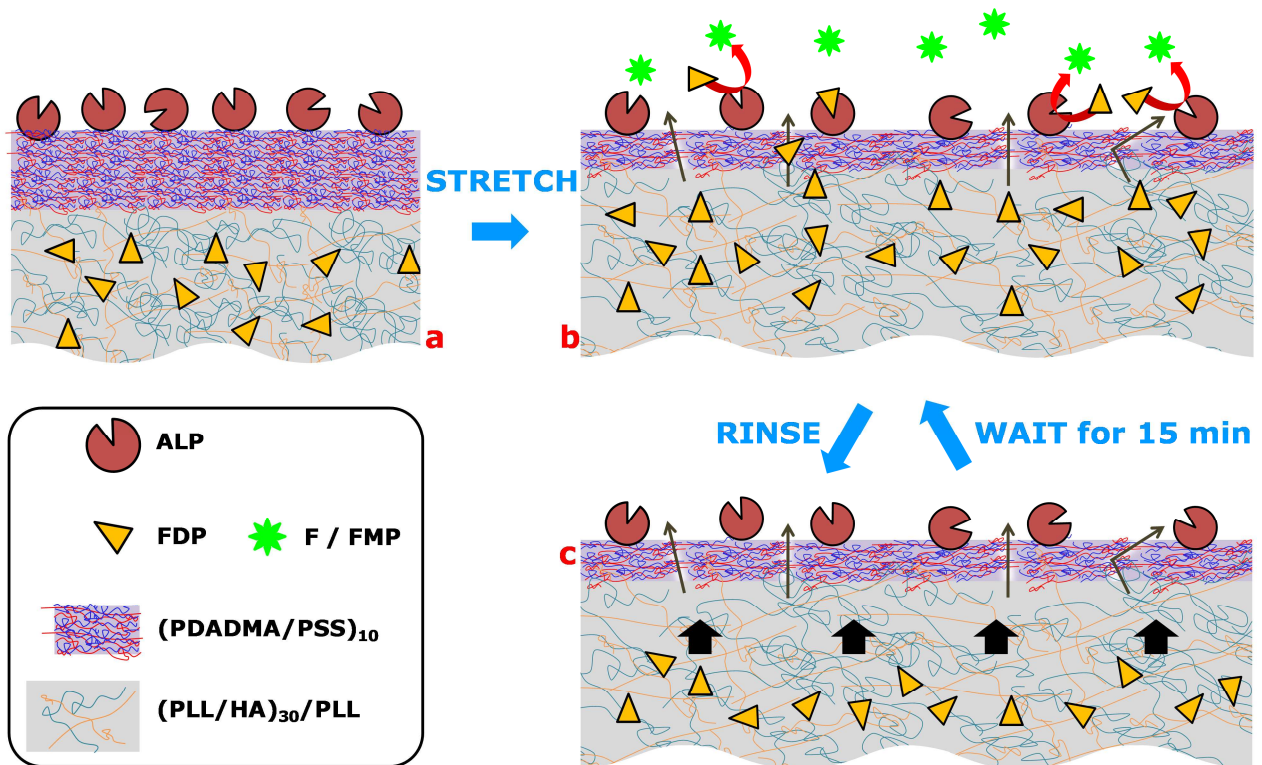
Comparison of Figures 3.13a and 3.13a' presents no difference in green fluorescence intensities, indicating that the deposition of ALP on top of the barrier does not lead to a biocatalytic reaction. Moreover, no evolution of the green fluorescence within the film and in the supernatant was monitored. This clearly indicates that the enzymatic substrate FDP and the enzyme ALP are both present in the film but in two distinct areas. In fact, this “all-in-one” film [(PLL/HA)<sub>30</sub>/PLL/FDP/(PDADMA/PSS)<sub>10</sub>/ALP<sup>Rho</sup>] depicts no catalytic activity at rest.

In order to check if a stress applied on the film can trigger the catalytic reaction and release the products of the enzymatic reaction, evolution with time of the fluorescence intensity in the supernatant was monitored with CLSM for stretching degrees  $\alpha$  between 0 and 100% (Figure 3.15).

For  $\alpha$  values ranging between 0 and 40 %, the fluorescence increase corresponding to the enzymatic rate is constant and very low, *i.e.* about  $0.10 \pm 0.05$  a.u./s. This value probably corresponds to a background level as attested by the slope of the same order obtained with a similar film but without enzymes on the top (0.13 a.u./s) (see Supplementary Fig. 3.21).



**Figure 3.13:** Confocal microscope images of a section ( $x;z$ ) of a silicone sheet coated with a  $(PLL/HA)_{15}/PLL/FDP$  film and covered with a barrier  $(PDADMA/PSS)_{10}$ . Green (a) and red (a') channels of the film without enzyme and green (b) and red (b') channels with enzymes  $ALP^{Rho}$  labeled in red and adsorbed on top  $(PDADMA-PSS)_{10}$ . This  $(PDADMA/PSS)_{10}$  acts as a barrier and prevents diffusion of  $ALP^{Rho}$  inside the underlying  $PLL/HA$  reservoir. The dashed lines indicate interface between the silicone sheet and the polyelectrolyte film. All images are acquired with the same parameters. The white scale bars correspond to  $8 \mu m$  in all images.



**Figure 3.14:** Schematic illustration of the mechanism involved in the enzymatic platform, a) before a stretching step, b) during a stretching step and c) after a rinsing step in the stretched state.

For  $\alpha = 60 \%$ , the slope strongly increases, reaching about  $0.80 \pm 0.20$  u.a./s. This corresponds to a critical stretching rate (60 %) from which the production of fluorescein molecules is triggered. For higher stretching rates  $\alpha$ , the slope does not change any more. No significant further increase of the fluorescein production rate takes place beyond. It should be

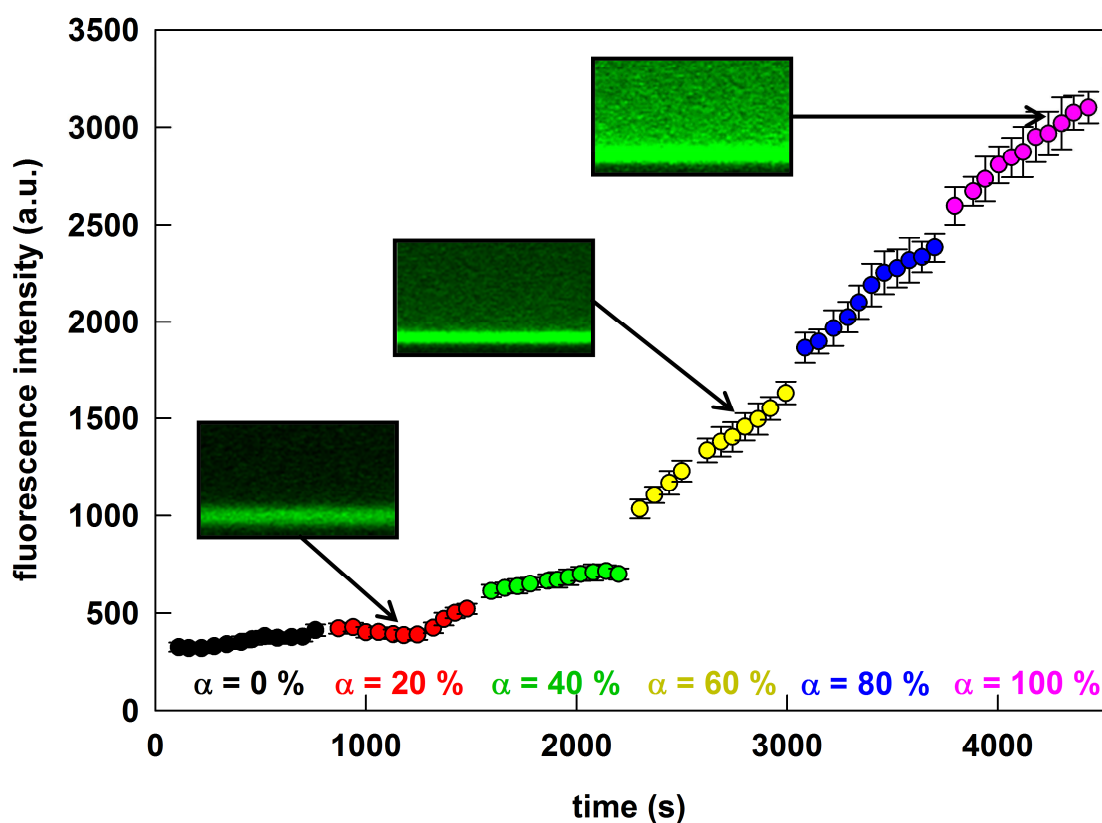
noted that each stretching step induces a small jump of fluorescence, which is due to a decrease of the thickness of the silicone support leading to a better transmission of the fluorescence signal through the objective of the inverted CLSM.

Inserts in Figure 3.15 shows CLSM section images before and after stretching. An increase of fluorescence occurs both in the supernatant and in the film. This indicates that once fluorescein molecules are produced by the enzymes on top of the film, they can diffuse within the underlying PLL/HA reservoir.

It should be noted that at this stage, the rate of enzymatic reaction does not change with time over at least 30 minutes, thus no feedback inhibition of the enzyme takes place contrary to the previous designed systems [Mertz, Vogt et al. 2009]. In the present case, the products of the reaction, and more particularly phosphate ions, are probably released in the supernatant and are not confined in the vicinity of the enzymes.

A thicker barrier constituted with 20 PDADMA/PSS bilayers instead of 10 bilayers was also tested. This barrier remains tight when the system is stretched up to 140 %, indicating that no enzymatic reaction occurs (see Supplementary Fig. 3.22). F molecules are in this case not able to cross the barrier, whatever the mechanical state of the film. For thinner barriers (2 or 6 PDAMA/PSS bilayers) the catalysis is already on when the film is at rest (data not shown). This demonstrates that the barrier is too thin and not tight enough at rest. Finally, the enzymatic platform constituted by 10 (PDAMDA/PSS) bilayers corresponds to an optimal system for the design of architectures with stretch-induced reactive release properties.

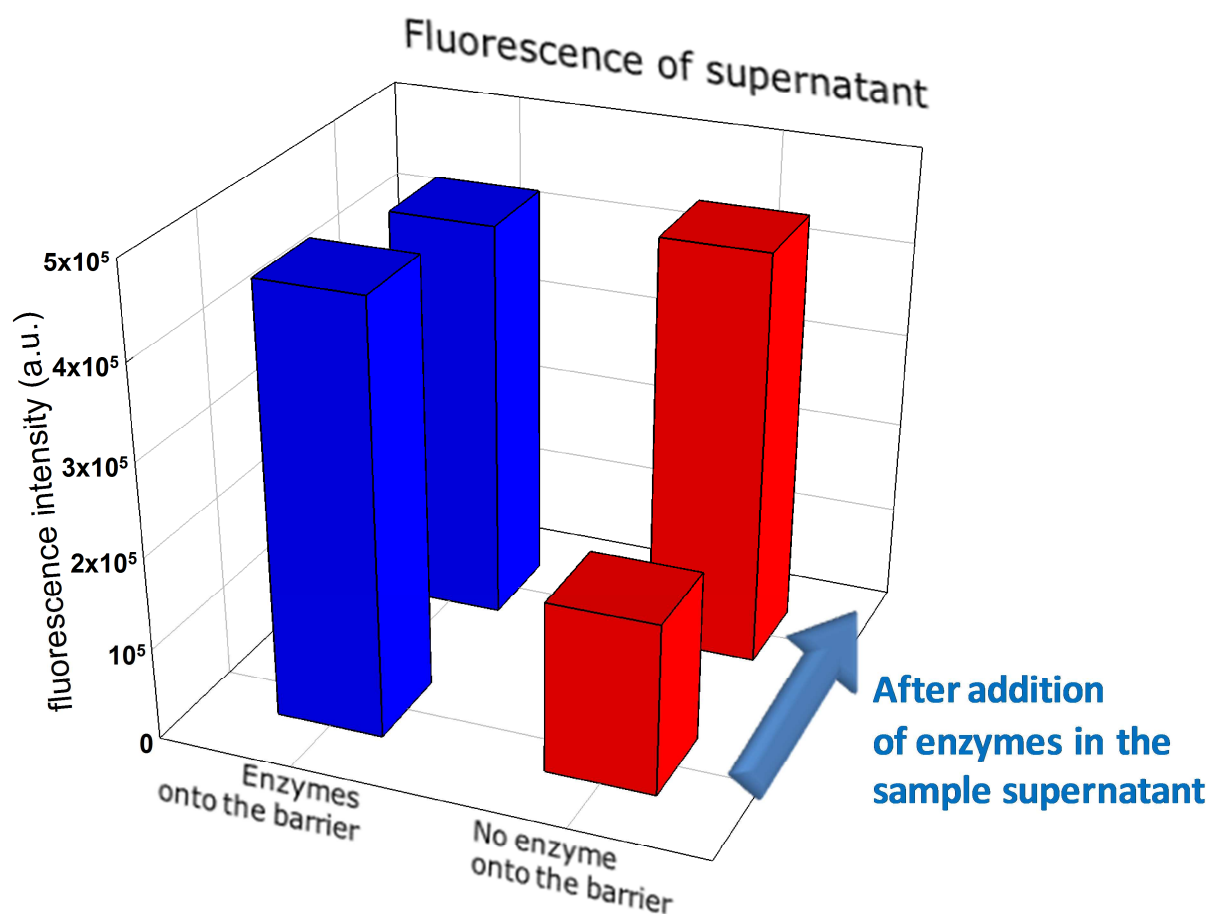
To elucidate the mechanisms involved, fluorescence intensity of the supernatant of our enzymatic platform [(PLL-HA)<sub>30</sub>/PLL/FDP/(PDADMA/PSS)<sub>10</sub>/ALP film] was measured by fluorometry 40 min after stretching the film at 100% (Figure 3.16, blue bar on the foreground). A control experiment with similar conditions but for a film without enzyme on top was also performed (Figure 3.16, red bar on the foreground). As expected, the fluorescence of the supernatant of the enzymatic platform is much higher than for the control system given by no catalysis occurs in that case. The fluorescence monitored for the control system is due to few F molecules which are probably slowly released from the film, whatever the stretching rate: it corresponds to the slope monitored for  $\alpha$  below the critical stretching degree in Figure 3.15 ( $\alpha = 0, 20, \text{ or } 40 \%$ ). In the case of the enzymatic platform, the enzymes produce a high amount of fluorescein molecules that are released in the supernatant.



*Figure 3.15: Evolution with time of mean fluorescence intensity of buffer solution in contact with a reservoir containing the enzymatic substrate and capped with a barrier layer having enzymes on the top [(PLL/HA)<sub>30</sub>/PLL/FDP/(PDADMA/PSS)<sub>10</sub>/ALP film]. Intensities were deduced from image analyses of CLSM images. Several stretching rates  $\alpha$  were applied on the film:  $\alpha = 0\%$  (black discs),  $\alpha = 20\%$  (red discs),  $\alpha = 40\%$  (green discs),  $\alpha = 60\%$  (yellow discs),  $\alpha = 80\%$  (blue discs),  $\alpha = 100\%$ , (pink discs). The error bars correspond to standard deviations calculated from image analyses. The inserts correspond to CLSM section images  $x,z$  ( $130 \times 76 \mu\text{m}^2$ ) and correspond to  $t = 1200$  s,  $t = 2800$  s and  $t = 4300$  s. All images are acquired with the same parameters.*

Then, a large excess of ALP was added to both supernatants (without any film in contact) and a second series of measurements was performed (Figure 3.16, bars on the background). The fluorescence intensities for the supernatant of the enzymatic platform and for the supernatant of the control become identical. It means that the same amount of fluorescein molecules is present in both supernatants and all FDP molecules have been transformed into fluorescein due to the addition of enzymes in the supernatant. Mainly, our enzymatic platform has the same fluorescent intensity with or without adding enzyme which means that no FDP has been released in the supernatant during the stretching. All the FDP molecules are dephosphorylated by the enzymes on top of the film and are released as fluorescein molecules (Figure 3.14, step b). To the opposite, the control experiment demonstrates that FDP is released from the film to the supernatant when

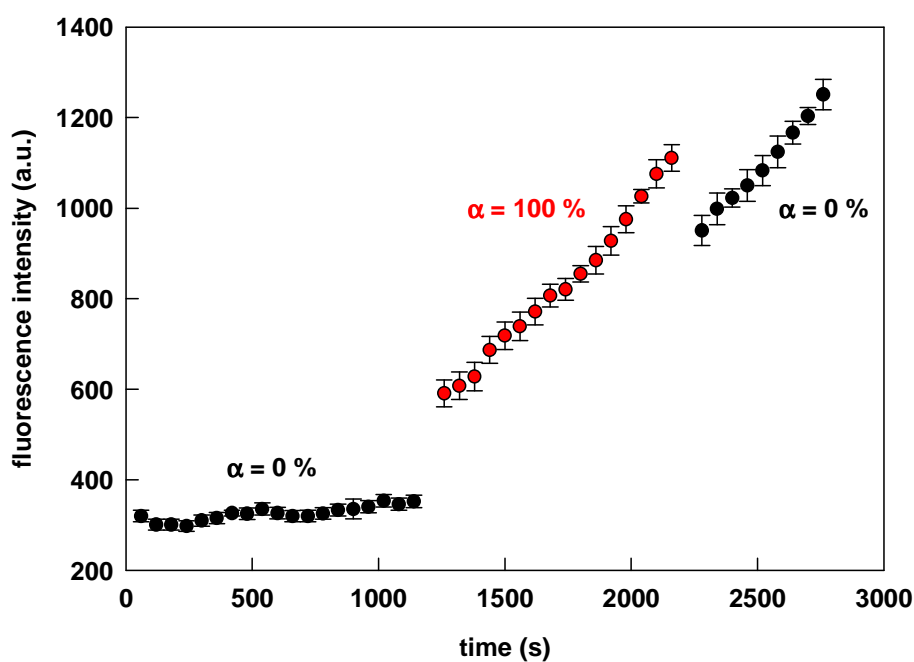
the film is stretched. This film is not covered with an enzyme layer and thus no dephosphorylation of FDP takes place. Finally, the barrier should undergo some changes due to stretching which make the barrier permeable towards FDP.



**Figure 3.16:** Fluorescence intensities of supernatants which were in contact with the enzymatic platform [(PLL-HA)<sub>30</sub>/PLL/FDP/(PDADMA/PSS)<sub>10</sub>/ALP film] (blue) and a control film [(PLL/HA)<sub>30</sub>/PLL/FDP/(PDADMA/PSS)<sub>10</sub> film] (red). The supernatants were sampled after 40 min in the stretched state ( $\alpha = 100\%$ ). Measurements are performed with a fluorometer once supernatant have been removed from top of the films. Bars on the foreground correspond to a direct measurement of fluorescence and bars on the background to a measurement of the fluorescence after an addition of a large excess of ALP in the sample solution. The standard deviations for these measurements are below  $5 \times 10^4$  a.u.

To test the reversibility of the mechanism, the enzymatic platform was stretched at  $\alpha = 100\%$  and brought back to  $\alpha = 0\%$  (Figure 3.17). No change of the rate of fluorescein production was observed, the slope is maintained during stretching and at rest. Thus, the “opening” of the barrier which occurs at stretch is not reversible. This permeability may originate from pore formation in the barrier layer. However no pores were visualized on top of the film in

the stretch state as demonstrated by AFM images (see Supplementary Fig. 3.23). We characterized the electric surface potential before and after the stretching step and no strong variations were monitored ( $-2.44 \pm 0.13$  mV and  $-4.18 \pm 0.59$  mV respectively). Moreover, there is no desorption of enzymes during all the experiments, the red fluorescence corresponding to ALP<sup>Rho</sup> observed in Figure 3.13b' remains unchanged with time, whatever the stretching rate  $\alpha$ . Finally, during the stretching step, the barrier probably becomes less dense permitting the FDP molecules to cross it.

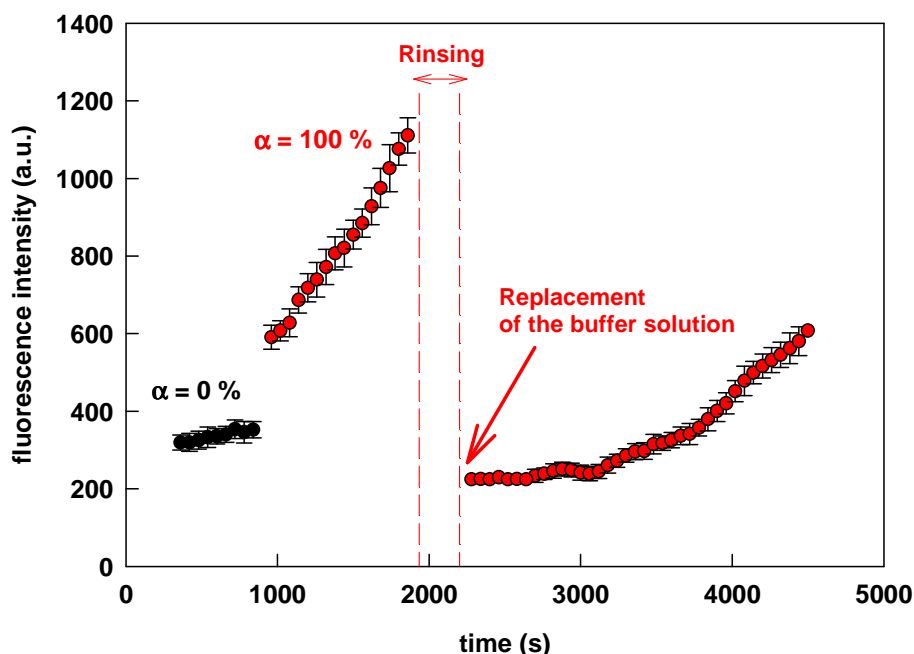


**Figure 3.17:** Evolution with time of mean fluorescence intensity of buffer solution in contact with a reservoir containing the enzymatic substrate and capped with a barrier layer having enzymes on the top [(PLL-HA)<sub>30</sub>/PLL/FDP/(PDADMA/PSS)<sub>10</sub>/ALP film]. Intensities were deduced from image analyses of CLSM images. Several stretching rates  $\alpha$  were applied on the film: it is first at rest ( $\alpha = 0\%$ , black discs), then a stretching is applied above the critical stretching degree ( $\alpha = 100\%$ , red discs), and the film is brought back at rest. The error bars correspond to standard deviations calculated from image analyses.

A new experiment was performed and consisted in stretching the enzymatic platform at  $\alpha = 100\%$  for 15 min, rinsing it for 5 min and changing the supernatant by a fresh buffer solution (Figure 3.18). Then after, the film being maintained at  $\alpha = 100\%$ , the fluorescent intensity recovers to a constant background level during ca. 15 min. The release of fluorescein is probably stopped through this period. The rinsing step at  $\alpha = 100\%$  should induce a fast release of the FDP molecules located in the upper part of the reservoir, due to the high FDP gradient from inside to outside (Figure 3.14, step c). After ca. 15 min, the release restarts again progressively and the



fluorescence intensity rises up to reach similar slope than before rinsing. Thus, when a new buffer solution is brought in contact with the film, the remaining FDP molecules deep in the film diffuse in the upper part and then are dephosphorylated by enzymes before to be released as fluorescein in the supernatant. This mechanism is thus fully diffusion-governed.



**Figure 3.18:** Evolution with time of mean fluorescence intensity of buffer solution in contact with a reservoir containing the enzymatic substrate and capped with a barrier layer having enzymes on the top [(PLL/HA)<sub>30</sub>/PLL/FDP/(PDADMA/PSS)<sub>10</sub>/ALP film]. Intensities were deduced from image analyses of CLSM images. Several stretching rates  $\alpha$  were applied on the film: first, the enzymatic platform is at rest ( $\alpha = 0\%$ , black discs) and then a stretching is applied above the critical stretching degree ( $\alpha = 100\%$ , red discs). After ca. 15 min, a rinsing step of 5 min is performed and supernatant is replaced by a fresh buffer solution. The error bars correspond to standard deviations calculated from image analyses.

Finally, Figure 3.14 overviews the concept and the mechanism of *stretch-induced reactive release*. The designed enzymatic platform allows to trigger enzymatic reactions through a mechanical stimulus. Both enzymes and substrates are initially embedded in the polymeric architecture with no reaction occurring and a mechanical stress applied to the system is necessary to initiate the catalysis. This reaction takes place without any feedback inhibition process and lead to a release of the catalysed products according to a linear profile with time. The mechanism behind this corresponds to conversion of substrates by enzymes located at the film/solution interface followed by diffusion of the products out of the film. This platform can constitute a first step towards administration of prodrugs from biomaterial coatings. Prodrugs could be stored in

the reservoir and converted enzymatically into drugs while crossing the enzymatic barrier layer. Activation of this reactive release could be obtained by a local mechanical stimulus.

### **3.2.2.2. *Materials and methods***

*The “materials and methods” section is available in Annexe 1.*

### **3.2.2.3. *Supporting information***

Figures 3.19 to 3.23 are available hereafter.

Figure 3.19: Quartz crystal microbalance measurements: adsorption of ALP

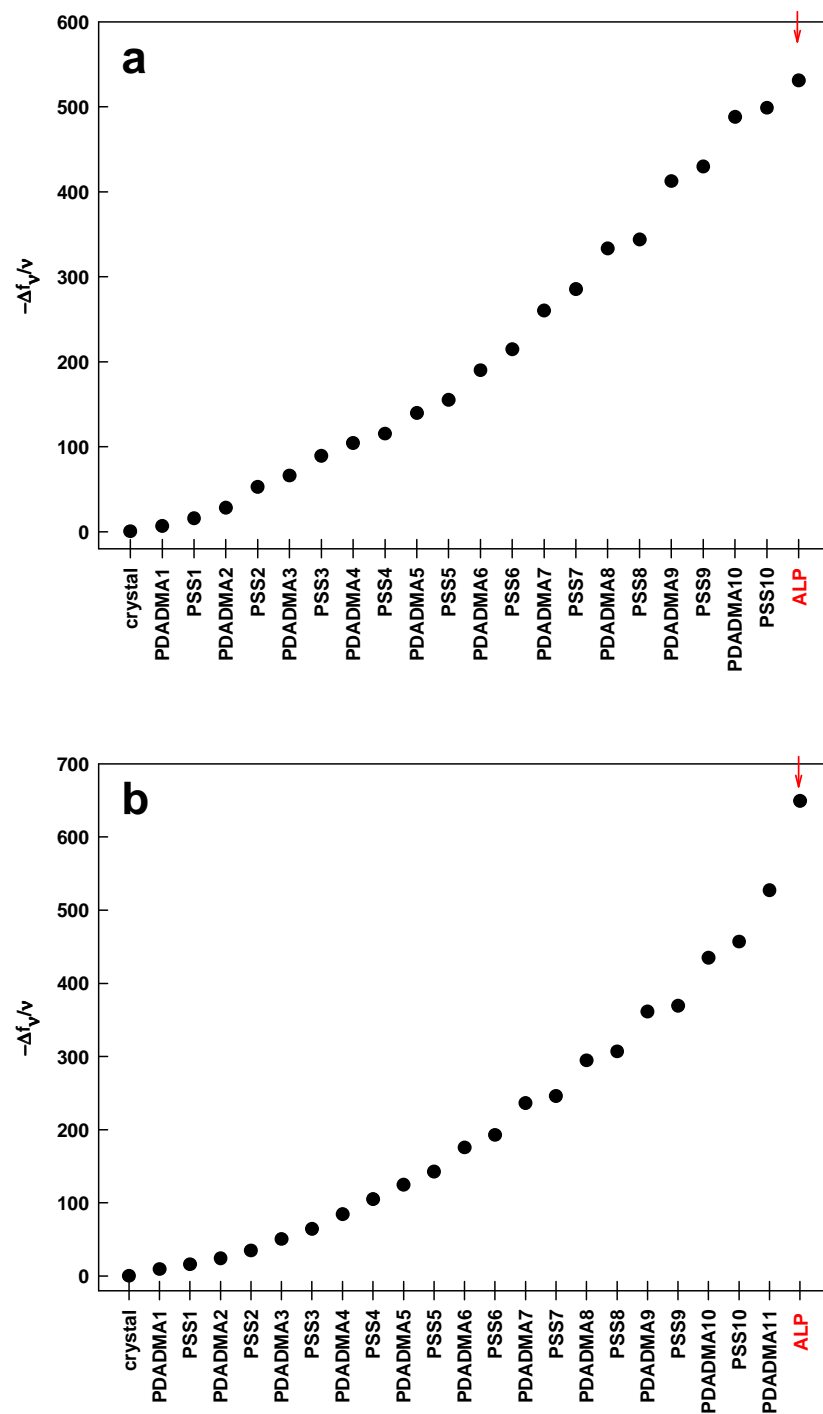
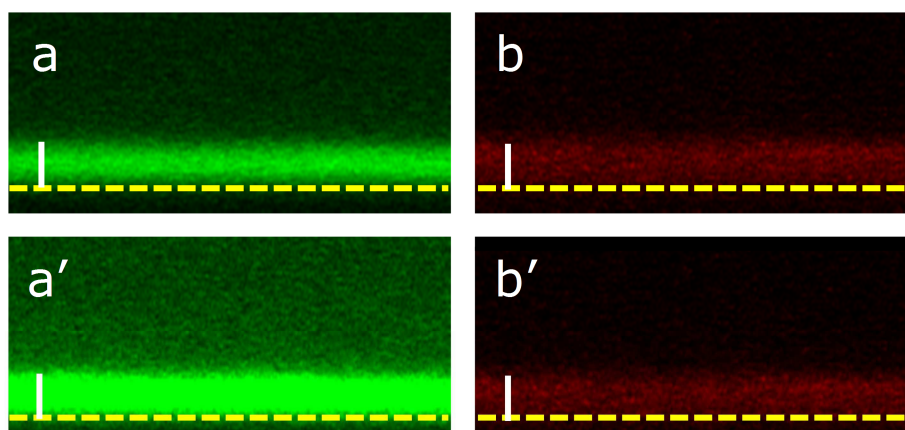


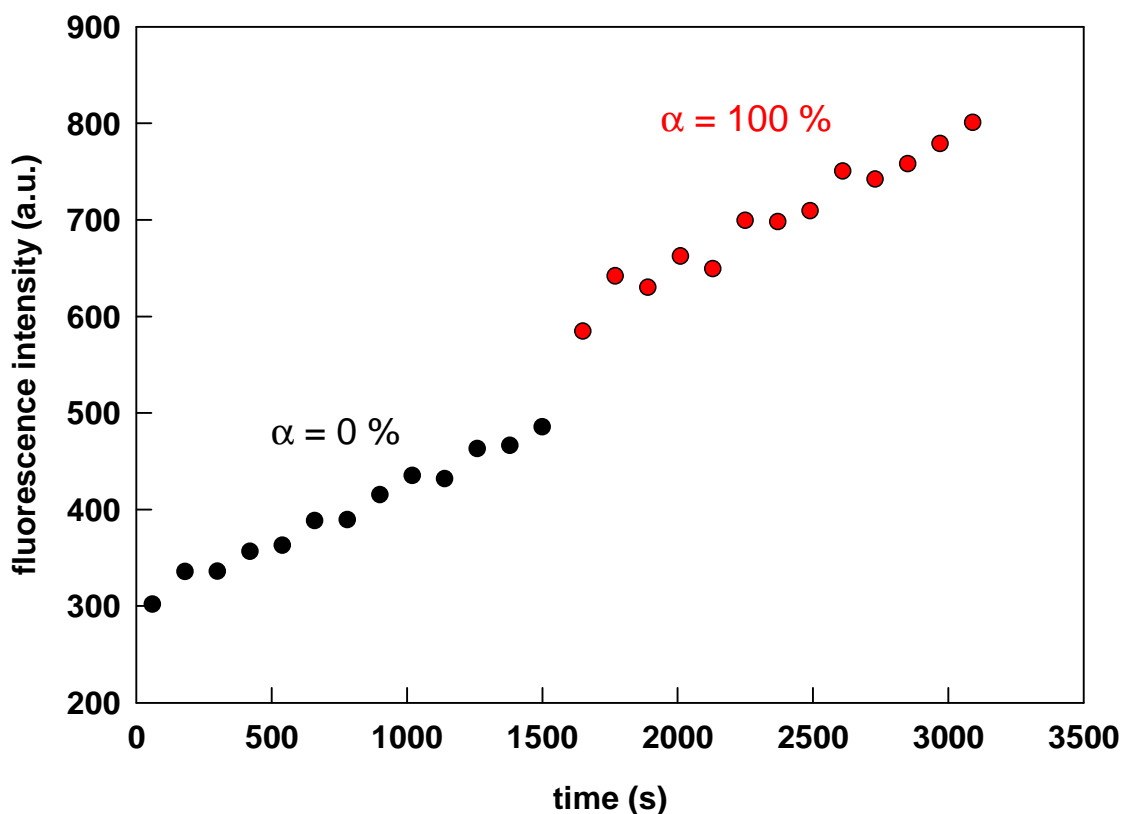
Figure 3.19: Quartz crystal microbalance measurements monitoring the build-up of PDADMA/PSS multilayer films and the adsorption of alkaline phosphatase (ALP) on PSS (a) or on PDADMA (b) terminating film. The surface mass densities of ALP deposited on the PSS or on the PDADMA terminating films, estimated by the Sauerbrey relation [Sauerbrey 1959], correspond to 450 and 2130  $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$  respectively.

**Figure 3.20:** CLSM sections: if the barrier is terminated by PDADMA



**Figure 3.20:** Green (a,a') and red (b,b') channels of confocal microscope section (x,z) images of a silicone sheet coated with a reservoir containing enzyme substrates (PLL/HA)<sub>15</sub>/PLL/FDP covered by a barrier with enzymes adsorbed on top (end of the rinsing step at  $t = 0$ ) (PDADMA/PSS)<sub>10</sub>/PDADMA/ALP<sup>Rho</sup>. Images were acquired at  $t = 120$  s (a,b) and  $t = 300$  s (a',b'). The dashed lines indicate interface between the silicone sheet and the film. All images are obtained with the same microscope adjustments. The yellow dotted line corresponds to the upper surface of the silicone sheet. The white line is an 8  $\mu\text{m}$ -scale.

**Figure 3.21:** Time evolution of fluorescence intensity of the supernatant of the system with no enzyme on top



**Figure 3.21:** Evolution with time of mean fluorescence intensity of buffer solution in contact with a reservoir containing the enzymatic substrate and without enzymes on the top [(PLL/HA)<sub>30</sub>/PLL/FDP/(PDADMA/PSS)<sub>10</sub> film]. Intensities were deduced from image analyses of CLSM images. Several stretching rates  $\alpha$  were applied on the film:  $\alpha = 0\%$  (black discs),  $\alpha = 100\%$  (red discs). The slope in both cases is  $\approx 0.13$  a.u./s.

Figure 3.22: Time evolution of fluorescence intensity of the supernatant of the enzymatic platform with a 10- or 20-bilayers barrier

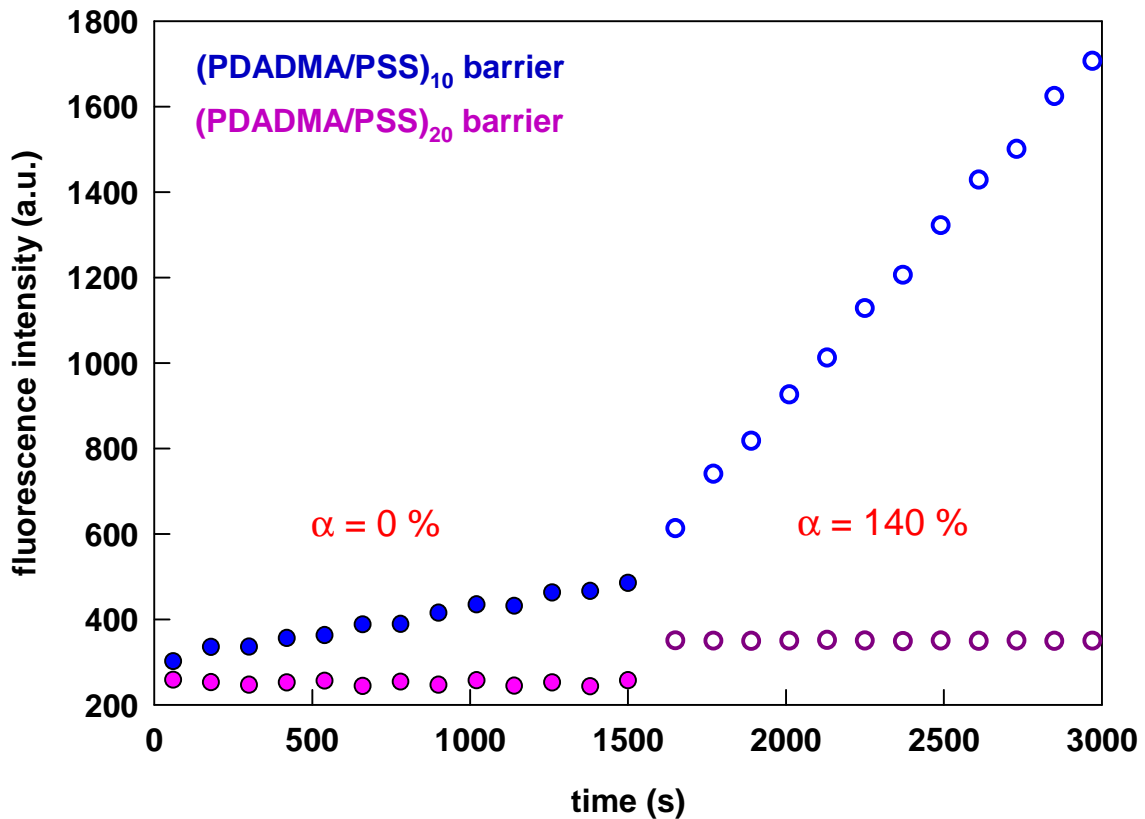
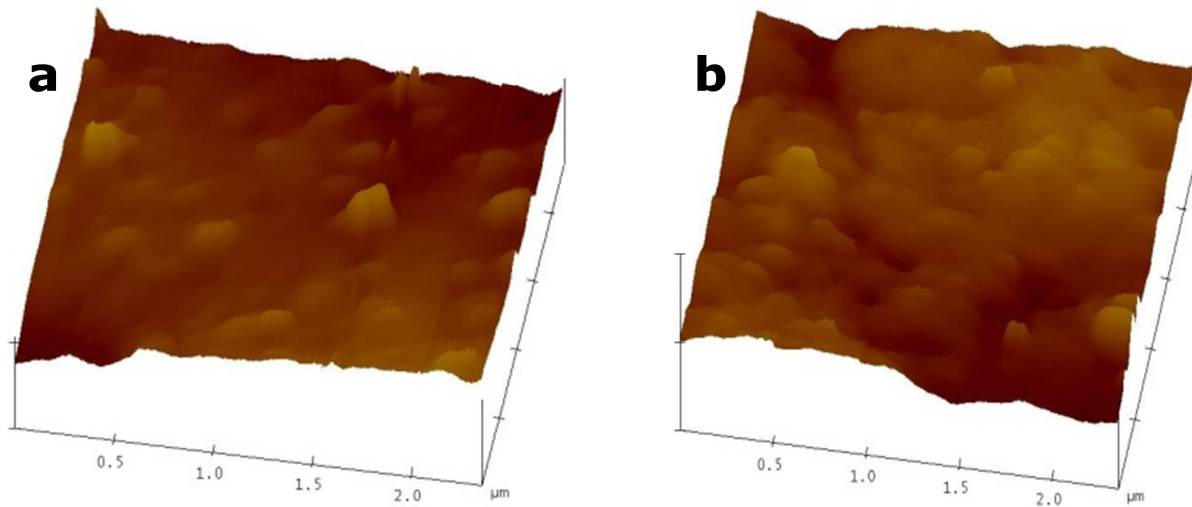


Figure 3.22: Evolution with time of mean fluorescence intensity of buffer solution in contact with a reservoir containing the enzymatic substrate and capped with a barrier layer having enzymes on the top. Two films composed of a thin (10 bilayers) or a thick (20 bilayers) barrier are tested :  $(PLL/HA)_{30}/PLL/FDP/(PDADMA/PSS)_{10}/ALP$  (blue) or  $(PLL/HA)_{30}/PLL/FDP/(PDADMA/PSS)_{20}/ALP$  (pink). These films are in the non-stretched state  $\alpha = 0\%$  (discs) and then at  $\alpha = 140\%$  (circles). Intensities were deduced from image analyses of CLSM images.

**Figure 3.23:** AFM images of the enzymatic platform at rest and when stretched



**Figure 3.23:** AFM images of a reservoir functionalized with FDP and capped with a barrier layer having enzymes on the top [(PLL/HA)<sub>30</sub>/PLL/FDP/(PDADMA/PSS)<sub>10</sub>/ALP film]. The film is observed a) in the non-stretched state ( $\alpha = 0\%$ ) and b) for a stretching rate of  $\alpha = 100\%$ . Images size are  $2.5\ \mu\text{m} \times 2.5\ \mu\text{m}$  and Z scale is 150 nm. The mean roughness was 11 nm for both images.





### **3.3. Systèmes polymériques manipulables pour l'étirement d'enzymes à l'échelle moléculaire**

Cette partie traite des résultats des deux études réalisées afin d'élaborer des systèmes polymériques permettant l'étirement local d'enzymes. Une première section 3.3.1 est consacrée à l'approche utilisant des films multicouches de polyélectrolytes chargés avec des enzymes puis réticulés chimiquement. La seconde section 3.3.2 est relative au design de gels de polyacrylamide contenant des enzymes.

#### **3.3.1 Films multicouches réticulés**

Afin d'étirer localement des enzymes enfouies dans une matrice *via* une manipulation macroscopique, les enzymes ont été incorporées dans des films multicouches (PLL/HA)<sub>24</sub> puis réticulées en leur sein. L'objectif est de transformer le film PLL/HA, initialement à l'état de liquide visqueux, en un film plus rigide comportant les enzymes couplées au réseau. Ce film, lors de son étirement, ne doit cependant pas être cassant.

##### **3.3.1.1. Etat de l'art sur la réticulation**

La première méthode qui a été utilisée pour réticuler des films construits couche-par-couche est une méthode chimique utilisant le glutaraldéhyde. Il s'agit d'une molécule homobifonctionnelle réagissant avec les amines, qui permet de lier notamment des chaînes de polymères ou des protéines entre elles disposant de ces fonctions amine. Ainsi, plusieurs systèmes construits couche-par-couche ont été réticulés de cette façon : HSA / héparine [Brynda & Houska 1996], chitosane / sulfate de chitosane [Leporatti, Voigt et al. 2000], chitosane / alginate [Alves, Picart et al. 2009].

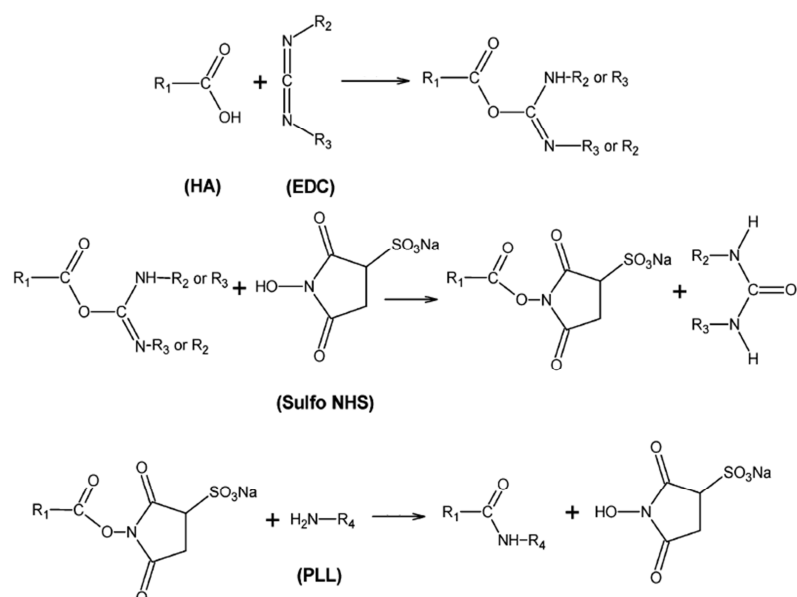
Il est également possible de réticuler des films en les irradiant avec des rayons UV ou en les chauffant. Dans le premier cas, certains constituants des films ont été modifiés afin d'être réactifs sous UV. Par exemple, un polymère fonctionnalisé avec des fonctions diazo a été associé aux chaînes de PSS dans un films construit couche-par-couche pour être réticulé sous UV [Chen, Huang et al. 1999]. Dans un autre cas, un PDADMA a été modifié avec une fonction styrène et

associé à une argile dans un film multicouche. Une irradiation UV a permis de réticuler le film hybride [Vuillaume, Jonas et al. 2002]. Un apport de chaleur permet également une réticulation, notamment pour un film PAH/PAA, *via* la formation de fonctions amide [Harris, DeRose et al. 1999]. La température peut également permettre de former des fonctions imide, entre un PAA et un copolymère d'acide maléique par exemple [Lee & Kunitake 1994].

Il existe également une autre méthode chimique qui permet de lier les fonctions acide carboxylique et amine de deux molécules afin de créer une liaison peptidique. L'utilisation du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) a effectivement permis de lier des protéines par des fonctions amide dès 1977 [Timkovich 1977]. Plus tard, cette molécule a été utilisée pour former des fonctions ester entre les chaînes d'acide hyaluronique en solution [Tomihata & Ikada 1997]. Ensuite, l'EDC a été utilisé pour réticuler une matrice poreuse de collagène et de HA. Ce sont là deux types de fonctions, amide et ester, qui ont été formées, rendant la membrane plus résistante à la digestion enzymatique [Park, Park et al. 2002]. Enfin, l'EDC a été utilisé pour réticuler un film multicouche de polyélectrolytes PAH/PAA [Schuetz & Caruso 2003].

Il s'avère qu'il est possible d'améliorer grandement la vitesse de cette réaction de EDC en ajoutant du N-hydroxysuccinimide (NHS) ou du N-sulfohydroxysuccinimide (sulfo-NHS) au milieu réactionnel (figure 3.24) [Hermanson 2008]. Dès 1990, Grabarek et al. ont montré que NHS permettait de générer un ester intermédiaire sur une première protéine à partir de l'ester formé initialement avec EDC, qui est plus stable et qui est capable ensuite de réagir avec l'amine d'une autre protéine [Grabarek & Gergely 1990]. Cela a permis de fabriquer des films protéiques stables pouvant servir de base à la fabrication de nouveaux biomatériaux [Tengvall, Jansson et al. 2003].

Ainsi, les films PLL/HA ont pu être réticulés avec un mélange EDC/sulfo-NHS, ce qui a permis de rigidifier grandement le film et par conséquent a favorisé l'adhésion cellulaire [Richert, Boulmedais et al. 2003]. Le film réticulé s'est également révélé très résistant à la hyaluronidase (contrairement au film non réticulé). Il a également été constaté que la diffusion des chaînes de PLL habituellement observée dans un film PLL/HA avait été énormément diminuée sous l'effet de la réticulation [Richert, Boulmedais et al. 2003]. Les films PLL/PGA ont également été réticulés de la sorte, ce qui a permis d'augmenter considérablement la prolifération cellulaire en surface du film [Picart, Elkaim et al. 2005].



**Figure 3.24 :** Schéma réactionnel de la formation d'une liaison amide entre deux molécules, dotées respectivement d'un acide carboxylique et d'une amine primaire, en présence de EDC et sulfo-NHS [Richert, Boulmedais et al. 2003].

### 3.3.1.2. Résultats

Une première phase de l'étude a consisté à déterminer les meilleures conditions de réticulation des films PLL/HA afin de conserver un film étirable et non cassant. Pour cela, les films ont été construits couche-par-couche à l'aide du robot (voir partie 2.1.3) sur une feuille de silicone jusqu'à atteindre 24 paires de couches. Le temps de dépôt était fixé à 5 minutes et les rinçages, au nombre de deux, duraient chacun 5 minutes. Une dernière couche de PLL marquée à la FITC (noté PLL<sup>FITC</sup>) a ensuite été déposée manuellement dans les mêmes conditions. Puis, la solution tampon NaCl/TRIS utilisée en tant que tampon lors de la construction du film a été remplacée par une solution de NaCl à 0.15 mol/L, dont le pH a préalablement été ajusté à 5.5. En effet, la présence de TRIS n'est pas souhaitable car il possède des amines primaires. Le pH a été choisi légèrement acide, car c'est un bon compromis pour favoriser à la fois l'activation des acides carboxyliques par EDC et un bon rendement de formation des liaisons amides [Hermanson 2008].

Différentes conditions de réticulation utilisant EDC et sulfo-NHS ont ensuite été testées, de façon à obtenir un système doté d'une certaine rigidité, correspondant à une réticulation significative. A l'inverse, il s'agit aussi d'obtenir un système PLL/HA qui ne soit pas trop réticulé afin d'éviter qu'il ne devienne cassant sous étirement. L'objectif est de pouvoir étirer le film à 100 % sans que l'on observe de fissures dans le film polymérique par microscopie optique.

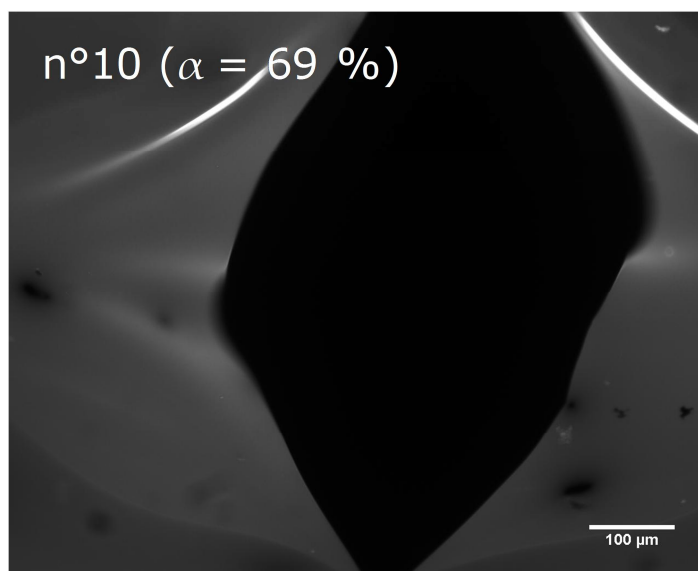
La réticulation a été réalisée en mettant une solution de EDC et de sulfo-NHS au contact d'un film (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL<sup>FITC</sup> en milieu NaCl 0.15 mol/L et à pH 5.5 pendant une durée déterminée et à une température de 4 °C. Trois rinçages de 1h avec la solution de NaCl ont terminé la procédure, puis un dernier rinçage avec la solution tampon NaCl/TRIS à pH 7.4 a finalement été réalisé. Afin de caractériser rapidement la résistance à l'étirement des films réticulés, ceux-ci ont été observés à l'aide d'un microscope à épifluorescence doté d'une caméra CCD. A partir de ces observations, un taux critique d'étirement a été défini et correspond à l'étirement maximal atteint avant l'apparition de fissures. Le tableau 3.1 ci-dessous présente les principales conditions testées, ainsi que les résultats obtenus.

Essai n°	[EDC] (10 <sup>-3</sup> mol/L)	[NHS] (10 <sup>-3</sup> mol/L)	Durée de réticulation (heures)	Taux critique d'étirement (± 5%)
1	200	50	1	44 %
2	200	50	2	32 %
3	200	50	19	18 %
4	2	0.5	2	Pas de cassure
5	20	50	15	161 %
6	50	50	15	68 %
7	100	50	15	54 %
8	20	50	19	163 %
9	40	50	19	76 %
10	50	50	19	69 %

**Tableau 3.1 :** Récapitulatif des tests réalisés pour l'optimisation de la réticulation de films (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL<sup>FITC</sup> avec EDC et sulfo-NHS. Les colonnes [EDC] et [NHS] correspondent aux concentrations molaires dans le mélange réticulant de EDC et sulfo-NHS respectivement. Le taux critique d'étirement a été évalué optiquement.

Francius et al. ont démontré que les conditions de concentrations en EDC et NHS correspondant aux essais 1 à 3 permettent une réticulation maximale au bout de 18 heures [Francius, Hemmerlé et al. 2006]. Il apparaît que pour l'échantillon n°3 préparé avec 19 heures de réticulation, le taux critique d'étirement est très faible. A 18 % en effet, des fissures perpendiculaires à la direction d'étirement apparaissent sur quasiment la totalité de la largeur de l'échantillon. Lorsque les concentrations des deux composés est divisée par 100 et le temps réduit à 2h (échantillon n°4), les films ne présentent pas de fissures jusqu'à 250 % d'étirement (étirement maximal pouvant être imposé). Cependant il est fort possible que cet échantillon soit

pratiquement identique à son état natif, c'est-à-dire qu'il n'y ait pratiquement aucun groupement réticulé. Si  $[NHS] = 50 \text{ mM}$  et  $40 \leq [EDC] \leq 100 \text{ mM}$ , les fissures apparaissent à partir d'un taux d'étirement compris entre 50 et 80 % (figure 3.25). Cependant, pour obtenir un taux critique au-delà de 100 %, il a fallu réduire la concentration de EDC à 20 mM (échantillons 5 et 8). Diminuer le temps de réticulation de 19 à 15h ne semble rien changer de significatif à ce résultat. Au final, avec  $[NHS] = 50 \text{ mM}$  et  $[EDC] \approx 20 \text{ mM}$ , un taux critique de 160 % est obtenu.



**Figure 3.25 :** Image réalisée par microscopie à épifluorescence de la surface de l'échantillon n°10 du tableau 3.1 (film  $(PLL/HA)_{24}/PLL^{FITC}$  réticulé selon les conditions précisées). Il est soumis à un étirement et présente des fissures à partir d'un taux critique de 69 % d'étirement (étirement selon la direction horizontale). L'image est en niveaux de gris correspondant à la fluorescence aux longueurs d'excitation 465-495 nm et d'émission 515-555 nm.

Ensuite un film  $(PLL/HA)_{24}/PLL$  a été mis en contact avec une solution de phosphatase alcaline à 0.5 mg/mL (ALP) pendant 30 minutes afin de permettre sa fonctionnalisation. Après cette phase de dépôt, le film a été rincé trois fois pendant 10 minutes. Les images de sections de film  $(PLL/HA)_{30}/PLL/ALP^{Rho}/(PLL/HA)_2$  et  $(PLL/HA)_{30}/PLL/ALP^{FITC}/(PLL/HA)_2$  (CLSM) ont été publiées dans un article récent (Annexe 2) [Mertz, Vogt et al. 2011]. L'enzyme diffuse dans toute la section des films  $(PLL/HA)_n$  et s'y distribue de façon homogène.

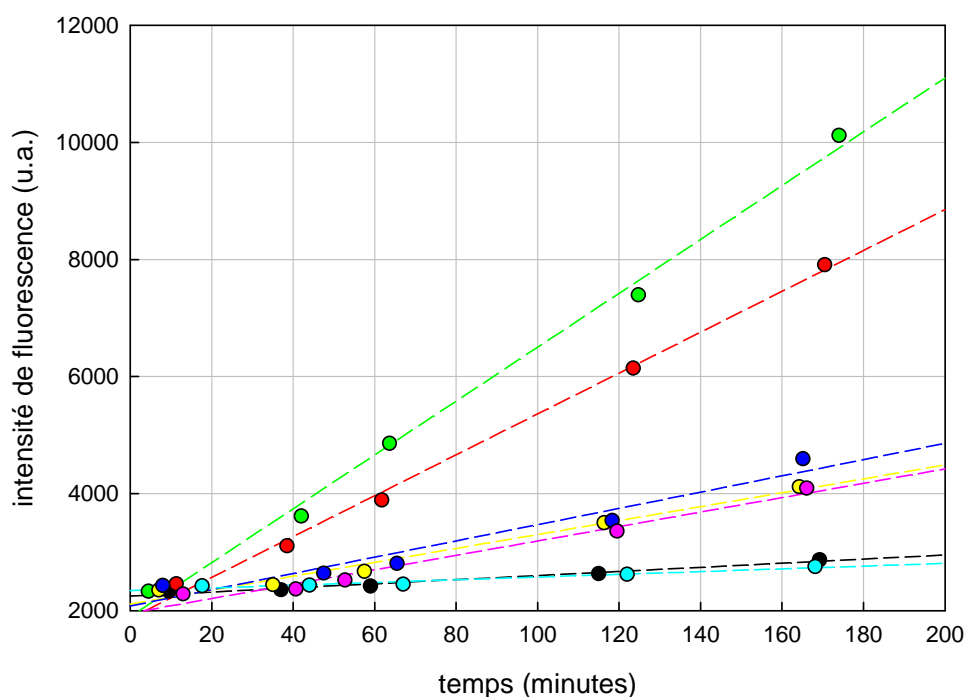
L'étape suivante a consisté à comparer l'activité enzymatique de ces films  $(PLL/HA)_{30}/PLL/ALP/PLL/HA$  « natifs » à celle des mêmes films réticulés. Pour réaliser cette réticulation, les films ont été mis au contact d'1 mL d'un mélange d'EDC, à concentration

variable, et de sulfo-NHS, dont la concentration a été fixée à 50 mM. Pour mesurer l'activité enzymatique, une solution de FDP à 0.1 mg/mL est déposée sur les films dont la préparation est achevée et l'évolution de l'intensité de fluorescence de cette solution a été mesurée sur près de 3 h par fluorimétrie (figure 3.26). Plusieurs films ont ainsi été testés et également certains films « contrôle » ont fait l'objet de mesures de l'activité enzymatique :

- un film (PLL/HA)<sub>30</sub>/PLL/ALP/PLL/HA non réticulé (cercles verts sur la figure 3.26) ;
- un film (PLL/HA)<sub>30</sub> réticulé pendant 18 h avec [EDC] = 14 mM, puis rincé pendant 5 min (au lieu de 3 × 1 h), et enfin mis en contact avec l'ALP (0.5 mg/mL dans un tampon NaCl/TRIS à pH 7.4 pendant 30 minutes, puis 3 × 10 min de rinçage) (cercles rouges dans la figure 3.26) ;
- un film (PLL/HA)<sub>30</sub>/PLL/ALP/PLL/HA réticulé pendant 18 h avec [EDC] = 2 mM (cercles jaunes dans la figure 3.26) ;
- un film (PLL/HA)<sub>30</sub>/PLL/ALP/PLL/HA réticulé pendant 18 h avec [EDC] = 5 mM (cercles bleu foncé dans la figure 3.26) ;
- un film (PLL/HA)<sub>30</sub>/PLL/ALP/PLL/HA réticulé pendant 18 h avec [EDC] = 7 mM (cercles fushia dans la figure 3.26) ;
- un film (PLL/HA)<sub>30</sub>/PLL/ALP/PLL/HA réticulé pendant 18 h avec [EDC] = 14 mM (cercles bleu cyan dans la figure 3.26) ;
- un film (PLL/HA)<sub>30</sub> réticulé pendant 2 h avec [EDC] = 14 mM – sans rinçage final – et où, à cet instant, 350 µL d'une solution d'ALP (0.5 mg/mL dans un tampon NaCl/TRIS à pH 7.4) a été ajoutée au mélange réticulant pendant 16h (cercles noirs dans la figure 3.26).

Trois tendances se dégagent des résultats de la figure 3.26 :

**Cas 1.** Lorsque le film PLL/HA contenant l'ALP n'est pas réticulé, l'activité enzymatique est maximale, avec une pente de 46 u.a./min. Il semble que l'enzyme est effectivement chargée dans le système après réticulation (ceci n'était pas certain *a priori* car les charges du film multicouche réticulé sont moins nombreuses que dans un film multicouche natif), mais dans ce cas la pente est réduite à 35 u.a./min, ce qui correspond à 24 % de perte d'activité (cercles rouges).



**Figure 3.26:** Evolution en fonction du temps de l'intensité de fluorescence d'une solution de FDP à 0.1 mg/mL mise en contact avec un système PLL/HA fonctionnalisé avec l'ALP (cercles verts) et avec les différents systèmes PLL/HA fonctionnalisés avec l'ALP et réticulés (autres couleurs : voir détails dans le texte). Les intensités sont mesurées à l'aide d'un fluorimètre.

Cette diminution peut être expliquée par le fait qu'il restait un petit nombre de molécules réticulantes réactives lors du dépôt de l'enzyme, car le rinçage réalisé après réticulation n'a été que de 5 minutes. Une deuxième hypothèse serait que la quantité d'ALP adsorbée dans le film réticulé soit plus faible que dans un film natif.

**Cas 2.** Lorsque la réticulation est réalisée après dépôt de l'enzyme, la diminution d'activité s'amplifie. Ainsi, pour des réticulations avec une concentration en EDC inférieure ou égale à 7 mM, l'activité est réduite à  $13 \pm 1$  u.a./min, soit une perte de 72 % d'activité par rapport à un film enzymatique non réticulé. Dans ce cas, la réticulation désactive une grande fraction des enzymes en les dénaturant probablement.

**Cas 3.** Lorsque la concentration en EDC utilisée est supérieure ou égale à 14 mM, l'activité s'atténue encore plus : la pente n'est plus que de 2 u.a./min, soit 96 % de perte. Pratiquement toutes les enzymes sont alors désactivées.

Le but de cette étude n'est pas *a priori* de rompre des liaisons covalentes par étirement, afin de générer une activité enzymatique. Il s'agit plutôt d'avoir un système où les enzymes sont

étirées localement suite à une action macroscopique. À terme on souhaite disposer d'un système réversible, c'est-à-dire qu'après une phase d'étirement, le système au repos démontre à nouveau une activité catalytique.

Pour atteindre ces objectifs, il est préférable qu'il demeure une activité enzymatique significative dans les films au repos et qu'une importante proportion d'enzymes soient fixées. Afin d'être dans ce cas de figure, la réticulation doit être faite après insertion des enzymes dans les films PLL/HA et avec des concentrations de EDC situées entre 2 mM et 7 mM.

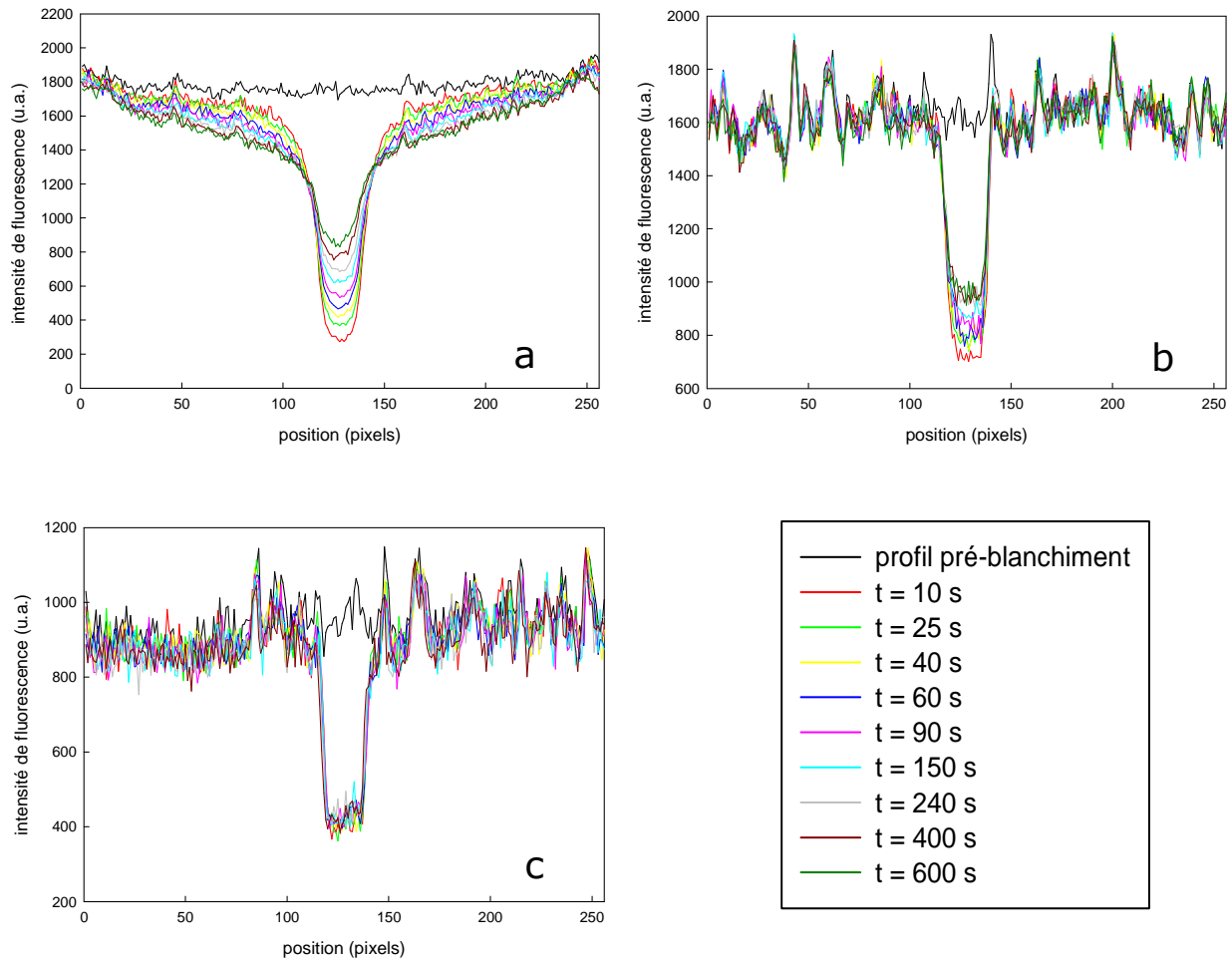
Pour s'assurer que les enzymes soient couplées de façon covalente au gel, nous avons entrepris de réaliser des expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP). Pour cela, l'ALP a été marquée avec de la FITC (procédure décrite dans la partie 2.1.6) puis utilisée ainsi. Le protocole décrit en partie 2.2.5 a été appliqué : chaque résultat est un ensemble de profils d'intensité de fluorescence mesurés à différents temps postérieurs à la fin du photoblanchiment. Les profils caractéristiques obtenus sont représentés en figure 3.27. Le graphique *a*) correspond aux systèmes où le film n'est pas réticulé (cas 1 décrit précédemment), le graphique *b*) aux systèmes intermédiaires (cas 2,  $2 \text{ mM} \leq [\text{EDC}] \leq 7 \text{ mM}$ ) et le graphique *c*) correspond aux systèmes où le film est fortement réticulé (cas 2,  $[\text{EDC}] = 14 \text{ mM}$ ).

Les systèmes où la concentration en EDC est élevée et les films fortement réticulés ne présentent quasiment pas de recouvrement de fluorescence sur une échelle de temps de 10 minutes (graphique *c*). Ceci indique que l'ALP<sup>FITC</sup> n'est pas mobile est a donc probablement été réticulée avec le film PLL/HA. Par contre lorsque la réticulation du film est moindre ou nulle (graphiques *b* et *a* respectivement), il y a une mobilité significative de l'ALP<sup>FITC</sup>. Sans aucune réticulation, le recouvrement ne s'arrête pas au bout de 10 minutes (graphique *a*). Dans le cas avec EDC à 5 mM (graphique *b*) la proportion d'enzymes immobilisées peut être estimée en utilisant une formule simple, obtenue à partir de la loi de Fick (voir annexe 3 pour les détails des calculs) :

$$\frac{c(0, t \rightarrow \infty)}{c_0} = \alpha + p (1 - \alpha) \quad (\text{annexe 3 équation 12})$$

où  $c$  correspond à la concentration en ALP<sup>FITC</sup> au centre du rectangle blanchi à  $t \rightarrow \infty$  et  $c_0$  à la concentration en ALP<sup>FITC</sup> très loin du rectangle blanchi.  $\alpha$  représente la concentration résiduelle en ALP<sup>FITC</sup> au centre du rectangle à  $t = 0$  et  $p$  la proportion de molécules mobiles.





**Figure 3.27 :** Profils de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment. La partie centrale (entre 115 et 140 pixels sur l'axe des  $x$ ) correspond à chaque fois à la zone blanchie (fin du blanchiment à  $t = 0$  s). Les profils de fluorescence sont acquis pour différents temps postérieurs au blanchiment comme indiqué sur la légende. Le traitement utilisé pour extraire les courbes à partir des images brutes obtenues par microscopie confocale est décrit dans la partie 2.2.5. Les échantillons sont : (a) un film PLL/HA chargé avec l'ALP<sup>FITC</sup> ; (b) un film PLL/HA chargé avec l'ALP<sup>FITC</sup> puis réticulé avec [EDC] = 5 mM ; (c) un film PLL/HA chargé avec l'ALP<sup>FITC</sup> puis réticulé avec [EDC] = 14 mM.

En considérant que la concentration est proportionnelle à l'intensité de fluorescence, il est possible de déterminer  $c$ ,  $c_0$  et  $\alpha$ , et donc de calculer  $p$  pour le cas où le film chargé avec les enzymes a été réticulé avec une concentration en EDC de 5 mM (graphique c) :

$$\frac{c(0, t \rightarrow \infty)}{c_0} = \frac{950}{1600} = \frac{700}{1600} + p \left( 1 - \frac{700}{1600} \right)$$

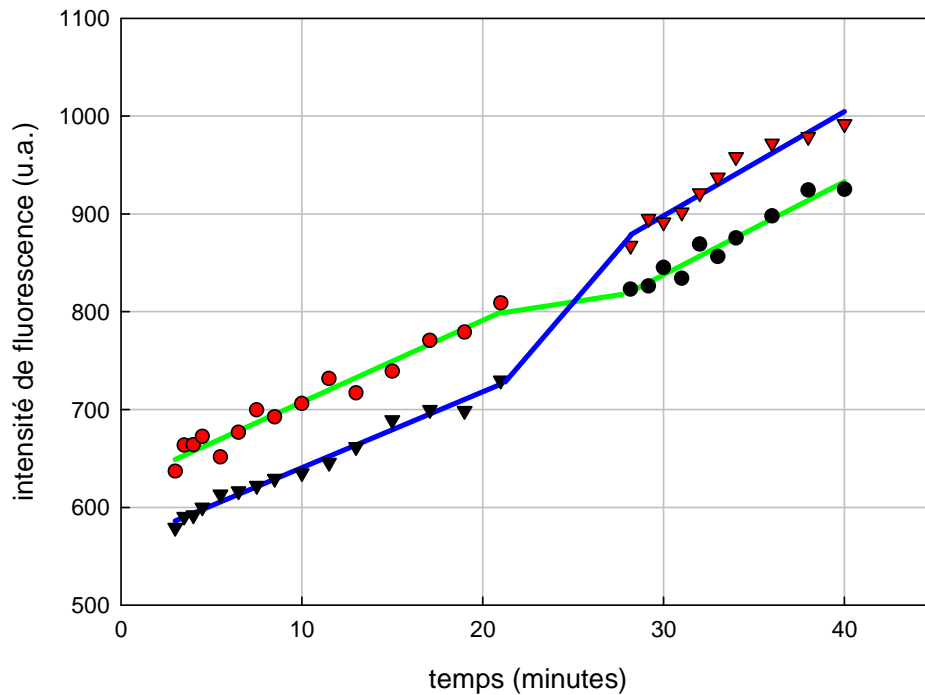
$$\Rightarrow p = \frac{250}{900} \approx 28\%$$

Ainsi, il apparaît que 72 % des enzymes ALP<sup>FITC</sup> sont immobiles. Ce cas semble donc être un bon compromis : une activité enzymatique significative demeure (cercle bleus de la figure 3.26) alors qu'une grande partie des enzymes introduites sont fixées au réseau de film PLL/HA.

A ce stade, il est donc possible de fabriquer un film PLL/HA chargé avec l'ALP de telle sorte que près de trois quarts d'entre elles soient fixées au réseau et que 30% environ de l'activité enzymatique soit conservée. L'étape suivante consiste à étudier l'effet d'un étirement mécanique sur l'activité du film. Pour cela, le film multicouche (PLL/HA)<sub>30</sub>/PLL/ALP/PLL/HA a été construit sur une feuille de PDMS selon la méthode employée précédemment. Celui a alors été réticulé selon la procédure décrite plus haut en utilisant [EDC] = 5 mM, [sulfo-NHS] = 50 mM. Il a ensuite été placé au contact d'une solution de FDP à 100 µg/mL, et l'intensité de fluorescence du surnageant a été suivie *in situ* en utilisant la microscopie confocale (de façon identique à la méthode décrite au chapitre 3.1).

Deux types d'expériences ont été réalisés : dans un cas, la solution de FDP a été amenée au contact du film au repos, qui a ensuite été étiré (figure 3.28, triangles et ligne bleue). Dans un second cas, cette solution a été mise au contact du film lorsque celui-ci était déjà étiré, et l'expérience a alors consisté à revenir au repos (figure 3.28, cercles et ligne verte). Les résultats confirment qu'il existe bien une activité enzymatique du système au repos puisque l'intensité augmente en fonction du temps. A l'état étiré, cette activité est également présente. Cependant, l'étirement du système, même à 100%, ne permet pas de modifier la pente de l'intensité en fonction du temps. Un retour au stade non-étiré ne change pas non plus l'activité. Il n'y a pas d'incidence de l'étirement sur l'activité des enzymes.

Ainsi, il est possible que les enzymes fixées (1/4 de la population totale) soient également celles qui sont désactivées. Elles seraient déjà désactivées au repos en raison de l'étape de réticulation qui a pu endommager leur site actif. L'étirement du système ne permet pas de diminuer l'activité des enzymes non-couplées puisque celles-ci ne ressentent probablement pas à leur échelle une contrainte suffisante pour induire une dénaturation. Le système de films PLL/HA enzymatique réticulé utilisé n'étant pas d'une très grande rigidité (pas de fissures lors d'étirements), il n'est pas possible non plus de casser les liaisons qui lient les enzymes au réseau pour leur rendre leur conformation d'origine, et donc leur activité.



**Figure 3.28 :** Evolution temporelle de l'intensité de fluorescence d'une solution de FDP à 100 µg/mL mise en contact avec un film (PLL/HA)<sub>30</sub>/PLL/ALP/PLL/HA partiellement réticulé ([EDC] = 5 mM), au repos (noir) et soumis à un étirement mécanique de 100% (rouge). Deux échantillons ont été testés : pour le premier, la solution de FDP a été mise en contact au repos à t = 0 (triangles et ligne bleue). Pour le second, la solution de FDP a été mise en contact à l'état étiré à t = 0 (cercles et ligne verte).

En conclusion, nous avons déterminé le degré de réticulation maximal des films PLL/HA avec EDC et sulfo-NHS permettant un étirement du film sans endommager sa structure apparente. La réticulation de films préalablement fonctionnalisés avec l'enzyme ALP permet une fixation covalente des enzymes. Cependant, ces enzymes couplées se trouvent dans un état dénaturé et désactivé. Un étirement du système ne permet pas d'influer sur l'activité enzymatique. Seules les enzymes non fixées semblent rester active, mais celles-ci ne ressentent pas l'étirement imposé au film. A ce stade, ce système ne permet pas de résoudre le problème posé, à savoir permettre la modulation l'activité enzymatique par un étirement macroscopique, en engendrant une déformation locale des enzymes du film.

Une solution envisageable consisterait à faire migrer des enzymes dans un film réticulé puis à les faire réagir avec le réseau pour les fixer. Pour cela, la PLL devrait être modifiée partiellement avec des groupements thiol (-SH) et les enzymes avec des groupements maléimide. De cette façon, les enzymes modifiées diffuseraient dans le film PLL<sub>-SH</sub>/HA préalablement réticulé

avec EDC/sulfo-NHS et réagiraient selon la réaction de Michael [Brinkley 1992] avec la PLL modifiée pour former des liaisons covalentes.

### **3.3.2 Gels de polyacrylamide**

Une deuxième stratégie a été développée afin de déformer localement des enzymes insérées dans un film polymérique en exerçant une action macroscopique. Cette stratégie consiste à modifier chimiquement les enzymes pour les intégrer de façon covalente dans des gels de polyacrylamide.

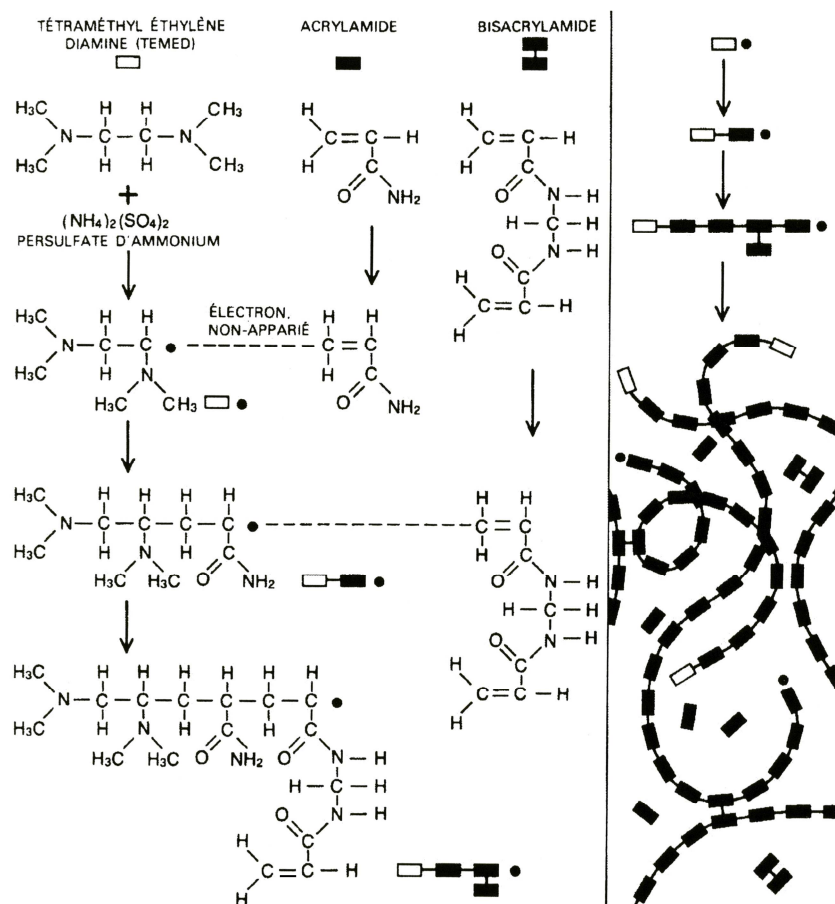
#### **3.3.2.1. Etat de l'art sur les gels de polyacrylamide**

Un gel est un réseau polymérique tridimensionnel solide dilué dans un liquide. En masse, il est principalement constitué de liquide, mais il ne « coule » pas à l'équilibre. Les propriétés d'un gel dépendent beaucoup des interactions entre ces deux composantes : d'une part, le liquide empêche le réseau de polymères de s'effondrer en une masse compacte et d'autre part, le réseau empêche le liquide de s'écouler. En fonction de la composition chimique et d'autres facteurs, la consistance des gels varie, allant des fluides visqueux aux solides moyennement rigides [Tanaka 1981].

Les gels s'avèrent extrêmement utiles pour les expériences de migration de protéines et d'électrophorèse. Le gel le plus utilisé à ces fins est le gel de polyacrylamide [Raymond & Weintraub 1959; Towbin, Staehelin et al. 1979]. Il s'agit d'un gel constitué d'un réseau de polyacrylamide et d'eau. La figure 3.29 décrit le principe de formation d'un gel de polyacrylamide.

Il est possible de modifier grandement la structure du gel, et donc ses propriétés mécaniques, en jouant sur la concentration en acrylamide et sur le rapport acrylamide/bisacrylamide (A/B). Ainsi, plusieurs études ont été réalisées sur l'influence de ces paramètres sur les propriétés mécaniques du gel et l'incidence sur les comportements de cellules cultivées au-dessus [Lo, Wang et al. 2000; Engler, Sen et al. 2006]. Par exemple, il a été montré qu'avec un gel de ratio A/B de 385 (w/w) l'adhésion cellulaire était favorisée par rapport à un gel ayant un ratio A/B de 3330. La rigidité du substrat favorise donc cette adhésion cellulaire [Pelham & Wang 1997]. Cette propriété est due au fait que les cellules utilisées développent mieux leurs

points de contacts focaux sur des substrats plus réticulés donc plus rigides [Kocgozlu, Lavalle et al. 2010]. Cela fait l'objet d'un grand nombre d'études depuis plus d'une dizaine d'années sous la dénomination de durotaxie et de mécanotransduction.



**Figure 3.29 :** Principe de formation d'un gel de polyacrylamide. Le gel est polymérisé par une réaction en chaîne. La première étape est l'activation du TEMED par le persulfate d'ammonium : la molécule de TEMED résultante possède un électron non apparié. Cette molécule activée se combine avec l'acrylamide qui est alors à son tour activé. Quand la chaîne des unités acrylamides s'allonge, le site actif se déplace vers l'extrémité libre. Le bisacrylamide, qui consiste en deux unités acrylamides liées par leurs groupements amides, est incorporé à deux chaînes en croissance. Le bisacrylamide forme des liaisons transversales entre les chaînes de façon à ce que le polymère se réticule. Le polymère sous forme de gel a donc une topologie complexe avec boucles, ramifications et interconnexions [Tanaka 1981].

### 3.3.2.2. Résultats

#### Optimisation de la préparation du gel

Dans un premier temps, les conditions de préparation du gel de polyacrylamide ont dû être optimisées de façon à avoir un système manipulable et suffisamment élastique pour être étiré.

Les concentrations en catalyseur, le TEMED (tétraméthyl éthylène diamine), et en initiateur, le persulfate d'ammonium (APS), sont dans les gammes de concentrations suivantes :  $10^{-3} < [\text{TEMED}] < 10^{-2}$  mol/L et  $5 \times 10^{-3} < [\text{APS}] < 10^{-2}$  mol/L, qui sont les conditions recommandées pour la polymérisation de gels de polyacrylamide à visée séparative [Merter 2000]. De façon générale, une augmentation de la concentration de l'un ou des deux composés induit une augmentation de la vitesse de polymérisation, mais aussi une diminution de la longueur des chaînes de polyacrylamide, qui a pour conséquence de diminuer l'élasticité du gel. Cependant, dans les gammes de concentration utilisées, ces paramètres n'ont pas d'influence significative sur les propriétés mécaniques. Seule la vitesse de polymérisation est sensiblement influencée par une augmentation ou une diminution de concentration en TEMED ou en APS.

La concentration en (acrylamide + bisacrylamide) a été modulée entre 5 et 40 g / 100 mL, tout comme le rapport molaire entre acrylamide et bisacrylamide, compris entre 40 et 5000. Pour différentes compositions de mélanges réactionnels, les gels obtenus ont été caractérisés de façon qualitative. Le premier facteur d'étude est le temps de polymérisation. Ce temps de polymérisation a constitué un critère dans la détermination des constituants de notre gel : un temps maximal de 15 minutes a été toléré.

Les échantillons pour lesquels cette étape a été franchie ont été caractérisés grossièrement d'un point de vue mécanique par simple manipulation : le caractère de solide mou (par opposition à dur), la souplesse (ne nécessite qu'une faible force pour être déformé) ou la rigidité (nécessite une force importante pour être déformé), ou encore la fragilité ont été évalués. De plus, si un échantillon était souple, son élasticité a été évaluée. Dans le cas d'une bonne élasticité apparente, son allongement à la rupture a été déterminé de façon rigoureuse. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 3.2.

[A+B] (g / 100 mL)	A/B = 40 à 80	A/B = 1000	A/B = 5000
5	Fragile	Très mou Souple	Très mou Souple
10	Rigide Fragile	Souple	Mou Souple
15	Rigide Fragile	Souple	Souple
20	Rigide Fragile	Souple / Elastique AR → 150 %	Souple
40	Rigide Fragile	Souple / Elastique AR → 80 %	Souple / Elastique AR → 80 %

**Tableau 3.2 :** Récapitulatif des essais réalisés pour déterminer les conditions de préparation optimales de gels de polyacrylamide, en vue d'obtenir des gels élastiques et résistants à un étirement de plus de 100%. Le rapport A/B est un rapport molaire. « AR » signifie « allongement à la rupture ».

L'objectif de cette étude étant d'avoir un gel manipulable et étirable jusqu'à 100%, la recette où la concentration en acrylamide/bisacrylamide est fixée à 20 g / 100 mL et où le rapport molaire des acrylamides sur les bis-acrylamides A/B est égal à 1000 semble convenir. Ainsi, le mélange réactionnel de préparation de ce gel de polyacrylamide qui sera utilisé pour la suite de l'étude est le suivant :

- mélange acrylamide (A) / bisacrylamide (B) tel que [A+B] = 20 g / 100 mL et tel que le rapport molaire A/B = 1000,
- TEMED à 0.03 mol/L,
- persulfate d'ammonium à  $10^{-2}$  mol/L,
- eau en quantité nécessaire.

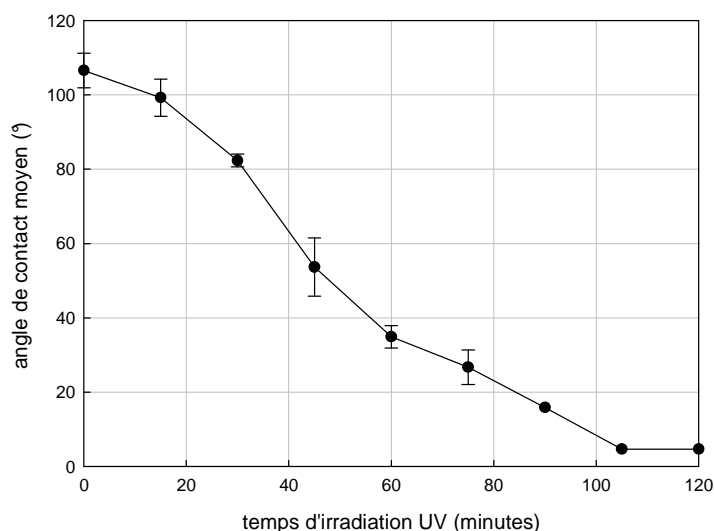
Ce gel a la capacité de gonfler s'il est mis en contact avec de l'eau après sa période de polymérisation, son volume peut facilement doubler au bout de 2-3 heures. A l'inverse, s'il est soumis à une exposition à l'air, il peut rapidement sécher. Dans les deux cas, les propriétés mécaniques sont détériorées, le gel devient dans le premier cas moins résistant à l'étirement, et dans le deuxième cas beaucoup plus rigide et plus fragile. Ainsi, les conditions d'utilisation de ces gels en milieu liquide imposent de nombreuses précautions.

De plus, il est très difficile d'étirer le gel de façon autoportée, et donc d'imaginer pouvoir faire des expériences à l'état étiré, sous microscope par exemple. Nous avons donc eu recours à un support de silicone (PDMS). Cela sera développé dans la partie suivante.

## Etirement du gel

Il n'est pas possible d'étirer un gel déposé sur une feuille de PDMS car le gel n'adhère pas sur la surface.

Afin de palier à ce problème, deux méthodes ont été envisagées : l'irradiation UV du PDMS et le traitement par plasma d'argon (détails des traitements dans la partie 2.1.2.3). Pour chacune des méthodes, l'angle de mouillage de l'eau a tout d'abord été mesuré et des gels ont été construits sur les silicones traités. Dans les deux cas l'angle est proche de  $0^\circ$  (plasma Ar : résultats de J. Bacharouche, IS2M, Mulhouse; UV/ozone : voir figure 3.30). Il est possible d'étirer le gel jusqu'à 40 % avec un PDMS traité aux UV, mais seul le plasma Ar permet d'étirer le gel au-delà de 100% en tirant sur la feuille de PDMS. L'irradiation UV a été réalisée durant 2 heures pour obtenir ce résultat, alors que le traitement plasma n'a nécessité qu'une minute. Ce dernier traitement génère des radicaux en surface du silicone, ce qui peut expliquer sa réactivité accrue avec le mélange réactif acrylamide/bisacrylamide.

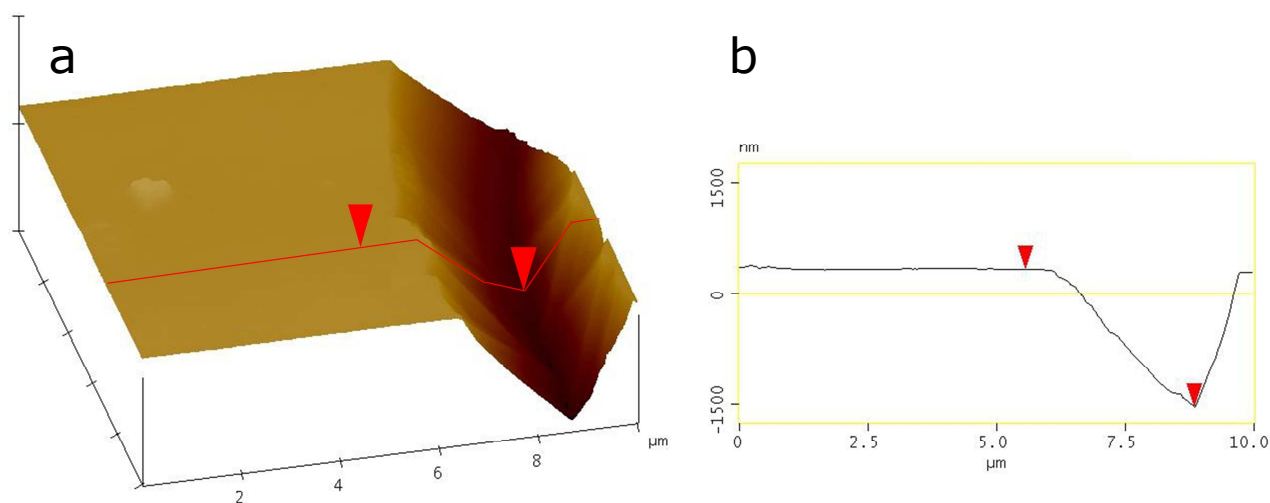


**Figure 3.30 :** Evolution de l'angle de contact d'une goutte d'eau sur la surface d'une feuille de PDMS traitée par irradiation UV/ozone, en fonction du temps de traitement (données de C. Rios-Neyra).

Ces méthodes simples ont un inconvénient majeur : des craquelures apparaissent en surface des silicones sous étirement, même lorsqu'un gel est déposé au-dessus. Elles apparaissent en raison de la présence d'une couche de silice, formée par les traitements (détails sur les phénomènes mis en jeu dans la partie 2.1.2.3). Pour le traitement plasma, les craquelures ont une



profondeur proche de 200 nm. Concernant le traitement UV, les craquelures présentent une profondeur bien supérieure, proche de 2  $\mu\text{m}$  pour 2h d'irradiation (figure 3.31).



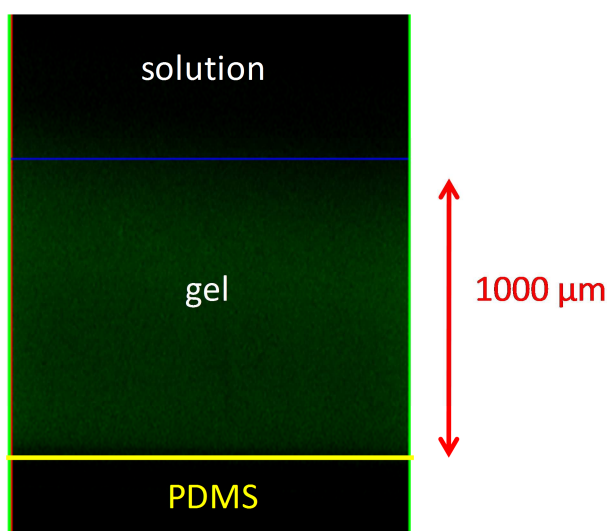
**Figure 3.31 :** (a) Topographie de la surface d'une feuille de PDMS irradiée pendant 2 heures par UV et étiré à 100 %, réalisée par AFM en mode contact. L'image a une dimension de 10  $\mu\text{m}$   $\times$  10  $\mu\text{m}$  et l'échelle en Z est de 3.5  $\mu\text{m}$ . (b) profil de la hauteur du même échantillon mesuré au niveau de la ligne rouge figurant sur l'image de gauche. La distance verticale entre les deux flèches rouges est de 1.8  $\mu\text{m}$ .

Parallèlement, afin de générer des liaisons covalentes entre le gel et la feuille de silicone, une méthode utilisant du 3-méthacryloxypropyltriméthoxysilane a été développée pour permettre d'obtenir des doubles-liaisons en surface de PDMS traités avec une irradiation UV (détails dans la partie 2.1.2.3, collaboration C. Rios Neyra, Institut Charles Sadron, Strasbourg). Dans ce cas, le gel se fixe de façon covalente sur la surface, ce qui permet de l'étirer au-delà de 100% et même de le faire gonfler en l'hydratant fortement plusieurs heures sans qu'il ne se détache. Cependant, le point négatif de ce procédé reste la formation de craquelures sur la surface du PDMS pour un étirement au-delà de 100 %.

Enfin, en collaboration avec V. Roucoules de l'IS2M, nous avons réalisé un dépôt de polymère plasma d'anhydride maléique, qui, suivi d'un dépôt de vapeur d'allylamine, permet d'obtenir également des doubles-liaisons en surface (figure 2.3 du chapitre Matériels & Méthodes). Cette méthode évite la formation d'une couche fragile de silice en surface du PDMS. Aussi suite à ce protocole, un traitement plasma argon de 30 secondes a permis la formation de radicaux au niveau des doubles-liaisons issues du dépôt d'allylamine et ainsi le gel a pu être fixé de façon covalente au PDMS.

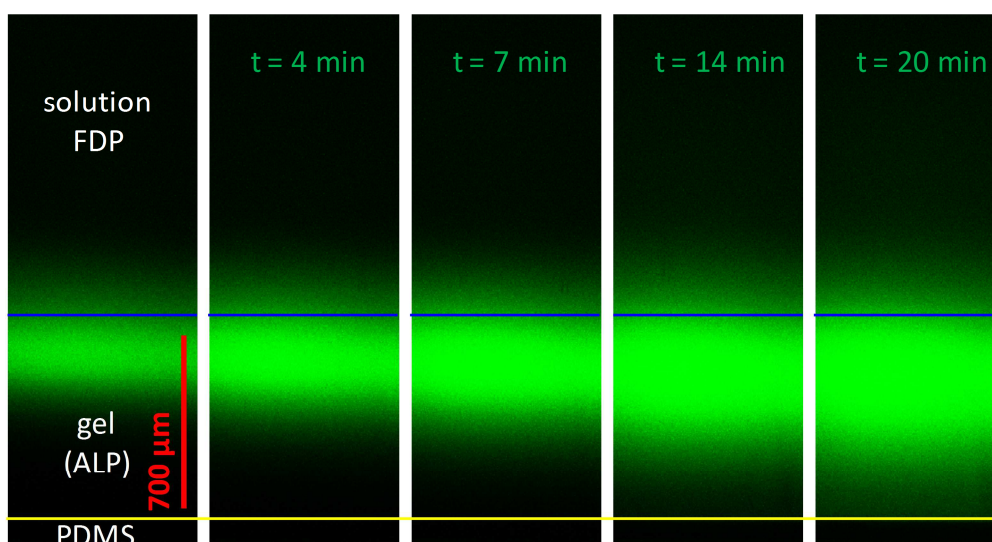
### Insertion d'enzymes dans le gel, activité et diffusion

Par commodité, les expériences de cette partie ont été réalisées sur une lamelle de verre, et non pas sur un feuillet de PDMS. Tout d'abord, une quantité de phosphatase alcaline (ALP) marquée à la FITC a été incorporée au mélange réactionnel du gel à une concentration de 0.25 mg/mL. Ceci a permis de visualiser le gel à l'aide du microscope confocal (figure 3.32). Le gel présente une fluorescence homogène sur toute son épaisseur, qui peut dans ce cas être estimée à 1 mm, 30 minutes après le début de la polymérisation. Dans la pratique, l'épaisseur obtenue dépend du volume de mélange réactionnel utilisé pour le gel, de l'aire de la surface de dépôt et aussi du temps écoulé entre la préparation et l'observation (le gonflement induit une augmentation de l'épaisseur dans le temps).



*Figure 3.32 : Section virtuelle d'un gel de polyacrylamide chargé avec l'enzyme ALP<sup>FITC</sup>, réalisée par microscopie confocale à balayage laser. Le trait jaune représente l'interface entre la lamelle de verre et le gel, le trait bleu à l'interface entre le gel et la solution.*

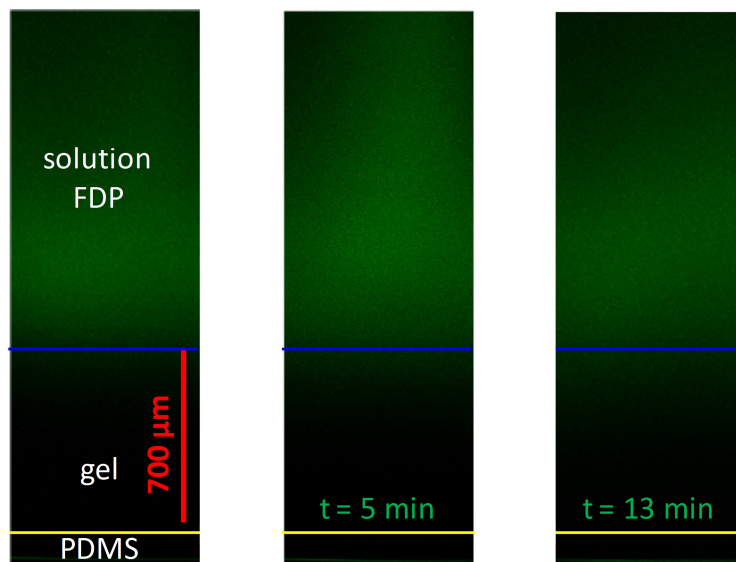
L'activité enzymatique a ensuite été vérifiée. Afin de recueillir uniquement un signal de fluorescence issu de la fluorescéine produite par la réaction catalytique de l'ALP sur la FDP, les enzymes ALP non marquées ont été utilisées pour être incorporées dans les gels (toujours à hauteur de 0.25 mg/mL). Le gel formé a alors été mis en contact avec une solution de FDP à 100 μg/mL (figure 3.33).



**Figure 3.33 :** Sections virtuelles par CLSM d'un gel de polyacrylamide chargé avec l'ALP et mis en contact avec une solution de FDP à 100  $\mu\text{g/mL}$ . De gauche à droite : la première image a été acquise quelques secondes après la mise en contact de l'enzyme sur le gel, puis les images suivantes après 4, 7, 14 et 20 minutes. Le trait jaune correspond à l'interface entre le gel et la lamelle de verre et le trait bleu à l'interface du gel avec la solution de FDP.

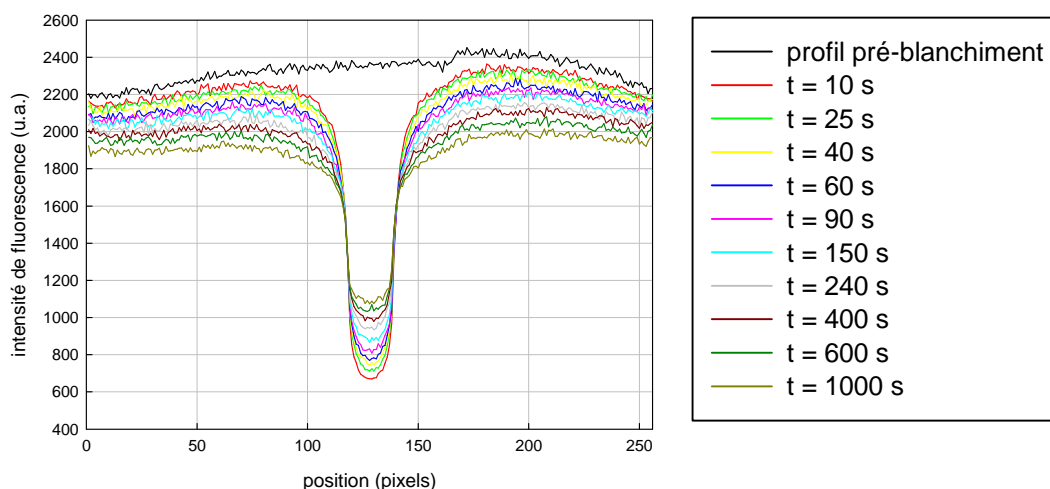
Il est clair que la FDP est progressivement déphosphorylée au sein de ce système lors de son entrée, ce qui produit un front de fluorescence qui s'étend de plus en plus au fond du gel (figure 3.33). Pour prouver que la déphosphorylation de la FDP est bien liée à l'activité de l'enzyme, la même expérience a été menée, mais en l'absence d'enzymes dans le gel (figure 3.34). Dans ce cas, l'intensité de fluorescence au sein du gel n'est pas supérieure à l'intensité mesurée à l'extérieur, il n'y a donc pas production de fluorescéine dans le gel. Ce sont bien les enzymes qui sont responsables de la transformation dans le premier cas. Un autre résultat important ressort également : la FDP (visible grâce aux molécules de fluorescéine présentes au sein de la solution commerciale) diffuse à l'intérieur du gel. Ainsi, l'action catalytique du gel chargé avec des enzymes peut se décomposer en deux phases : une phase de diffusion et une phase de catalyse proprement dite.

Ensuite, la mobilité des enzymes au sein du gel a été caractérisée. Pour cela, l'ALP marquée avec la FITC a de nouveau été incorporée dans le gel, et une expérience de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) a été réalisée (figure 3.35). Au bout de 1000 s, le recouvrement ne semble pas s'arrêter. Pour avoir une idée plus précise de la

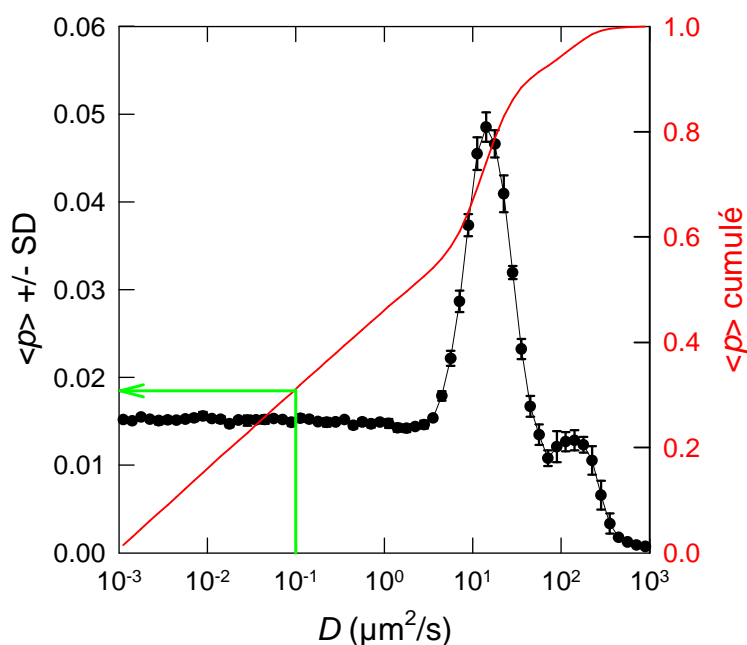


**Figure 3.34 :** Sections virtuelles par CLSM d'un gel de polyacrylamide mis en contact avec une solution de FDP à 100  $\mu\text{g/mL}$ . Le trait jaune correspond à l'interface entre le gel et la lamelle de verre. De gauche à droite : la première image a été acquise quelques secondes après la mise en contact de l'enzyme sur le gel, puis les images suivantes après 5 et 13 minutes. La puissance du laser a été augmentée par rapport à la figure 3.33, de façon à mieux visualiser les molécules de FDP en solution. Le trait jaune correspond à l'interface entre le gel et la lamelle de verre et le trait bleu à l'interface du gel avec la solution de FDP.

proportion de molécules mobiles, ces données brutes ont été traitées selon la méthode décrite dans le chapitre 4 (partie 4.2.4 « *computational background* »). La figure 3.36 ci-dessous représente la proportion et la proportion cumulée des enzymes marquées, en fonction des valeurs de coefficients de diffusion. Il apparaît clairement que 70 % des enzymes en présence ont un coefficient de diffusion supérieur à  $0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . De plus, un pic important de molécules mobiles apparaît de 3 à plus de  $100 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , correspondant à près de 40 % des enzymes en présence. Même si 30 % des enzymes semblent immobiles, leur immobilisation est certainement due à un emprisonnement dans les mailles du réseau de polyacrylamide. La contribution des enzymes dans la polymérisation du gel est en effet probablement très marginale, puisqu'elles ne disposent pas de liaisons  $\text{C}=\text{C}$  et que la formation de radicaux sur l'enzyme due à la présence de persulfates d'ammonium n'est pas très probable. Dans ce contexte il apparaît donc très improbable de pouvoir exercer quelque contrainte que ce soit sur les enzymes en étirant de façon macroscopique le gel.



**Figure 3.35 :** Profil de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment d'un gel de polyacrylamide chargé avec l'ALP<sup>FITC</sup>. La partie centrale (entre 118 et 139 pixels sur l'axe des x) correspond à chaque fois à la zone blanchie (fin du blanchiment à  $t = 0$  s). Les profils de fluorescence sont acquis pour différents temps postérieurs au blanchiment, qui sont indiqués en légende. Le traitement utilisé pour extraire ces courbes des images brutes obtenues par microscopie confocale est décrit dans la partie 2.2.5.



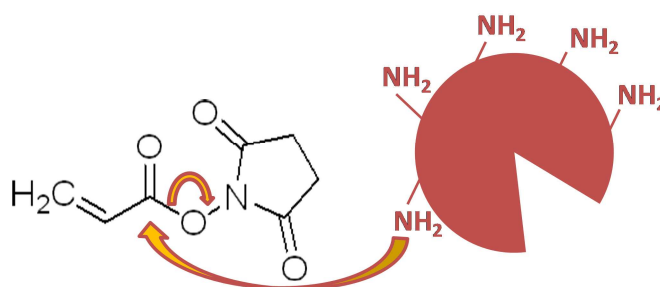
**Figure 3.36 :** Proportion (noir) et proportion cumulée (rouge) des valeurs de coefficients de diffusion  $D$  rencontrés dans le gel de polyacrylamide pour l'ALP<sup>FITC</sup>. Ces résultats sont obtenus grâce à la méthode d'exploitation des données de FRAP qui est décrite dans le chapitre 4. La flèche verte indique la proportion de molécules ayant un  $D \leq 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de  $p$ .

Afin de greffer les enzymes dans les gels de polyacrylamide, il apparaît nécessaire de les modifier chimiquement, par exemple avec plusieurs groupements comportant des doubles liaisons C=C. De cette façon, elles pourraient participer à la réaction de polymérisation du gel et donc être intégrées au réseau en plusieurs points.

### Modification chimique de l'enzyme et effet sur la diffusion

La  $\beta$ -galactosidase a été utilisée pour ces expériences. En effet la phosphatase alcaline utilisée dans les études précédentes présente des quantités importantes de glycine libre. Cette glycine peut induire des réactions parasites en raison de ses groupements amines primaires (voir détails de la synthèse entreprise ci-dessous). De plus, un caractère inhibitif a été attribué aux ions phosphates dans le cadre de l'action catalytique de la phosphatase alcaline sur la FDP (chapitre 3.1). L'utilisation de la  $\beta$ -galactosidase pourrait donc permettre d'éviter cela.

La modification chimique de l'enzyme consiste à greffer des acrylates sur les protéines. Pour cela, un ester de succinimide d'acide acrylique est utilisé qui permet une réaction sur les groupements amine de l'enzyme, comme expliqué en figure 3.37.



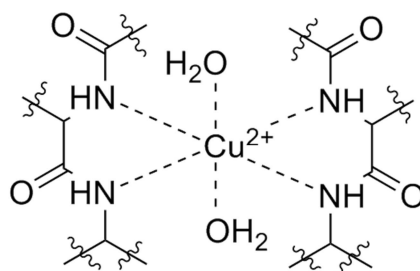
**Figure 3.37 :** Schéma réactionnel simplifié de la réaction d'une amine primaire de lysine appartenant à une enzyme, sur un ester de succinimide d'acide acrylique.

Une sous-unité de la  $\beta$ -galactosidase dispose théoriquement de 20 lysines (séquence 1JZ7, RCSB Protein Data Bank), dont les amines primaires sont susceptibles d'être accessibles à l'ester de succinimide. Ainsi, pour réaliser la synthèse, une quantité fixée de protéines est mise en solution dans une solution de bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ , 0.1 mol/L, pH = 8.5), par exemple 2 mg/mL (en prenant en référence une sous-unité de 116 kDa). De façon extemporanée, dix fois plus (en moles) d'ester de succinimide d'acide acrylique sont dissous dans un petit volume de DMF, de façon à viser une réaction avec 50 % des amines disponibles. Cette dernière solution est alors introduite dans la solution de protéines sous agitation et le tout est laissé sous agitation à

température ambiante durant 1 heure. A l'issue de la réaction, le mélange réactionnel est mis à dialyser à 4°C afin d'éliminer les molécules n'ayant pas réagi (plus de détails sur la modification de l'enzyme sont données dans la partie 2.1.6).

Afin de réaliser des contrôles des différentes étapes de synthèse, trois échantillons de la solution de  $\beta$ -galactosidase ont été prélevés : avant la réaction, après une heure de réaction et après la dialyse. De cette façon, il a été possible de déterminer la concentration des protéines à chaque stade, à l'aide de dosages de type BCA, ainsi que le rendement d'attaque des amines disponibles au départ, à l'aide de dosages avec le TNBS.

Le dosage BCA permet de déterminer la masse de protéines contenue dans un échantillon [Smith, Krohn et al. 1985]. Le principe est le suivant : la solution à doser contenant les protéines est mise en présence d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  qui, en milieu alcalin et en présence d'ions tartrates, forment un complexe stable (complexe Biuret) lorsque 4 liaisons peptidiques sont à proximité (figure 3.38). Rapidement, l'ion complexé  $\text{Cu}^{2+}$  (II) est réduit pour donner  $\text{Cu}^+$  (I). Ainsi, il est possible de déterminer la quantité de protéines en présence, en déterminant la quantité de cuivre I. Pour cela, de l'acide bicinchoninique (BCA) est ajouté au mélange. Celui-ci se complexe très facilement aux ions cuivre I issus de la réaction avec les protéines et donne un complexe tétravalent rouge fortement absorbant à 562 nm.



**Figure 3.38** : Complexe Biuret, formé à partir d'un ion  $\text{Cu}^{2+}$  et de 4 liaisons peptidiques.

Ce dosage hautement sensible et reproductible se résume donc à mélanger la solution alcaline de protéines avec des ions cuivre II et de l'acide bicinchoninique, puis de le laisser incuber pendant 30 minutes à 60 °C. L'absorption à 562 nm est alors mesurée. A l'aide d'une courbe d'étalonnage établie à partir d'étalons commerciaux d'albumine, il est donc possible de déterminer la quantité de protéines en présence.

De façon complémentaire, le dosage au TNBS permet de déterminer la quantité d'amines libres accessibles au niveau des protéines [Habeeb 1966]. Le principe est relativement simple : la solution à doser contenant les protéines est mise en présence de 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate (TNBS). Ces molécules réagissent avec les amines accessibles pour former un nouveau composé orange, qui absorbe à 335 nm. La détermination de l'absorbance de la solution, après incubation 30 min à température ambiante, permet d'évaluer la quantité d'amines en présence, grâce à un étalonnage à partir de solutions connues d'acides aminés.

Ainsi, en connaissant la quantité d'amines et en connaissant la quantité de protéines en présence, le nombre d'amines réellement accessibles pour chaque protéine peut être calculé.

Dans le cadre de la fonctionnalisation de la  $\beta$ -galactosidase par les acrylates, ces données ont été déterminées à chaque étape. Le tableau 3.3 ci-dessous donne les résultats obtenus pour une synthèse réalisée à partir d'une solution d'enzymes à 5 mg/mL. Les rendements obtenus ici sont similaires à ceux obtenus pour tous les essais réalisés.

	Attendu avant réaction / visé après réaction	Dosé avant réaction	Dosé après réaction	Dosé après dialyse
[ $\beta$ -GAL <sub>sous-unité</sub> ] (mg/mL)	5 / 5	4.85 ± 0.05	4.56 ± 0.15 → perte de masse 6 %	3.80 ± 0.22 → perte de masse 22 %
Nombre d'amines accessibles	20 / 10	25 ± 2	18 ± 1	17 ± 2

Tableau 3.3 : récapitulatif des résultats des dosages obtenus à l'issue d'une modification de  $\beta$ -galactosidase avec l'ester de succinimide d'acide acrylique. Les chiffres sont donnés pour une sous-unité de la protéine.

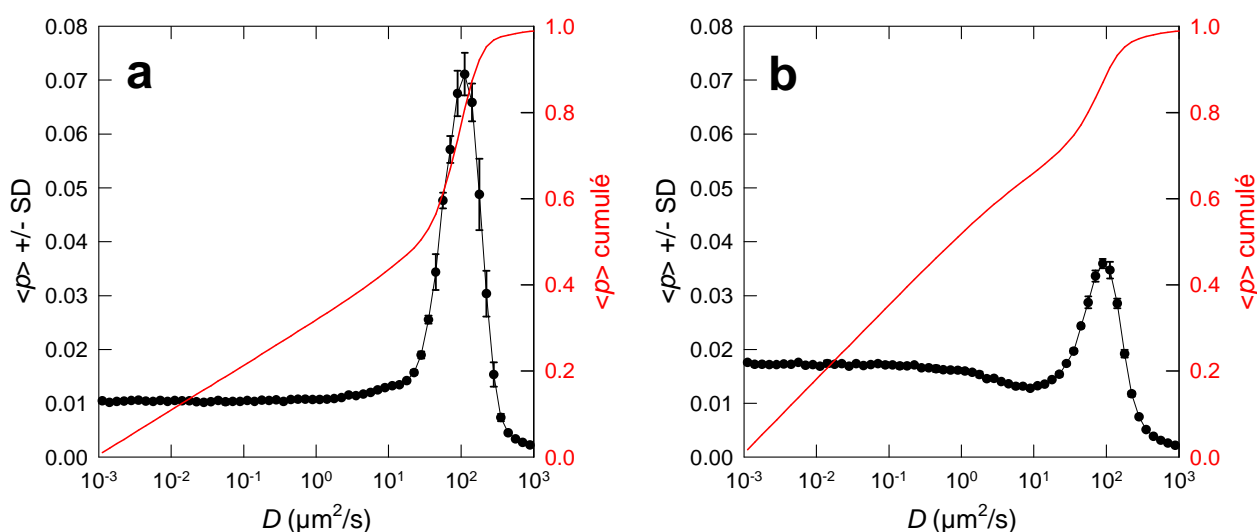
Un premier résultat ressort de ces données. Le nombre d'amines dosées qui semblent accessibles avant réaction est supérieur au nombre théorique réellement présent dans la protéine : d'autres fonctions semblent donc réagir dans une moindre mesure avec le TNBS. Bien que très stable, l'arginine est un candidat pour une telle réaction. Cependant, le dosage au TNBS est très reproductible et les trois échantillons (avant, après réaction et après dialyse) ont été dosés lors du même protocole, c'est-à-dire au même moment et avec la même courbe d'étalonnage. Les résultats obtenus peuvent donc être utilisés à titre de comparaison. Ainsi, le rendement d'attaque



des amines a pu être calculé : en moyenne, 30 % des amines disponibles ont réagi, et comme 50 % a été visé, le rendement de la réaction est de 60 %.

L'activité de la  $\beta$ -GAL modifiée ( $\beta$ -GAL\*) a été vérifiée après la synthèse par une mesure de l'évolution de la fluorescence d'une solution de FDG en présence d'enzymes soit modifiées soit non-modifiées. Pour une concentration massique identique, l'activité en solution de la  $\beta$ -GAL\* est similaire à celle de la  $\beta$ -GAL. En effet, la courbe de l'intensité en fonction du temps de la  $\beta$ -GAL\* est incluse dans l'intervalle de confiance à 95 % de celle de la  $\beta$ -GAL.

La diffusion de la  $\beta$ -GAL\* dans le gel de polyacrylamide a ensuite été caractérisée dans le réseau afin de pouvoir juger de son immobilisation. Pour cela, une modification ultérieure de l'enzyme a été nécessaire avec la FITC. La  $\beta$ -GAL\*<sup>FITC</sup> a donc ensuite été incorporée dans le mélange réactionnel du gel à hauteur de 0.25 mg/mL, et une expérience de FRAP a été réalisée après polymérisation du gel. A titre de comparaison, la même expérience a été réalisée avec la  $\beta$ -GAL<sup>FITC</sup> non modifiée. A partir des profils expérimentaux obtenus aux différents temps postérieurs au blanchiment, les proportions cumulées des coefficients de diffusion ont été



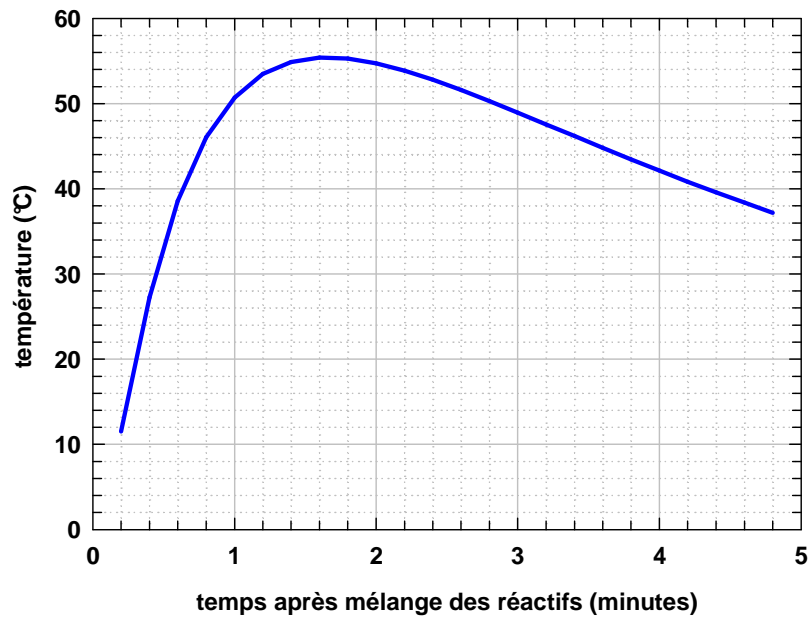
**Figure 3.39 :** Proportion (noir) et proportion cumulée (rouge) des valeurs de coefficients de diffusion  $D$  déterminées dans le gel de polyacrylamide pour la  $\beta$ -galactosidase. Ces valeurs sont obtenues avec la méthode d'exploitation des données de FRAP qui est décrite dans le chapitre 4. (a) La  $\beta$ -GAL<sup>FITC</sup> non modifiée a été incorporée dans le gel de polyacrylamide avant la polymérisation. (b) La  $\beta$ -GAL\*<sup>FITC</sup> modifiée avec des fonctions acrylates a été incorporée dans le gel de polyacrylamide avant la polymérisation. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de  $p$ .

obtenues pour les deux systèmes (figure 3.39). La méthode de traitement des données est décrite dans le chapitre 4.

Dans le cas où les enzymes  $\beta$ -GAL<sup>FITC</sup> ne sont pas modifiées, près de 50 % des espèces en présence sont très mobiles, autour de 100  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ , et seulement 40 % ont un coefficient de diffusion inférieur à 10  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ . Pour la  $\beta$ -GAL<sup>\*FITC</sup> modifiée chimiquement, seules 35 % des molécules sont très mobiles et près de 50 % d'entre elles ont un coefficient inférieur à 1  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ . La fixation de la  $\beta$ -GAL au réseau du gel est très probablement covalente, puisqu'elle a été fonctionnalisée avec des groupements très réactifs vis-à-vis des autres composants du gel lors de la polymérisation.

Dans l'étape suivante de l'étude, l'activité des enzymes couplées au gel doit être testée. Il s'agit de comparer l'activité enzymatique de l'enzyme modifiée à celle de l'enzyme non modifiée, lorsqu'elle est introduite dans le gel avant réticulation. Pour cela, les gels ont été mis au contact d'une solution de FDP à 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et l'évolution de la fluorescence au sein du gel a été suivie. On s'attend de façon logique à déterminer une activité significative pour l'enzyme non modifiée et enfouie, et une activité plus faible ou nulle avec l'enzyme modifiée. Mais le résultat obtenu est différent : alors que l'enzyme – qu'elle soit modifiée ou non – a une activité significative en solution, elle ne présente pratiquement plus d'activité – qu'elle soit modifiée ou non – une fois enfouie dans le gel (pour rappel : ajout direct de l'enzyme lors du mélange réactionnel formant le gel). La polymérisation du gel a donc une importante incidence sur l'activité de l'enzyme  $\beta$ -GAL. Deux explications peuvent être données : 1) l'enzyme subit d'importantes contraintes mécaniques lors de la polymérisation qui entraînent sa dénaturation et/ou 2) l'enzyme ne résiste pas à la température atteinte lors de la polymérisation, qui est un processus exothermique (figure 3.40). Pour rappel, l'alcaline phosphatase (n'ayant subi aucune modification chimique) utilisée au début de cette étude ne semblait pas perdre son activité après son insertion dans le gel.

L'évolution de la température durant la réaction de polymérisation du gel présente un maximum de 56°C à 1 min 30 s environ et la température demeure au-dessus de 50°C pendant près de deux minutes. Afin d'étudier l'influence de telles température sur l'activité des enzymes utilisées dans ces travaux, des solutions de phosphatase alcaline et de  $\beta$ -galactosidase ont été chauffées artificiellement à 60°C durant 5 minutes environ, et les activités respectives ont été mesurées avant et après chauffage. La courbe de la figure 3.41 présente les résultats obtenus.



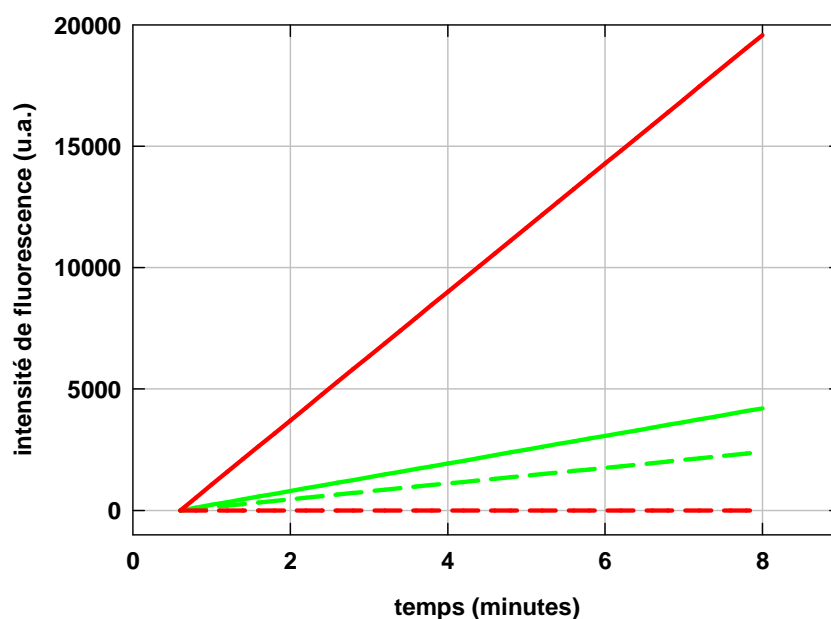
**Figure 3.40 :** Evolution temporelle de la température d'un mélange réactionnel de gel de polyacrylamide contenant 20 g / 100 mL d'acrylamide (A) et de bis-acrylamide (B), avec un rapport molaire A/B de 1000,  $1.5 \times 10^{-3}$  mol/L de TEMED et 0,01 mol/L de persulfate d'ammonium. Le temps  $t = 0$  correspond au moment où les persulfates sont introduits dans le mélange des autres constituants bien homogène., Le mélange est immédiatement agité pendant quelques secondes et ensuite la sonde de température est introduite.

Le premier constat est que l'activité des deux enzymes est affectée par un cycle de chauffage de 5 minutes à 60 °C. L'activité de l'ALP est réduite de 43% par cette opération. Mais la  $\beta$ -GAL perd toute activité après cette opération alors que son activité avant chauffage est bien supérieure à celle de l'ALP (les concentrations molaires en enzymes et en substrats n'étant pas identiques pour les deux enzymes testées et la fluorescence des produits intermédiaires de la réaction, FMP et FMG, n'étant pas forcément les mêmes, il n'est pas possible de comparer directement les activités des deux enzymes entre elles).

Plusieurs solutions pourraient être envisagées pour contourner ce problème (les deux dernières seront testées prochainement) :

- soit refroidir suffisamment la surface où est coulé le gel lors de la polymérisation, pour éviter que la température n'augmente trop ;
- soit focaliser l'étude sur la phosphatase alcaline et la modifier chimiquement, puisque cette enzyme résiste mieux à l'élévation de température. Après modification, l'ALP serait fixée dans les gels de polyacrylamide lors de la polymérisation ;

- soit essayer d'introduire la  $\beta$ -GAL ou l'ALP dans le gel après sa polymérisation et d'induire une réaction chimique avec le réseau *a posteriori*.



**Figure 3.41 :** Activités de la  $\beta$ -galactosidase (rouge) et de la phosphatase alcaline (vert) à température ambiante : évolution temporelle de l'intensité de fluorescence d'une solution de FDG et de FDP respectivement ( $97 \mu\text{g/mL}$ ), en présence de  $8 \mu\text{g/mL}$  d'enzymes brutes (trait continu) ou préalablement chauffées à  $60^\circ\text{C}$  pendant 5 minutes puis remises à température ambiante (trait en pointillés). Les enzymes ont été introduites dans les solutions de substrats respectifs à  $t = 0$  et chaque première mesure de fluorescence a été prise à  $t = 30$  s. Les courbes ont été normalisées à une intensité de 0 u.a pour la première mesure à  $t = 30$  s (les courbes de la  $\beta$ -GAL présentent une intensité de 400 u.a. à  $t = 30$  s et celles de l'ALP à 7500 u.a. à  $t = 30$  s, probablement liée au bruit de fond de la solution de substrat).

# Chapitre 4 :

## Chargement, diffusion et libération de protéines dans un film multicouche de polyélectrolytes

### 4.1. Résumé

### 4.2. Résultats principaux :

*Mobility of proteins in highly hydrated polyelectrolyte multilayer films*

4.2.1. *Abstract*

4.2.2. *Introduction*

4.2.3. *Materials and methods*

4.2.4. *Computational background*

4.2.5. *Results and discussion*

4.2.6. *Conclusion*

4.2.7. *Supporting information*

### 4.3. Résultats complémentaires

## 4.1. Résumé

Ce chapitre décrit les travaux réalisés sur le chargement, la diffusion et la libération de l'albumine de sérum humain (HSA) dans des films multicouches à croissance exponentielle (PLL/HA). Une proposition d'article en anglais regroupe les résultats concernant le chargement et la diffusion interne des protéines. Ensuite, la deuxième partie du chapitre traite des résultats obtenus sur leur libération hors des films.

Tout d'abord, le chargement de HSA dans un film (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL a été étudié. A cette fin, une solution de HSA marquée à la FITC (HSA<sup>FITC</sup>) a été mise au contact du film pendant 30 minutes, puis trois rinçages de 10 minutes chacun ont été réalisés. Une section du film ainsi obtenu a été visualisée à l'aide du microscope confocal : la HSA<sup>FITC</sup> diffuse sur toute l'épaisseur du film multicouche et la fluorescence émise est distribuée de façon homogène. De plus, il est apparu qu'en augmentant la concentration de la solution de protéines, l'intensité résultante et donc la concentration de HSA<sup>FITC</sup> du film augmentaient, mais l'épaisseur restait inchangée.

En vue de quantifier l'incorporation de protéines en fonction de leur concentration dans la solution, des dosages de la protéine marquée ont été réalisés par spectroscopie UV, une technique qui permet de couvrir la plage des concentrations obtenues :  $20 \mu\text{g/mL} < [\text{HSA}^{\text{FITC}}]_{\text{film}} < 75000 \mu\text{g/mL}$ . Ainsi, le facteur de concentration de HSA<sup>FITC</sup> est d'au moins 70 dans la gamme  $0.1 \mu\text{g/mL} < [\text{HSA}^{\text{FITC}}]_{\text{solution}} < 1000 \mu\text{g/mL}$ , ce qui montre que ces films constituent de véritables « éponges » à HSA<sup>FITC</sup>. De plus, le chargement de ces protéines n'engendre pas de perte d'eau ni de perte d'hyaluronate (chargé négativement), et la structure de la protéine semble être conservée (mesures par spectroscopie IR à transformée de Fourier en mode ATR).

Ensuite, l'examen qualitatif de la diffusion des protéines enfouies a été réalisé. Après photoblanchiment d'une zone du film, le recouvrement de fluorescence est très différent dans les cas d'un film contenant une faible concentration de HSA<sup>FITC</sup> ou une forte concentration. En effet, le recouvrement est presque total dans le premier cas et quasi nul dans le second. A partir des résultats bruts – l'intensité de fluorescence de chaque image acquise post-blanchiment – une nouvelle méthode d'exploitation basée sur la transformée de Fourier spatiale de l'intensité a permis d'obtenir la distribution du coefficient de diffusion caractéristique de chaque échantillon, qui reflète la mobilité des molécules dans le film.

Ces résultats confirment la tendance observée qualitativement sur les profils bruts de recouvrement : une augmentation de la concentration en HSA<sup>FITC</sup> dans le film tend à réduire leur mobilité. Pour mieux visualiser ce phénomène, la proportion des molécules « lentes » a été représentée en fonction de la concentration en protéines dans le film. Il apparaît une forte augmentation de cette proportion, de 10 % à plus de 70 %, lorsque la concentration en HSA<sup>FITC</sup> dans le film passe de 20 à 2000 µg/mL. Ce phénomène de blocage progressif des films fortement chargés est vraisemblablement dû aux interactions électrostatiques entre protéines et entre protéines et polyélectrolytes qu'ils soient sous forme de chaînes libres ou constitutifs de la matrice du film.

Par la suite, une étude sur la libération spontanée de HSA<sup>FITC</sup> hors d'un film (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL a été réalisée, également en faisant varier la concentration initiale dans le film. Le résultat montre qu'au terme de six jours, la proportion de protéines libérées dépend également fortement de la quantité emmagasinée dans les films au départ. Plus la concentration de HSA<sup>FITC</sup> est élevée à  $t = 0$ , plus la proportion libérée au bout de 6 jours est faible.

## **4.2. Résultats principaux :** *Mobility of proteins in highly hydrated polyelectrolyte multilayer films*

### **4.2.1. Abstract**

The lateral diffusion of a protein (human serum albumin labeled with fluorescein isothiocyanate) within a thick and highly hydrated polyelectrolyte film is studied. The film is built up with poly(L-lysine) as polycation and hyaluronate as polyanion. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) performed with confocal laser scanning microscope (CLSM) is used to evaluate the mobility of the labeled protein. Spatial Fourier Transform is applied to the fluorescence intensity recorded at various times after the initial photobleaching of an area within an image of the film. This approach necessitates no hypothesis on the shape of the profile at the end of the bleaching. Furthermore, under the hypothesis of molecules moving according to Fick's law, the Fourier transform is represented by a weighted sum of  $m$  exponentials each containing another diffusion coefficient. These  $m$  diffusion coefficients constitute a geometric sequence and

cover six orders of magnitude in the present work. The proportion attached to each term of this sequence is optimized using the simulated annealing method. A criterion, combining goodness-of-fit and the entropy characterizing the diffusion coefficient spectrum, is proposed to avoid overinterpretation of the experimental data. The optimum spectrum of the diffusion coefficient is then extracted from the time evolution of the light intensity at various albumin concentrations within the films. It appears that the mobility, quantified by the amount of labeled molecules having a diffusion coefficient smaller than e.g.  $0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , undergoes a transition between 20 and  $2000 \mu\text{g}/\text{mL}$ . This suggests that the network constituted by the film has a minor influence on the movement of the protein molecules at low concentration but becomes gradually overcrowded at growing concentration, while mutual interaction of the albumin molecules may also become increasingly important in the reduction of their mobility.

#### **4.2.2. *Introduction***

“Polyelectrolyte multilayers” is a generic term to designate films constructed by the self-assembly of polyanions and polycations via the LbL method [Decher 1997]. Widespread applications are concerned with LbL ranging from materials science [Hiller, Mendelsohn et al. 2002; Jiang, Markutsya et al. 2004; Lee, Cho et al. 2007; Podsiadlo, Kaushik et al. 2007] to the biomedical field [Tang, Wang et al. 2006; Wood, Chuang et al. 2006]. Two types of polyelectrolyte multilayer films were depicted: those whose thickness and mass increase linearly with the number of deposition steps and those for which this growth is exponential at least at the beginning of their buildup [Picart, Mutterer et al. 2002; Porcel, Lavallo et al. 2006]. Lateral mobility of polyelectrolyte chains in linearly growing films has been still recently determined. For example, in the case of PSS/PAH (PSS: poly(sodium 4-styrene sulfonate), PAH: poly(allylamine hydrochloride)) multilayers, the diffusion coefficient of FITC-labeled PAH was lower than  $10^{-6} \mu\text{m}^2/\text{s}$  which corresponds to a glassy state [von Klitzing 2006; Nazaran, Bosio et al. 2007]. In exponentially growing multilayers, the tracers display a much higher lateral mobility. PLL/HA films (PLL: poly(L-lysine), HA: hyaluronate) are typical films whose thickness increases exponentially with the number of deposition steps at the beginning of the buildup and some PLL chains are highly mobile inside this architecture whatever the number of deposited layers [Picart, Mutterer et al. 2005; Jourdainne, Lecuyer et al. 2008]. Three PLL populations were identified: one



population with a “high” diffusion coefficient ( $D \approx 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ), another with a smaller diffusion coefficient, and a last population, which was considered as immobile ( $D < 0.001 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ).

Because exponentially growing multilayers can act as micro-containers (or reservoirs) for active compounds, it is interesting to evaluate the capability of such molecules to diffuse inside them. The film can be loaded at various concentrations depending on the concentration of the solution to which it is exposed as well as on the exposure time. For instance, it was observed that paclitaxel was incorporated into a PLL/HA stratum at a concentration up to one order of magnitude higher than that of the solution brought into contact with the film [Vodouhê, Le Guen et al. 2006]. Other examples have been published recently, where PLL/HA films served as reservoir of the TAT peptide or the BMP-2 protein for local delivery [Crouzier, Ren et al. 2009; Wang & Ji 2009].

The loading of PLL/HA films with proteins like human serum albumin (HSA) has to our knowledge never been studied. HSA, a protein of 66 kDa with an isoelectric point of 4.7, makes up about 55% of the total human blood proteins [He & Carter 1992]. Diffusion of HSA adsorbed on or embedded in polyelectrolyte multilayers has been described only for linearly growing, thin polyelectrolyte multilayers, namely PSS/PAH films [Szyk, Schaaf et al. 2001; Szyk, Schwinté et al. 2002]. In the present article, we propose to study the loading and the mobility of this model protein in PLL/HA films. Indeed, it may be hypothesized that the mobility of the loaded molecules is sensitive to their concentration and to the polymeric environment. It is notably the case when free positively charged PLL chains (polycations) or PLL chains implicated in the film matrix, whose charges are extrinsically compensated to some extent, are available for complexation with negatively charged proteins, such as albumin. This protein wears 5 binding sites for cationic species [Shcharbin, Janicka et al. 2007]. In a first part of the study, we will check that this protein can be loaded in thick PLL/HA films with a resulting homogeneous distribution in the film section. The loading rates will be evaluated as a function of the solution concentration brought in contact with the films for a fixed time. Then, fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments will be performed with HSA labeled with fluorescein isothiocyanate (HSA<sup>FITC</sup>) and the confocal microscopy images will be processed: a method based on spatial Fourier analysis will be applied to images where a rectangular area was bleached [Berk, Yuan et al. 1993; Levitan, Lanni et al. 2007]. More recently, an alternative consisting in bleaching a circular area and using the Hankel transform [Jönsson, Jonsson et al. 2008] was

proposed. An ingredient of prime significance in the method presented here is the entropy associated to the diffusion coefficient distribution, the so-called Shannon-Jaynes entropy [Jaynes 1957; Skilling & Bryan 1984; Periasamy & Verkman 1998; Sengupta, Garai et al. 2003]. The weight of each diffusion coefficient within a sequence of possible values given *a priori* is determined using the algorithm called "simulated annealing" [Kirkpatrick, Gelatt Jr et al. 1983; Press, Flannery et al. 1989]. As this procedure goes on, the agreement between the simulated and experimental data improves and the distribution structures gradually, i.e. the entropy decreases. This is synonymous with gain of information. However, the reduction of entropy becomes meaningless once the improvement of fit quality becomes small. Then, the procedure is stopped. This strategy, concisely outlined, relies on the "principle of minimum information" [Evans 1969] or "principle of parsimony" [Istratov & Vyvenko 1999] which states that the fitting procedure should not add information which is not warranted by the experimental measurements [Swaminathan & Periasamy 1996]. This procedure allows determining the distribution of the lateral diffusion coefficient of the labeled protein in the PLL/HA films for various protein concentrations within the film. It will reveal a concentration interval over which the proportion of slowly moving HSA<sup>FITC</sup> molecules increases dramatically. This reduction of mobility likely mirrors the effect of an increasingly crowded medium.

### 4.2.3. *Materials and methods*

**Preparation of polyelectrolyte films.** Poly(L-lysine) bromide (PLL, 60 kDa, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and sodium hyaluronate (HA, 400 kDa, Lifecore Biomedical, Chaska, USA) were used to build up (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL films. Polyelectrolyte solutions were prepared by dissolution of the respective adequate polymer amounts in a 0.15 M NaCl aqueous solution buffered at pH 7.4 with 10 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS). All solutions were prepared using ultrapure water (resistivity close to 18.2 MΩ.m). 12-mm glass slides (Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Germany), cleaned with a 70% v/v ethanol solution, a 2% v/v Hellmanex® (Hellma France, Paris, France) solution and a 0.1 M HCl solution (each cleaning step was followed by a rinsing step with water), were used as substrates. The films were constructed with an automatic dipping machine (Dipping Robot DR3, Riegler & Kirstein GmbH, Potsdam, Germany) by the alternate dipping of the glass slides in a polycation

bath (8 min), two rinsing solutions (2×5 min), a polyanion bath (8 min), two rinsing solutions (2×5 min), and so on. Then, the films were stored in a TRIS-buffered 0.15 M NaCl solution at 4°C.

**Loading of films.** The loading of the (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL films was evaluated for HSA<sup>FITC</sup> (with 10 moles of FITC per mole of HSA, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany). 500 µL of protein solution at a defined concentration were deposited on top of the film and the solution stayed for 30 min before rinsing with 3×1 mL of pure buffer (3×10 min).

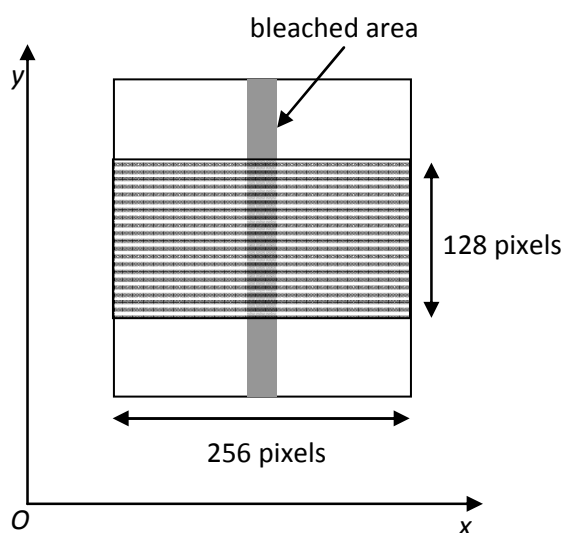
**Determination of loading rates.** UV spectroscopy was used to determine the amount of proteins absorbed in the films for a given concentration of the solution during contact. This method consisted in using a calibration curve, representing UV absorption of solutions of HSA<sup>FITC</sup> of different known concentrations, to determine the concentration within the loaded film according to its own UV absorption at the same wavelength (495 nm).

**Confocal laser scanning microscopy (CLSM).** The bleaching and imaging of films loaded with HSA<sup>FITC</sup> were performed on a Zeiss LSM 510 confocal microscope equipped with an Argon laser (488 nm). The coated slide was placed in a homemade sample holder filled with 1 mL of TRIS-buffered 0.15 M NaCl solution, in order to avoid drying of the film. A 10× objective lens with a numerical aperture of 0.3 (Zeiss Plan Neofluar) was used. The numerical zoom was fixed to ×3 or ×6 in order to have respectively 300×300 µm<sup>2</sup> or 150×150 µm<sup>2</sup> images ( $L = 300$  or  $150$  µm, respectively). Whatever the side length  $L$  of the images, the area of an image was virtually subdivided into 256 pixels × 256 pixels. Z-sections of the films were also obtained after deconvolution and reconstruction of ( $x$ ,  $y$ ) stacked images.

**FRAP protocol.** Typical bleaching consisted in scanning 500 to 2000 times the rectangular area to bleach with the laser set at its maximum power. The 10× objective used for photobleaching yields optical sections that are thicker than the film thickness itself: from 11 µm up to more than 50 µm, depending on the value of the pinhole diameter used. Consequently, the film was bleached over its whole thickness during this procedure. After recording of a pre-bleach image, a 256 pixels × 20 pixels or a 256 pixels × 10 pixels rectangle was drawn by using the bleaching tool of the software (Carl Zeiss AIM 510 version 3.2). The bleach time was adjusted to achieve sufficient contrast between the bleached and non-bleached regions. After the bleach, images were acquired at times ranging from *ca.* 10 s up to *ca.* 1000 s to monitor the recovery process. These images were acquired by scanning the sample with the laser power carefully chosen to detect

correctly the fluorescent molecules but to avoid strong bleach during image acquisition (“reading” step).

**Image processing.** The images were analyzed by means of a macro executed with the software “Image J” (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2011). In each image, *i.e.* at each post-bleach time, the intensity was recorded on  $256 \times 256 = 65536$  pixels. However, only those constituting the 128 lines each 1-pixel wide, perpendicular to the long edges of the bleached zone, *i.e.* parallel to the Ox axis (Figure 4.1) were processed. The two rectangular margins each 64-pixel wide in the Oy direction were left out to avoid border effects due to the diffusion of labeled molecules through the short edges of the bleached rectangle.



**Figure 4.1:** Schematic view of a square image (side length  $L = 150$  or  $300 \mu\text{m}$ ) containing a partially bleached rectangle (10 or 20 pixels wide; grey). Even immediately after the bleach, the contour of the rectangle is generally not as sharp as suggested in the scheme, due to diffusion of the labeled molecules already during the bleach time (so-called “corona effect” [Weiss 2004; Kang, Day et al. 2009]). The 128-pixel wide useful area is shown.

#### 4.2.4. Computational background

The starting point of the experimental data analysis is the classical diffusion equation (also called Fick's law). Note that doing so implicitly assumes that the labeled molecule experiences no anomalous diffusion [Saxton 1999; Banks & Fradin 2005] and that no flux will contribute to a

systematic component of its movement (diffusion-convection model [Sullivan, Sipprell et al. 2009]). Then, in a one-dimensional Brownian diffusion process, the molecule concentration  $c(x, t)$  at point  $x$  and time  $t$  evolves according to

$$\frac{\partial c(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c(x, t)}{\partial x^2} \quad (4.2.4 - 1)$$

where  $D$  is the diffusion coefficient. Applying the spatial Fourier transformation to eq. 4.2.4-1 leads to

$$\frac{\partial C(q, t)}{\partial t} = -q^2 DC(q, t) \quad (4.2.4 - 2)$$

where  $C(q, t)$  is the complex spatial Fourier transform of  $c(x, t)$ , corresponding to the spatial angular frequency  $q$ . The resolution of the ordinary differential equation (eq. 4.2.4-2) leads to

$$C(q, t) = C(q, 0)e^{-q^2 Dt} \quad (4.2.4 - 3)$$

Now, consider the light intensity recorded along a line parallel to the Ox axis, *i.e.* perpendicular to the long edges of the bleached rectangle (Figure 4.1). This signal, which is assumed to be proportional to the concentration of labeled molecules, is known in a sequence of  $N$  discrete locations, *i.e.*  $N$  pixels ( $0 \leq n \leq N - 1$ ). Most often  $N$  is a power of 2 (e.g. 256), but this is not mandatory. Then, the Fourier transform of this discretized signal,  $s(n, t)$ , must be computed as a discrete Fourier transform (DFT) defined by

$$S(q, t) = \sum_{n=0}^{N-1} s(n, t) e^{-i \frac{2\pi k}{N} n} \quad (4.2.4 - 4)$$

where  $q = \frac{2\pi k}{N}$  (in radian/pixel) or  $q = \frac{2\pi k}{L}$  (in radian/ $\mu\text{m}$ ), and the integer  $k$  ranges in principle from 0 up to  $N - 1$ . The power spectral density (PSD) is defined as the squared modulus of the Fourier transform, *i.e.*  $\text{PSD}(q, t) = |S(q, t)|^2$ . It can easily be demonstrated that  $\text{PSD}(\pi - \Delta q, t) = \text{PSD}(\pi + \Delta q, t)$ . So, even for a noise free signal measured on  $N$  pixels, the useful part of the spectrum would be restricted to  $q < \pi$ , hence to  $k \leq \frac{N}{2} - 1$ . This conclusion can also be drawn from the Nyquist-Shannon sampling theorem.

As a consequence of eq. 4.2.4–3, if all labeled molecules diffused with the same diffusion coefficient  $D$ ,  $\text{PSD}(q, t)$  with  $k \geq 1$  would decay exponentially with time [Levitan, Lanni et al. 2007] according to:

$$\text{PSD}(q, t) = \text{PSD}(q, 0) e^{-2q^2 D t} \quad (4.2.4 - 5)$$

Note that  $\text{PSD}(q, 0)$  is a unknown proportionality factor which is different for each value of  $k$  [Berk, Yuan et al. 1993].

When  $m (\geq 1)$  populations of labeled molecules (whether chemically different or not) are present (or supposed to be present) in the film, the respective diffusion coefficients and proportions must be taken into account. Then, eq. 4.2.4–5 generalizes to

$$\text{PSD}(q, t) = \text{PSD}(q, 0) \left( \sum_{j=1}^m p_j e^{-q^2 D_j t} \right)^2 \quad (4.2.4 - 6)$$

where  $p_j (\geq 0$  and  $\leq 1$  for all  $j$ 's) represents the proportion of the  $j$ th component and  $\sum_{j=1}^m p_j = 1$ .

Eq. 4.2.4–6 must be fitted to the experimental PSD values derived from the recorded intensities using relation (4.2.4–4). Note that only a relatively small number of overtones are relevant because of the growing contamination of the PSD by the experimental noise as  $k$  increases [Berk, Yuan et al. 1993]. In the cases that will be shown below, we used  $k = 1, 2$  and  $3$ .

The goodness-of-fit (gof) has been defined using the PSD corresponding to each of the 128 lines evoked above ( $\text{PSD}_{\text{exp}}$ ) for a given overtone ( $k$ ) and a given image. In addition, for a given overtone and a given image, the standard deviation  $\sigma$  of the 128 realizations can be computed. The gof is then defined by

$$\chi^2 = \sum_{\text{image}} \sum_k \sum_{\text{lines}} \left( \frac{\text{PSD}_{\text{exp}}(\text{image}, k, \text{line}) - \text{PSD}_{\text{calc}}(\text{image}, k)}{\sigma(\text{image}, k)} \right)^2 \quad (4.2.4 - 7)$$

where  $\text{PSD}_{\text{calc}}$  is defined by (4.2.4.–6).

When  $m$  is large (several tens or more), the  $D_j$ 's in eq. 4.2.4–6 represent the abscissas of the discrete diffusion coefficient spectrum. They constitute a geometric sequence, *i.e.* they are equally spaced on a logarithmic scale as is commonly done for the spectra of the diffusion coefficient

[Periasamy & Verkman 1998] or of the decay time of fluorescence [Swaminathan & Periasamy 1996; Sengupta, Garai et al. 2003; Sanabria, Kubota et al. 2007].

The possible diffusion coefficients were generally distributed over the interval  $10^{-3} - 10^3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Then, choosing  $m = 60$  leads to  $D_{j+1} = D_j \times 10^{0.1}$  and  $D_1 = 10^{-2.95} \mu\text{m}^2/\text{s}$ . The proportions  $p_j$  were fixed to  $1/m$  at the beginning of the fitting procedure. This initially flat spectrum corresponds to the maximum entropy  $S_{\text{max}} = \ln(m)$ , i.e. to the least information. The  $p_j$ 's were optimized using an algorithm called "simulated annealing" [Kirkpatrick, Gelatt Jr et al. 1983; Press, Flannery et al. 1989]. Because this method relies strongly on the Metropolis algorithm widely used in statistical mechanics [Metropolis, Rosenbluth et al. 1953], we must introduce a control parameter which plays the role of the temperature in statistical mechanics. It is usually written  $T$  to underscore the analogy and is called "temperature". In fact, it should be called "thermal energy" because it replaces  $kT$  rather than  $T$ . The system was then slowly "cooled" down. At each temperature stage, 50000 trials were undertaken to change slightly the value of each  $p_j$ . This elementary change was defined by:

$$\Delta p_j = \frac{0.1}{m}(2u - 1) \quad (4.2.4 - 8)$$

where  $u$  is a random number uniformly distributed over  $[0, 1]$ , produced using the function "drand" available in the Fortran software (Compaq Visual Fortran, Professional Edition Version 6.5). For each sequence of  $p_j$ 's,  $\text{PSD}(q, t)$  was computed to evaluate the sum of the squared differences,  $\chi^2$ , with the experimental counterparts. The new sequence of  $p_j$ 's was accepted if it corresponded to a decrease of  $\chi^2$ . If it led to an increase, it was accepted with the probability defined by:

$$P_{\text{acc}} = \exp\left(-\frac{(\chi^2)_{\text{new}} - (\chi^2)_{\text{old}}}{T}\right) \quad (4.2.4 - 9)$$

If acceptance failed, the old, i.e. former sequence replaced the new, rejected one. Therefore, it happened that a given sequence appeared several times in accordance with the principle of the Metropolis algorithm aimed at simulating equilibrium configurations. Once the 50000 sequences were produced, the temperature was reduced by a factor of 0.9 and again 50000 cycles were performed. This procedure was continued until the system became so cold that most attempts to

change the sequence of  $p_j$ s were rejected. We fixed this rejection rate to 0.99. When for ten successive temperatures the rejection rate exceeded 0.99, the cooling process was stopped.

At this stage, the agreement could practically no further be improved and the entropy had been decreased as the temperature was decreased. However, below some temperature, it could be observed that  $\chi^2$  hardly decreased even though  $S$  decreased more visibly. This meant that the gain of information, i.e. the structuring of the spectrum, was illusory. This meant also that the cooling procedure had reached too low a temperature and that a more “reasonable” temperature would be sought. To this end, we suggested to build a function of  $T$ ,  $\delta(T)$ , defined by:

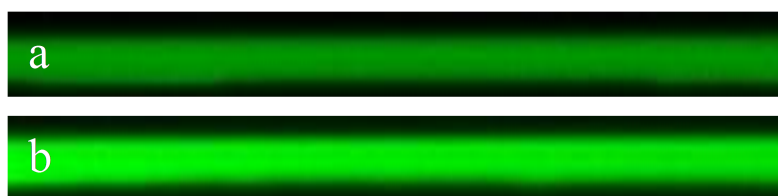
$$\begin{aligned}\delta(T) &= a(T) - b(T) \\ a(T) &= \frac{\chi_{\max}^2 - \chi^2}{\chi_{\max}^2 - \chi_{\min}^2} \\ b(T) &= \frac{S_{\max} - S}{S_{\max} - S_{\min}}\end{aligned}\tag{4.2.4-10}$$

As can be seen,  $a(T)$  is linked to the evolution with  $T$  of the goodness-of-fit. Similarly,  $b(T)$  represents the evolution with  $T$  of the information provided by the diffusion coefficient spectrum, which increases when the entropy decreases. As will be seen on the examples shown in Figures 4.5 and 4.6,  $\delta(T)$  passes through a maximum located at the temperature  $T_0$ . We used this temperature as the optimum one. This means that below  $T_0$  the reduction of  $\chi^2$  is too weak to validate the corresponding reduction of  $S$  or gain of information. It is fully clear that this method of choosing the optimum temperature is arbitrary to some extent. Nevertheless, it has the advantage of being independent of the experimentalist's appreciation. Furthermore, it may be considered as a kind of maximum entropy method (MEM) because  $T_0$  is chosen so that the best possible fit is obtained without undue reduction of  $S$ . The system was then warmed up from the final temperature up to the optimum one ( $T_0$ ) and  $2 \times 10^6$  sequences of  $p_j$ s were generated. Each value of  $D_j$  ( $j = 1, \dots, m$ ) was ascribed the proportion  $p_j$  obtained as the average over these  $2 \times 10^6$  configurations. This “annealing” cycle was performed five times, so to get five distributions of the diffusion coefficients. The final spectrum,  $\{D_j, \langle p_j \rangle, j = 1, \dots, m\}$ , is the average of them and the standard deviation attached to each  $\langle p_j \rangle$  was also obtained from them. It characterizes the diffusion of the labeled molecules at a given concentration within the film and for a given setup of the microscope parameters.



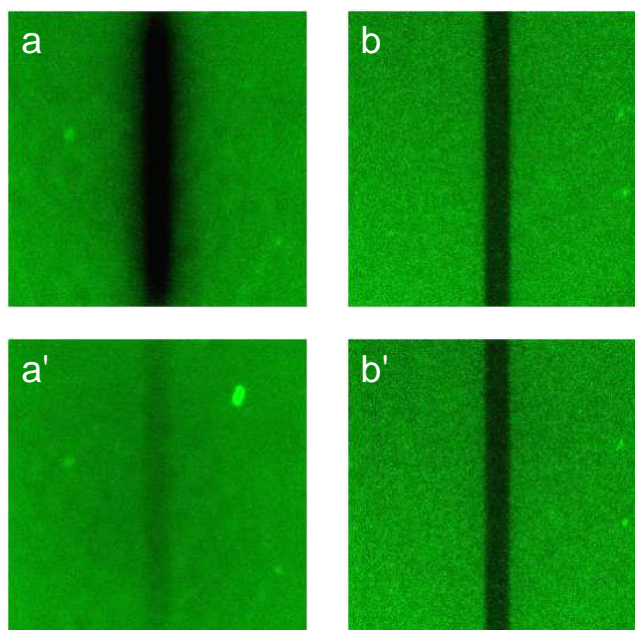
## 4.2.5. Results and discussion

**Diffusion of HSA through the film section.** In the first part of our study, the diffusion of proteins in the whole film section and the loading rate of proteins in the film were analyzed. Solutions of HSA<sup>FITC</sup> at 3 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  have been deposited on top of (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL films for 30 min. After rinsing with pure buffer, film sections were observed with confocal microscopy (Figure 4.2). A homogenous, 7- $\mu\text{m}$  thick green stripe was imaged. PLL/HA films have been well characterized in several studies and it is known that the total thickness of a PLL/HA film after deposition of 24 pairs of layers is about 7  $\mu\text{m}$  indicating that in the present case HSA<sup>FITC</sup> diffuses through the whole film section and the film thickness is maintained.



**Figure 4.2:** Confocal laser scanning microscope section ( $x, z$ ) images of multilayer films deposited on glass slides. (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL multilayer films loaded with HSA<sup>FITC</sup> deposited from 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (a) and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  solution (b). The films are visualized after rinsing with buffer solution. Thickness of the films is about 7  $\mu\text{m}$  and image size is  $214 \times 12 \mu\text{m}^2$ . The two images were acquired using the same confocal microscope parameters.

**Preliminary observations of films after photobleaching.** First, qualitative observations were performed to determine if proteins in the films appeared mobile over experimentally acceptable observation times. To this end, (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL multilayer films were loaded with HSA<sup>FITC</sup> from either a 1- $\mu\text{g}/\text{mL}$  solution or a 100- $\mu\text{g}/\text{mL}$  solution. A stripe was bleached at  $t = 0$  and the evolution of the fluorescence intensity in this zone was monitored during 10 min. Figure 4.3 shows the upper surface of the films, *i.e.* pictures parallel to the substrate. It appears that the recovery is nearly completed after 10 min in the former case, whereas no recovery and thus no diffusion of HSA<sup>FITC</sup> is observed in the latter case. This does not evidence that the molecules are immobile in Figures 4.3b and b' but that their mobility is at least substantially reduced when compared to the mobility suggested by Figures 4.3a and a'.



**Figure 4.3:** Representative ( $x, y$ ) confocal microscope images of a  $(\text{PLL}/\text{HA})_{24}/\text{PLL}/\text{HSA}^{\text{FITC}}$  film taken at  $t = 10$  s ( $a, b$ ) and  $t = 600$  s ( $a', b'$ ) after photobleaching. Images size is  $300 \times 300 \mu\text{m}^2$ . Depositions were made from  $1\text{-}\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $a, a'$ ) and  $100\text{-}\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $b, b'$ ) solutions of labeled proteins.

To ascertain that this phenomenon is related to the loading rate of the protein in the film or not, we have determined the amount of protein loaded in the film in our experimental conditions and extracted from FRAP data the diffusion coefficients of the protein in the film loaded at various concentrations.

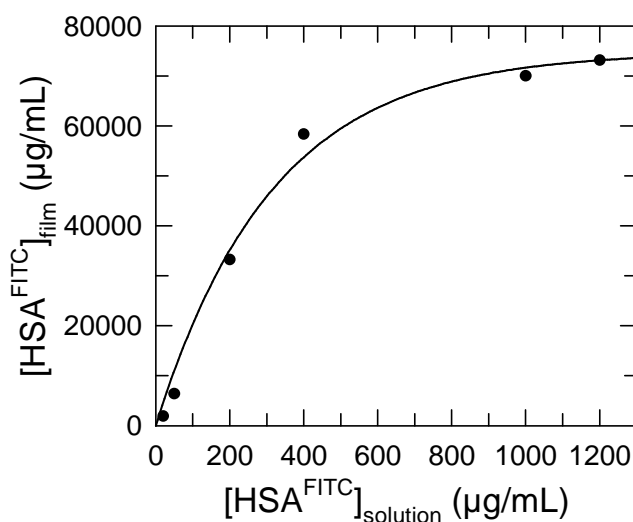
**Loading rates of labeled human serum albumin in PLL/HA films.** To reveal a possible relationship between the mobility and the concentration of the protein within PLL/HA films, they have been exposed for 30 min to protein solutions of various concentrations. Protein solutions of known concentrations were used to calibrate the apparatus (UV spectrophotometer). Then, we could obtain the concentration inside the film as a function of the concentration of the solution used during the deposition (Figure 3). The following relation can approximate the measured data:

$$[\text{HSA}^{\text{FITC}}]_{\text{film}} = 74800 \left( 1 - e^{-0.00317 [\text{HSA}^{\text{FITC}}]_{\text{sol}}} \right) \quad (4.2.5 - 1)$$

where  $[\text{HSA}^{\text{FITC}}]_{\text{sol}}$  and  $[\text{HSA}^{\text{FITC}}]_{\text{film}}$  stand for the concentration of labeled human serum albumin in the solution and in the film, respectively. It should be noted that the film thickness stays constant at  $7 \mu\text{m}$  whatever the final concentration of the protein loaded into the film. The comparison of the infrared spectrum of a PLL/HA film and the same film loaded with  $\text{HSA}^{\text{FITC}}$

suggests that the film loses neither water nor HA chains (see the 4.2.7 “Supporting information” section).

Figure 4.4 shows that the internal concentration tends to a plateau ( $\approx 75000 \mu\text{g/mL}$ ) when the concentration of the solution used during deposition exceeds about  $1000 \mu\text{g/mL}$ . The sloping region observed for low concentrations is due to the limited deposition time (30 min). Increasing this time would raise the internal concentrations above those corresponding to 30 min exposure time. This indicates that the results in Figure 4.4 do not correspond to adsorption “isotherms” characteristic of systems at thermodynamic equilibrium. Fixing the contact time always at 30 min and changing the solution concentration allow tuning the concentration of proteins in the film and to study the influence of this concentration on the protein mobility.



**Figure 4.4:** Absorption curve of HSA<sup>FITC</sup> in a (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL film determined from UV measurements. [HSA<sup>FITC</sup>]<sub>solution</sub> corresponds to the concentration of the deposition solution, [HSA<sup>FITC</sup>]<sub>film</sub> to the concentration obtained in the film after 30 min deposition. The line corresponds to eq. 4.2.5–1 .

The ratio “protein concentration in the film / protein concentration in solution during deposition” reaches at least  $\approx 70$ . This result suggests that PLL/HA films have a great affinity for [HSA<sup>FITC</sup>] or, in other words, that the internal chemical potential of these molecules is not only determined by their concentration.

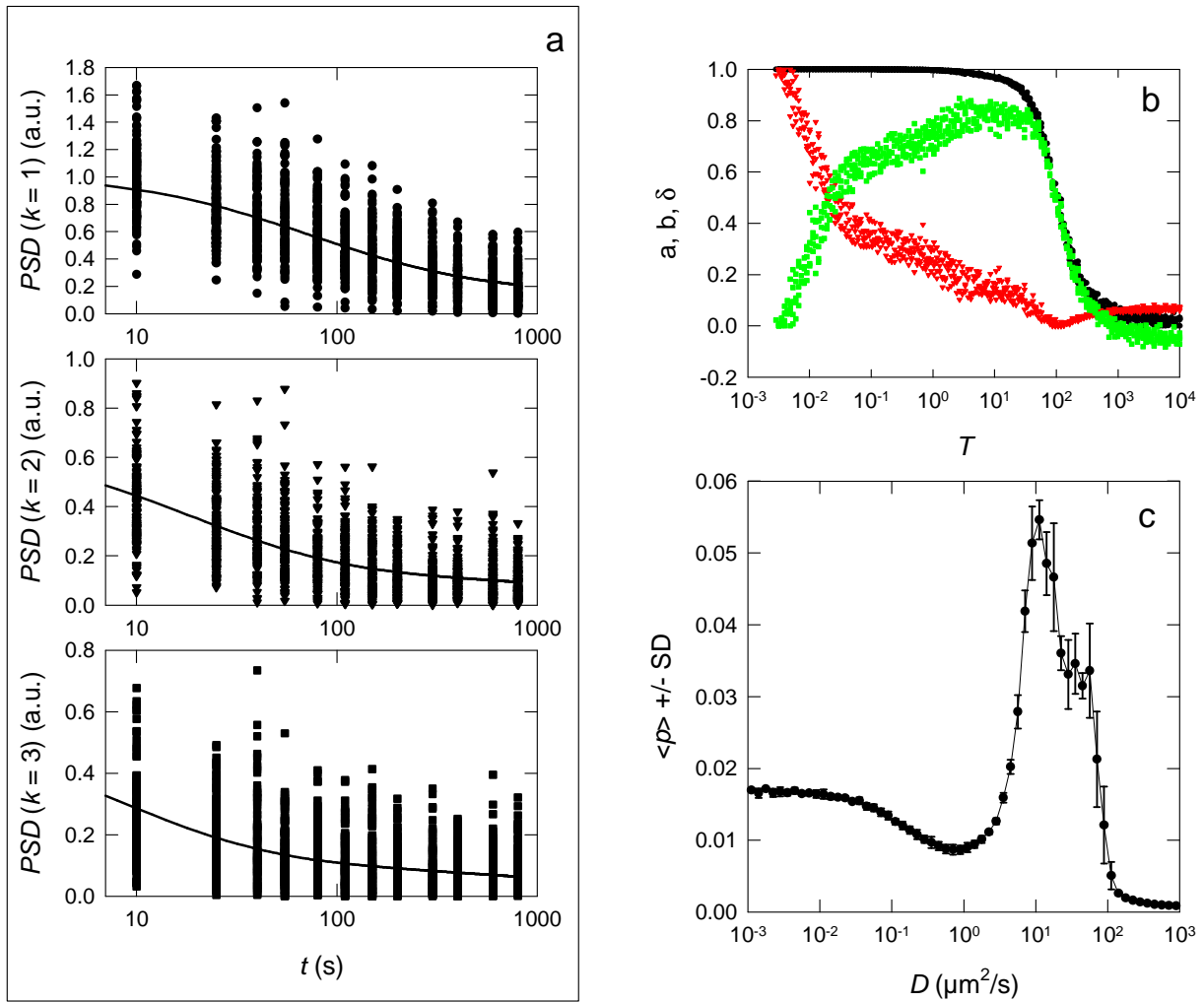
**Diffusion coefficients of labeled human serum albumin (HSA<sup>FITC</sup>) for various loading rates.** We will now focus on the determination of the diffusion coefficients of HSA<sup>FITC</sup> in PLL/HA films with the particular aim of finding out how these coefficients are dependent on the internal concentration. We illustrate the procedure with two examples, namely HSA<sup>FITC</sup> at 0.5 and

100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in solution. These two concentrations are expected to lead to different spectra since visual examination of the FRAP pictures reveal a strong difference in recovery speed.

In panel a) of Figures 4.5 and 4.6, we show the experimental PSD (symbols) derived from the postbleach pictures, as a function of the recovery time,  $t$  (see the “computational background” section). The PSD were computed along the 128 central lines for the first three harmonics ( $k = 1$  to 3) and normalized in such a way that the highest average experimental PSD value be equal to unity (note that this normalization serves only to preserve the same scale in all experiments and does not alter the evaluation of the diffusion coefficients). Then, the PSD were computed using eq. 4.2.4–6 wherein the weights  $p_j$  have been optimized as described in the “computational background” section (lines in panel a) of Figures 4.5 and 4.6).

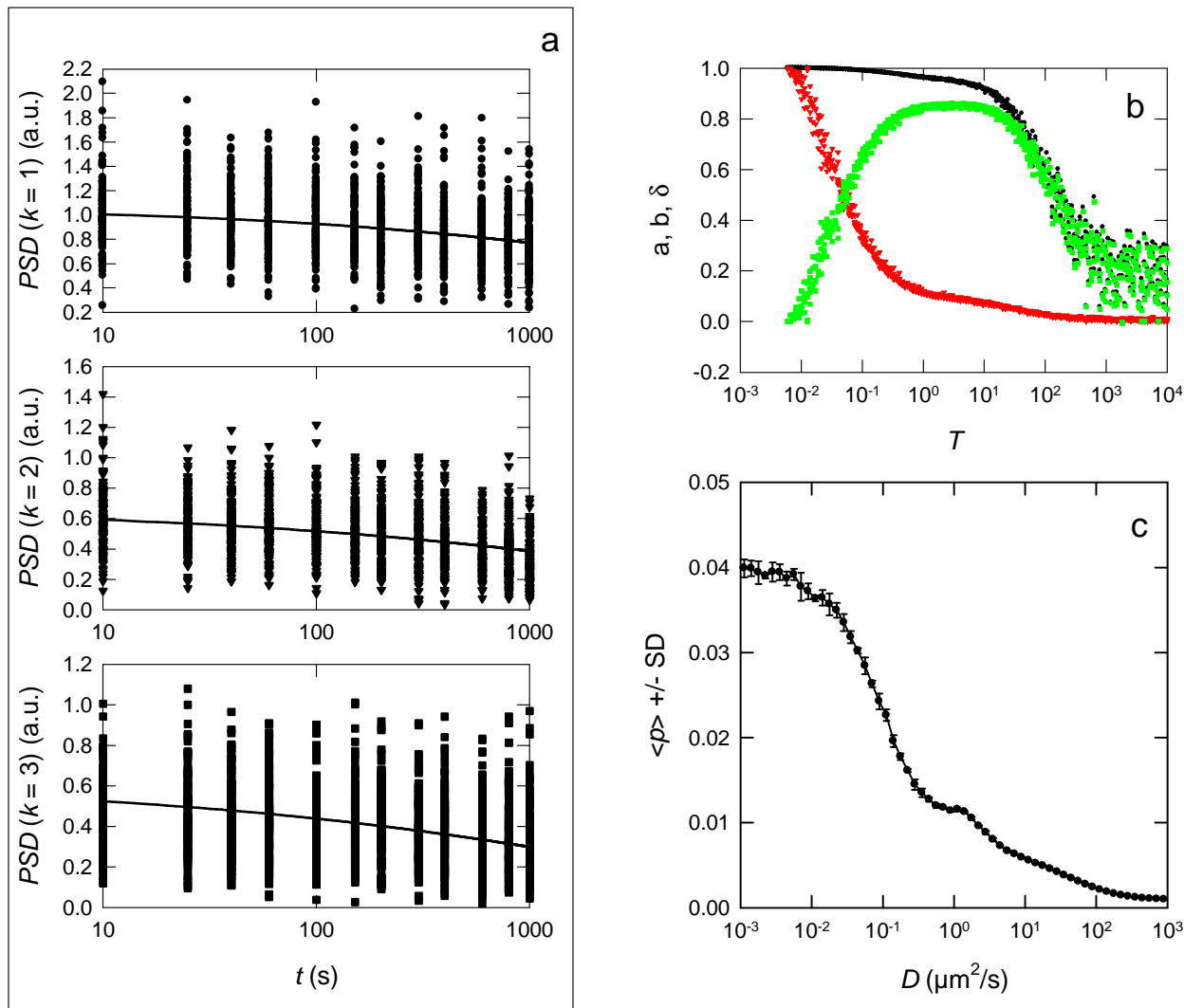
The evolution of the functions  $a(T)$ ,  $b(T)$  and  $\delta(T)$  during the cooling process is shown in panel c) of Figures 4.5 and 4.6. The maximum of  $\delta(T)$  indicates where the gof is maximum while the gain of information has been kept at its minimum. In other words, the position,  $T_0$ , of the maximum of  $\delta(T)$  indicates the temperature at which the largest amount of information can be safely extracted from the available measurements. Finally, panel c) of Figures 4.5 and 4.6 represents the respective diffusion coefficient spectrum. In figure 4.5c, the main peak is located at  $D = 10 \mu\text{m}^2/\text{s}$  and a secondary peak, though not well differentiated from the main one, might be identified at  $D \approx 60 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . The latter one would correspond to a small proportion of labeled molecules that diffuse as in a solution, i.e. not perturbed by the polymeric environment. In contrast, the main peak corresponds to molecules with reduced mobility. Finally there are also, even at low concentration, molecules that are weakly mobile or even immobile (left wing of the spectrum:  $p(D < 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}) \approx 0.3$ ). In Figure 4.6c, the "immobile" part of the tracers rises to  $\approx 0.7$  and the peak(s) at  $D \geq 10 \mu\text{m}^2/\text{s}$  have disappeared. A small peak is still visible at  $D \approx 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$  which may be reminiscent of the rapidly moving molecules. To strengthen this observation, it was useful to sum up the proportions corresponding to all  $D_j$ 's smaller than a given value (e.g.  $D < 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) and to examine how this cumulative frequency evolves with the labeled molecule concentration (Figure 4.7). We observe that the amount of slow molecules increases strongly over the interval 20-2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of the internal concentration.

We may assume that free polycation chains may decorate multi-charged HSA molecules (net charge  $\approx 15e$  at  $\text{pH} \approx 7$  [Shcharbin, Janicka et al. 2007], with  $e \approx -1.6 \times 10^{-19} \text{ C}$ ) so that the radius of this combination is larger than that of the HSA molecule alone. At high enough the  $\text{HSA}^{\text{FITC}}$



**Figure 4.5:** (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL film exposed to a HSA<sup>FITC</sup> solution at 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  so  $[\text{HSA}^{\text{FITC}}]_{\text{film}} \approx 118 \mu\text{g}/\text{mL}$ . **a)** Values of the PSD for the overtones  $k = 1$  to 3 derived from the fluorescence intensity as a function of the postbleach time, after subtraction of the prebleach image, using Eq. 4.2.4–4. The lines correspond to eq. 4.2.4–6. **b)** Evolution of the functions  $a(T)$  (black symbols),  $b(T)$  (red symbols) and  $\delta T$  (green symbols) during the five annealing cycles. In each cycle, the maximum on  $\delta T$  fixes the value  $T_0$  of  $T$  at which the diffusion coefficient spectrum is derived leading to the fit of the PSD shown in panel a). **c)** Diffusion coefficient spectrum averaged over the five simulations at  $T_0$  resulting from the annealing cycles (the vertical bars are the standard deviations obtained from these five independent annealing cycles).

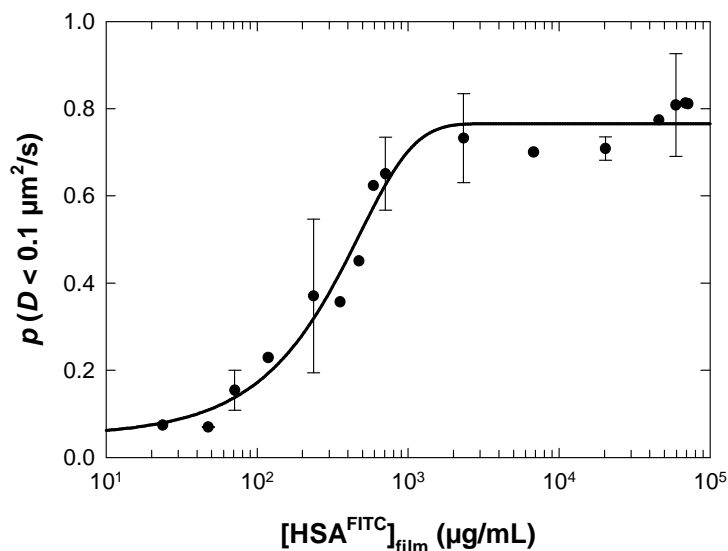
concentration in the film, the albumin molecules and the free polycation may form large aggregates that diffuse slowly or even appear immobile, as may be concluded from the work of Ramasamy *et al.* [Ramasamy, El-Maghrabi et al. 2007]. In addition, it may be hypothesized that, as the internal concentration increases, a growing part of the albumin molecules interact directly with the positive charges of the PLL chains involved in the PLL/HA network that are not balanced out by negative charges of the hyaluronate polyanions. Even if there were no



**Figure 4.6:** Same as Figure 4.5, except that the proteins were loaded from a solution at  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  so  $[\text{HSA}^{\text{FITC}}]_{\text{film}} \approx 20320 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

electrostatic interaction between HSA molecules and PLL, the meshwork constituted by the polyelectrolytes would constitute an obstacle to the diffusion of “foreign” molecules or especially clusters like does the cytoskeleton [Klann, Lapin et al. 2009]. It may also be mentioned that a transition from a low- to a high-concentration regime of the diffusion coefficient was already noticed in the case of aggrecan monomers as well as aggrecan aggregates, both following the same dependence on concentration in solution [Gibbon & Hardingham 1998].

It has been observed that the film underwent a crossover from a medium where the largest part of the labeled protein molecules moves “rapidly” (Figure 4.5c) to a crowded environment where diffusion is “slow” (Figure 4.6c). At the maximum internal concentration, i.e.



**Figure 4.7:** Cumulative proportion of “slow” molecules as a function of the protein concentration in the film obtained using eq. (4.2.5–1). Points are mean values obtained for each concentration, and error bars correspond to standard deviations (where at least two experiments were performed). The line to guide the eye suggests the passage from the low-concentration to the high-concentration medium, i.e. the effect of the increasing overcrowding on mobility.

75000 μg/mL, the volume fraction,  $\eta$ , equals about 0.06 within the film. This value is below the percolation threshold  $\eta_c \approx 0.34$  [Lorenz & Ziff 2001]. However, two neighboring molecules are separated by a distance near the diameter of a molecule if we refer to the gyration radius  $R_{\text{gyr}} = 2.74$  nm [Kiselev, Gryzunov et al. 2001]. In these conditions, it may be expected that molecules collide and form aggregates through electrostatic attraction that have less mobility than the separated molecules. At smaller concentration in the film (namely down to 2000 μg/mL),  $p(D < 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s})$  stays at the same value (Fig 4.7) although the intermolecular distance increases and thus renders the probability of forming aggregates smaller. This suggests that the protein molecules must primarily interact with free PLL chains stored in the film as well as with the PLL/HA network constituting the film.

#### 4.2.6. Conclusion

In this work, we have applied the FRAP method associated with the spatial Fourier analysis to the evaluation of the mobility of human serum albumin, taken as a model protein, stored in a polyelectrolyte multilayer film. This film has been obtained by the alternate deposition

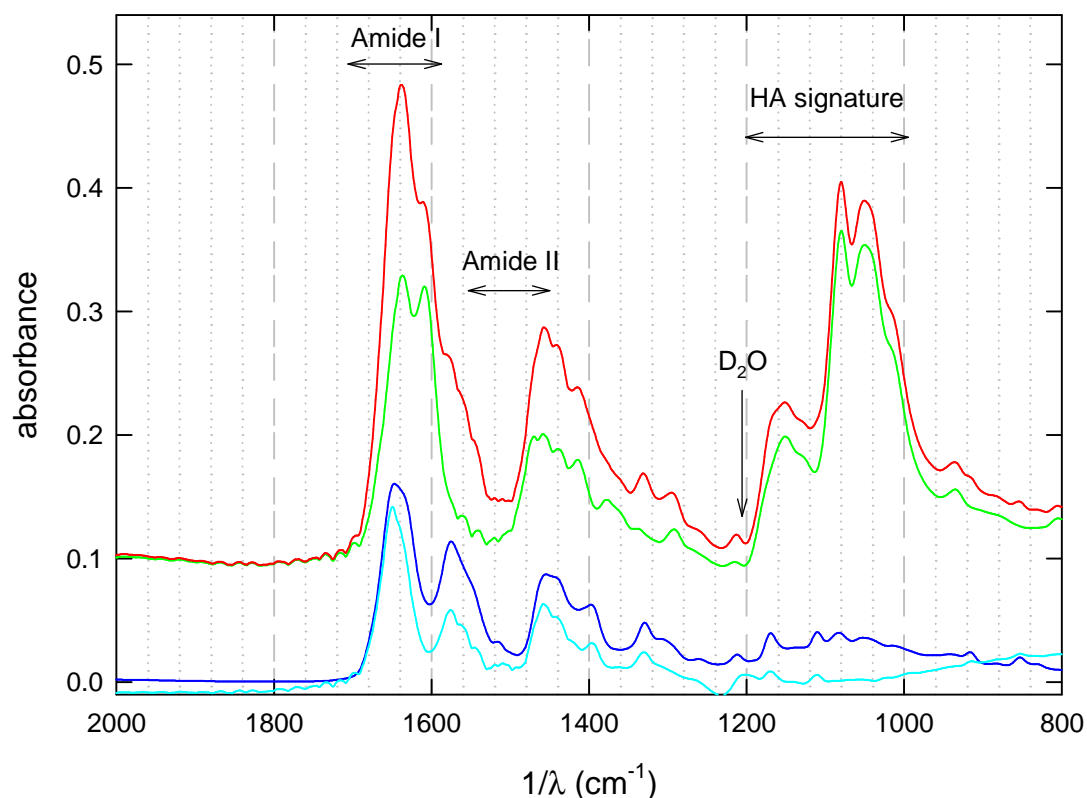
of poly(L-lysine) and hyaluronate polyanions on a solid substrate. The film constructed in this way is relatively thick ( $\sim 7 \mu\text{m}$ ) and highly hydrated and did already serve as a drug reservoir [Vodouhê, Le Guen et al. 2006]. It is worth reminding that the analysis of FRAP measurements based on the spatial Fourier transform requires no hypothesis on the initial fluorescence profile, *i.e.* the profile immediately after the bleaching [Berk, Yuan et al. 1993; Orlova, B rtov  et al. 2011]. Thanks to the simulated annealing approach where a criterion is introduced to minimize the risk of overinterpretation of the measurements, the spectrum of the diffusion coefficient has been determined. The present study has shown that a (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL polyelectrolyte film has the capability to store human serum albumin at concentrations that may exceed by far those of the solutions brought into contact with the film. The FRAP method described above has revealed that the mobility of this protein within the film is largely dependent on its concentration. The crossover from the low-concentration regime to the high-concentration regime should have consequences on the release of albumin stored in the film. This point might be discussed in a forthcoming article.

#### 4.2.7. *Supporting information*

**Fourier Transform Infrared Spectroscopy in the ATR mode.** Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) in the ATR mode was performed on an Equinox 55 FTIR spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) using a liquid nitrogen cooled MCT detector. Poly(ethyleneimine) (PEI,  $M_w \approx 450 \text{ kDa}$  (LS),  $M_n \approx 60 \text{ kDa}$  (GPC), Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was used in these experiments to enhance adsorption of the first HA layer. PEI/(HA/PLL)<sub>15</sub> films were built up from D<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich) solutions of polyelectrolytes at 1 mg/mL and containing 0.15 M NaCl, buffered at pD 7.8 with 10 mM TRIS. After each 5-min lasting polyelectrolyte adsorption from flowing solutions atop the ZnSe substrate, the polyelectrolyte solution was replaced by buffer solution. Then, the infrared spectrum of the film was acquired by accumulating 512 scans with a 2 cm<sup>-1</sup> resolution. The transmitted intensity was compared to that transmitted by the naked ZnSe crystal to calculate the absorption spectrum of each layer. After the film construction, HSA<sup>FITC</sup> was deposited during 30 min on the PEI/(HA/PLL)<sub>15</sub> film from a 1000  $\mu\text{g/mL}$  HSA<sup>FITC</sup> solution (same conditions as for polyelectrolytes) where D<sub>2</sub>O replaced H<sub>2</sub>O. During the rinsing with buffer solution, the infrared spectrum of the loaded film was acquired in the same manner as before. An independent experiment was performed by monitoring the flow



of a 1000  $\mu\text{g/mL}$  HSA<sup>FITC</sup> solution directly over the crystal. We focused on the amide I region (1700  $\text{cm}^{-1}$  to 1590  $\text{cm}^{-1}$ ) and on the amide II region (1550  $\text{cm}^{-1}$  to 1450  $\text{cm}^{-1}$ ) of the spectra, both attributed to bonds in polyelectrolytes and proteins, on the D<sub>2</sub>O stretching band (at 1209  $\text{cm}^{-1}$ ) and on the region ranging from 1200 to 1000  $\text{cm}^{-1}$  (HA signature). The second derivative of each spectrum was calculated to locate precisely the peaks. Note that the probing depth (typically between 0.5 and 2  $\mu\text{m}$ ) is smaller than the thickness of a (HA/PLL)<sub>15</sub> film ( $\approx 5 \mu\text{m}$ ).



**Figure 4.8:** Spectra of different systems between 2000  $\text{cm}^{-1}$  and 800  $\text{cm}^{-1}$  from FTIR spectroscopy in the ATR mode. The spectrum of a PEI/(HA/PLL)<sub>15</sub> film (PEI as reference) is depicted in green and the spectrum of a PEI/(HA/PLL)<sub>15</sub> film after deposition of HSA<sup>FITC</sup> in red. Subtraction of the first one from the second one gives the blue curve: "HSA<sup>FITC</sup> in the film". The cyan curve corresponds to the spectrum of the HSA<sup>FITC</sup> solution (buffer solution as reference). For the sake of clarity, the spectra of the unloaded and the loaded films have been shifted by +0.1 unit.

**FTIR measurements.** In order to understand how the loading of a PLL/HA film with HSA<sup>FITC</sup> occurs, FTIR spectroscopy experiments in the ATR mode were realized. Figure 4.8 shows the spectrum of a (HA/PLL)<sub>15</sub> film (green curve) and of a (HA/PLL)<sub>15</sub> film loaded with HSA<sup>FITC</sup> (red curve). The growth of the amide I and amide II bands after loading indicates that the film is

filled with proteins. They diffuse so deep in the film that they enter the region of the film near the crystal substrate that is accessible to the evanescent wave of the apparatus. Obviously, because HSA is negatively charged at pH 7.4, such a filling of the film should be compensated by a release of other negative species, for example polyanions, and could lead to the release of water because the film thickness is the same before and after loading. To discuss that, one can first note that the curve representing HSA<sup>FITC</sup> in the film (blue curve, difference between the two former curves) looks really close to the curve of a HSA<sup>FITC</sup> solution (cyan curve). It presents no negative peak at 1209 cm<sup>-1</sup> indicating that there is no loss of water (D<sub>2</sub>O) during loading with proteins. The right part of the spectrum of the film, between 1200 cm<sup>-1</sup> and 1000 cm<sup>-1</sup>, can be attributed to the stretching vibrations of C-O bonds which occur in HA [Jackson, Choo et al. 1995]. The differential curve looks here flat and close to zero, which means that HA is not released from the film during filling with HSA. This observation contradicts the hypothesis that polyanions might be released as a counterpart of the loading of negative HSA.

To compare the two HSA spectra, in the film and in solution, the second derivatives of these curves were calculated. There are three minima in the amide I region in the case of the solution, at 1636, 1652 and 1682 cm<sup>-1</sup>, whereas a very small fourth minimum appears in the case of proteins embedded in the film at 1603 cm<sup>-1</sup>, the three others being nearly unchanged (1631, 1652 and 1679 cm<sup>-1</sup>). Such spectral similarities in this region support the hypothesis that the protein structure remains almost unchanged upon embedding. The three common peaks seem to represent intramolecular  $\beta$ -sheets,  $\alpha$ -helix and intermolecular  $\beta$ -sheets, and the small peak at 1603 cm<sup>-1</sup> could correspond to another type of structure appearing consequently to the loading in the PLL/HA film.

Because it is now clear that neither water nor hyaluronan were released during loading of HSA in the PLL/HA film, the only assumption, which can be proposed is the following: to compensate the gain of negative charges due to the proteins introduced into the film, chloride or bromide ions should be exchanged from the film to the solution. Following the chloride or bromide concentration is not possible in the infrared domain. Therefore, to demonstrate this hypothesis, we could have performed the same experiment, using nitrate instead of these anions in the supporting electrolyte, since the nitrate ion presents a well-defined N-O elongation band at 1350 cm<sup>-1</sup>. However, this experiment has not been performed because it is known that changing

the ions in polyelectrolyte systems can appreciably change the properties of the films [El Haitami, Martel et al. 2009].

### 4.3. Résultats complémentaires

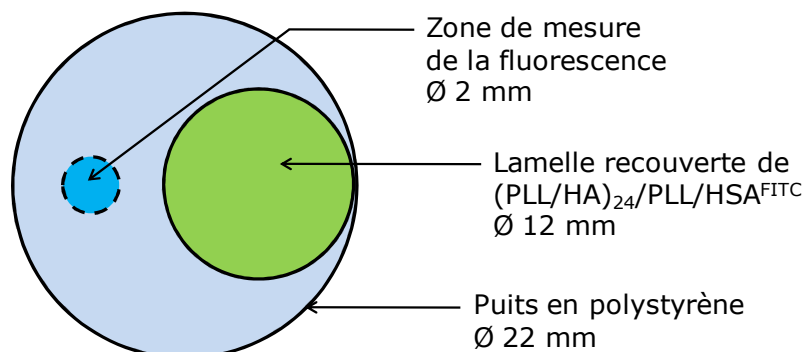
Des résultats ont également été obtenus concernant la libération spontanée de la HSA<sup>FITC</sup> hors des films (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL.

Dans l'optique d'adapter nos films à des stratégies du domaine biomédical, il est important d'aborder la cinétique de libération des protéines, c'est-à-dire d'obtenir l'évolution temporelle de la libération. Dans cette optique, la seule méthode envisageable est d'observer *in situ* l'évolution de la concentration de protéines dans le surnageant. Dans ce but, un lecteur de plaque multi-mode BioTek Synergy<sup>TM</sup> HT (BioTek France, Colmar, France) a été utilisé en mode fluorescence. L'excitation a été réglée à 490 nm (bande de 10 nm) et l'émission à 520 nm (bande de 10 nm). L'appareil a été utilisé en mode automatique : les intensités de fluorescence d'une série de solutions-étalons de HSA<sup>FITC</sup> placées dans une plaque de 12 puits ont été enregistrées avant chaque mesure sur les échantillons, afin que la sensibilité de l'appareil s'ajuste automatiquement. Ces solutions-étalons subissent le même vieillissement que les échantillons car elles sont stockées dans les mêmes conditions.

Les mesures d'intensité de fluorescence d'une solution au contact d'une lamelle de verre recouverte du film chargé de protéines ont été réalisées comme suit. La lamelle de 12 mm de diamètre sur laquelle a été construit le film a été plaquée après le dernier rinçage au fond et sur le côté d'un puits de diamètre 22 mm (plaque 12 puits Costar®, Corning Inc., NY, Etats-Unis). 500 µL de la solution tampon usuelle a ensuite été introduite dans le puits : ceci marque le temps  $t = 0$  de l'expérience de mesure de la libération de protéines fluorescentes. Pour mesurer le signal issu de la région jouxtant la lamelle sans mesurer celui issu de la lamelle, l'appareil a été paramétré de façon à ce que le faisceau de lumière soit confiné dans un disque de rayon 1 mm centré dans l'espace à côté de la lamelle (voir figure 4.9). Ainsi, le signal mesuré n'est pas influencé par le film présent.

L'expérience se résume donc à deux étapes : 1) la mesure des solutions étalons de HSA<sup>FITC</sup> pour l'auto-ajustement de la sensibilité, 2) la mesure des échantillons selon la procédure décrite dans le paragraphe précédent. L'expérience proprement dite a duré 10 jours et a été réalisée

simultanément sur plusieurs échantillons (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL/HSA<sup>FITC</sup> chargés à différentes concentrations. Entre chaque mesure, les échantillons et solutions-étalons ont été stockés dans les mêmes conditions : à 25°C, à l'abri de la lumière et isolé de l'air ambiant.



**Figure 4.9 :** Schéma d'un puits de plaque 12 puits dans lequel est placé à  $t = 0$  une lamelle recouverte d'un film (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL/HSA<sup>FITC</sup> (représentée en vert) et 500  $\mu$ L de solution de NaCl (0.15 mol/L) et de TRIS (0.1 mol/L) ajusté préalablement à pH = 7.4. La zone délimitée par les pointillés est la zone de lecture de la fluorescence de la solution, sa surface est de  $\approx 3.14 \text{ mm}^2$ .

Les échantillons ont été préparés de la même façon que pour l'étude du chargement et de la diffusion : les films (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL construits sur des lamelles de verre de 12 mm de diamètre ont été mis au contact de solutions de HSA<sup>FITC</sup> de différentes concentrations pendant 30 minutes, et rincés  $3 \times 10 \text{ min}$ . A l'issue du dernier rinçage, les films (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL/HSA<sup>FITC</sup> ont été mis au contact de 500  $\mu$ L solution tampon (dans le puits) ( $t = 0$ ). Trois concentrations de protéines dans les films ont été testées : 200, 2000 et 20000  $\mu\text{g/mL}$ .

Seules les mesures réalisées à partir des échantillons chargés à 20000  $\mu\text{g/mL}$  se sont avérées concluantes, car la sensibilité de l'appareil n'était pas suffisante pour mesurer les concentrations des surnageants des deux autres. A l'aide de l'étalonnage réalisé avant chaque mesure, les intensités mesurées pour les échantillons ont été converties en concentrations. La figure 4.10 donne l'évolution de la concentration de HSA<sup>FITC</sup> libérée dans la solution tampon en fonction du temps d'incubation avec le film (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL/HSA<sup>FITC</sup>.

La première observation est que le flux de sortie des protéines est extrêmement élevé au départ : durant les 30 premières minutes, 1  $\mu\text{g}$  de HSA<sup>FITC</sup> est libéré. Cela représente une partie non négligeable de la quantité initialement présente dans le film : avec un diamètre de 12 mm et une épaisseur de 7  $\mu\text{m}$ , le film a un volume approximatif de 0.79  $\text{mm}^3$  soit  $7.9 \times 10^{-4} \text{ mL}$ , ce qui

correspond à une masse de protéines initialement dans le film de  $20000 \mu\text{g/mL} \times 7.9 \times 10^{-4} \text{ mL} = 15.8 \mu\text{g}$ . Par conséquent, plus de 6 % de la masse introduite sont libérés au cours de la première demi-heure. Ensuite, le flux de sortie des protéines diminue ensuite progressivement, et finalement il n'y a que  $2 \mu\text{g}$  environ qui sont libérés sur 10 jours, soit 12 % de la masse totale de protéines.

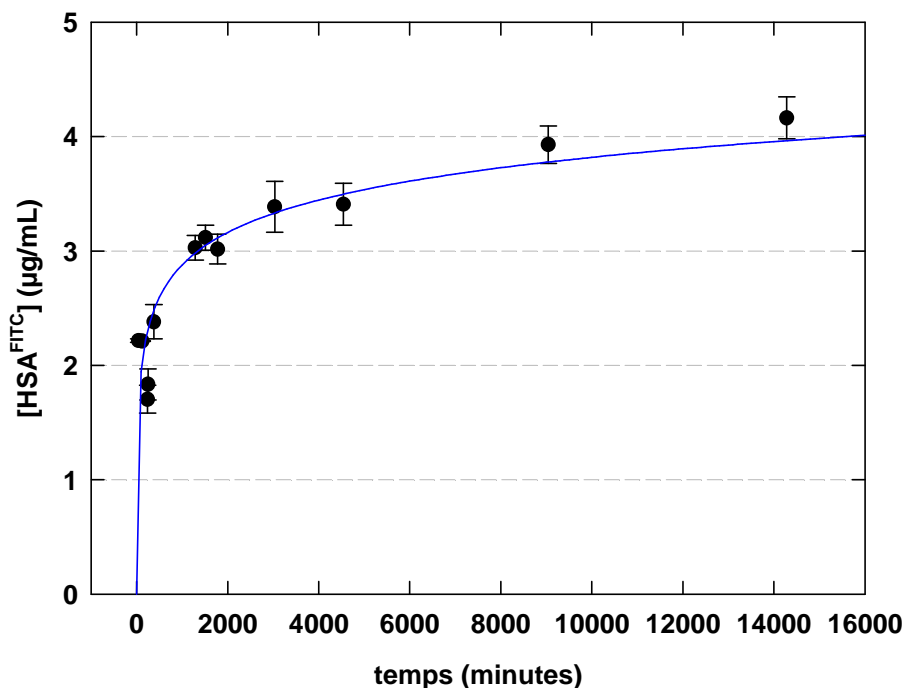


Figure 4.10 : Evolution temporelle de la concentration en  $\text{HSA}^{\text{FITC}}$  libérée dans une solution tampon ( $\text{NaCl}$   $0.15 \text{ mol/L}$  et  $\text{TRIS}$   $0.1 \text{ mol/L}$ ,  $\text{pH} = 7.4$ ) mise en contact à  $t = 0$  avec un film  $(\text{PLL}/\text{HA})_{24}/\text{PLL}/\text{HSA}^{\text{FITC}}$  où  $[\text{HSA}^{\text{FITC}}]_{\text{film}} \approx 20000 \mu\text{g/mL}$ . Le film est déposé sur une lamelle de verre de diamètre  $12 \text{ mm}$  et le volume de la solution est de  $500 \mu\text{L}$ . La courbe en bleu sert à guider l'œil.

Il serait désormais intéressant de disposer de la courbe de libération pour toutes les concentrations étudiées. Ainsi, il serait possible d'examiner l'influence de la concentration des films sur la cinétique de libération. L'utilisation d'un autre lecteur de plaques, plus sensible, devrait être envisagée. En attendant de disposer d'un tel appareil, une autre approche a été imaginée. Les intensités de fluorescence des surnageants des différents films ont été mesurées à l'aide d'un fluorimètre qui dispose d'une grande sensibilité (Bio-Rad Versafluor™, excitation fixe à  $490 \text{ nm}$  et émission mesurée à  $520 \text{ nm}$ ). Il a d'abord été envisagé de faire de multiples prélèvements pour suivre l'évolution de la fluorescence dans le temps, mais cela semble perturber la sortie des molécules, certainement à cause des flux engendrés par l'action de la

pipette. Ainsi, ces mesures ont été effectuées pour des films chargés à différentes concentrations mais uniquement à  $t = 6$  jours.

À l'issue du dernier rinçage, les échantillons préparés comme précédemment ont été mis au contact de 500  $\mu\text{L}$  de solution tampon (utilisée pour les solutions et les rinçages) et laissés à 25°C durant 144 h (6 jours). Après cette période, l'intensité de fluorescence de la solution surnageante a été mesurée pour chaque échantillon. Comme l'intensité est proportionnelle à la concentration en protéines, le rapport de la quantité libérée à la quantité initialement chargée a pu être calculé. La quantité initialement chargée a été déterminée à l'aide de la courbe de la figure 4.4. La figure 4.11 représente la quantité relative de protéines libérée en fonction de la concentration initiale du film.

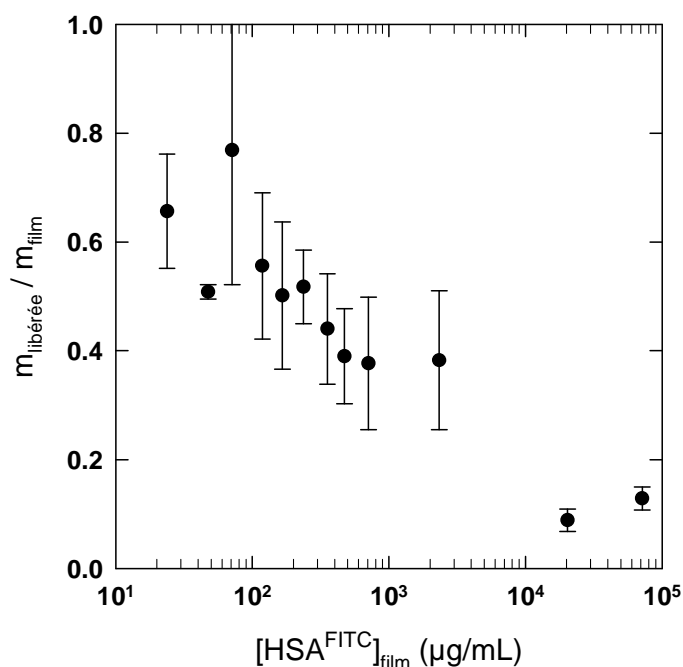


Figure 4.11 : Quantité relative de  $\text{HSA}^{\text{FITC}}$  libérée spontanément au bout de 6 jours à partir d'un film  $(\text{PLL}/\text{HA})_{24}/\text{PLL}/\text{HSA}^{\text{FITC}}$ , représentée en fonction de la concentration à l'intérieur du film à  $t = 0$ . Chaque disque noir a été déterminé à partir de quatre films distincts. La barre d'erreur correspondante représente l'écart-type des mesures sur ces quatre films.

Le rapport des quantités relatives libérées n'étant jamais nul, cela confirme une libération spontanée de la  $\text{HSA}^{\text{FITC}}$  au bout de 6 jours d'incubation du film dans une solution tampon. Il apparaît également que la quantité de  $\text{HSA}^{\text{FITC}}$  initialement chargée a une grande influence sur la quantité relative libérée au bout de 6 jours. La proportion libérée est de 70 % environ à basse

concentration et diminue jusqu'à 10 % environ pour les concentrations fortes ( $[HSA^{FITC}]_{film} > 10000 \mu\text{g/mL}$ ). En fait, plus le système est concentré en protéines au départ, moins cette quantité relative est importante. Dans l'expérience réalisée avec le lecteur de plaque pour un film où  $[HSA^{FITC}]_{film} = 20000 \mu\text{g/mL}$  (figure 4.10), la quantité libérée à 6 jours représente 12.5 % de la masse introduite dans le film. Cette estimation est en accord avec l'expérience de libération sur 6 jours réalisée par fluorimétrie.

La mobilité interne n'est donc pas la seule caractéristique à être diminuée par l'augmentation de la concentration en protéines. Il existe vraisemblablement un lien entre la mobilité des protéines au sein d'un film PLL/HA et leur libération spontanée nécessairement liée à la mobilité. Ainsi, l'augmentation de la concentration en  $HSA^{FITC}$  augmente l'encombrement, et favorise la formation d'agrégats de protéines, mais surtout la formation de complexes protéines-polycations, freinant la sortie de ces molécules.





# Conclusions & perspectives

Ce travail de thèse couvre deux thèmes principaux s'articulant autour des revêtements polymériques et leur association à des biomolécules : 1) la conception de revêtements polymériques à base de multicouches de polyélectrolytes ou de gels de polyacrylamide dont l'activité biocatalytique peut être modulée par étirement et 2) l'étude de la dynamique de perméation de l'albumine dans des films multicouches de polyélectrolytes à croissance exponentielle de type PLL/HA.

Pour le premier aspect, développé dans le chapitre 3, trois systèmes ont été développés : le premier est un système réservoir/barrière contenant des enzymes et capable d'induire par étirement une réaction biocatalytique à l'interface avec la solution. Le deuxième système possède une architecture similaire mais les substrats enzymatiques sont enfouis dans le réservoir et les enzymes déposées sur la barrière. Un étirement permet d'activer la réaction au niveau de la barrière et surtout de libérer les produits de la réaction. Le dernier système est basé sur un réseau polymérique covalent – soit un film multicouche réticulé soit un gel de polyacrylamide – et est chargé avec des enzymes. L'objectif est ici d'induire des déformations des enzymes, et donc une modification de leur activité, *via* une manipulation macroscopique du système.

Le système composé du réservoir PLL/HA contenant des enzymes ALP et recouvert d'une barrière (PDADMA/PSS)<sub>n</sub> constitue un exemple de biomimétisme. En effet, le concept de sites cryptiques rencontré au sein de la fibronectine est reproduit ici à une autre échelle : un étirement au-delà d'un taux critique induit une exposition des enzymes au niveau de la barrière du film, ce qui permet aux substrats FDP présents dans la solution surnageante d'accéder aux sites actifs des enzymes. Ainsi, la réaction biocatalytique a lieu pendant quelques secondes. Celle-ci s'arrête en raison d'une rétro-inhibition des enzymes due à une accumulation des produits de la réaction dans la barrière. Afin de réactiver le système et de retrouver l'état initial, un rinçage et un retour à l'état de repos sont nécessaires. Il est alors possible d'activer une fois de plus la réaction en étirant le système : le mécanisme est réversible. Enfin, il est possible de moduler la quantité d'enzymes exposées lors de l'étirement en modifiant l'épaisseur de la barrière. Afin de palier aux limites de ce système, et notamment pour éviter l'inhibition des enzymes, une solution serait de diminuer la concentration en enzymes dans le réservoir, par exemple en diminuant l'épaisseur de ce dernier.

Ce type de constructions est prometteur et les évolutions potentielles sont nombreuses. Une architecture bicompartimentée composée de deux réservoirs et d'une barrière pour les séparer permettrait d'obtenir des revêtements biocatalytiques mécanosensibles capables d'induire plusieurs réactions chimiques.

Lorsque le réservoir PLL/HA est cette fois rempli de substrats enzymatiques et que les enzymes sont déposées sur la barrière (PDADMA/PSS)<sup>10</sup>, les résultats obtenus et les mécanismes impliqués sont totalement différents. Aucune réaction n'a lieu au repos, et les molécules de FDP et les enzymes ALP sont maintenues dans leurs positions respectives au sein du film. Quand le système est étiré au-delà d'un taux critique, une probable diminution de la densité du réseau de la barrière permet aux molécules FDP de diffuser vers l'extérieur du réservoir PLL/HA. En traversant la barrière PDADMA/PSS, les molécules FDP rencontrent les enzymes adsorbées et la réaction de déphosphorylation a lieu. De cette façon, toutes les molécules FDP sont transformées en fluorescéine. Une libération des produits de la réaction biocatalytique est donc initiée par l'étirement : il s'agit d'une libération « réactive ». Ce système présente un avantage par rapport au système précédent : la cinétique de réaction est constante et les enzymes ne sont pas inhibées, les produits de la réaction étant facilement évacués en solution. Cependant, la modification de la barrière induite par la contrainte mécanique n'est pas réversible, si bien qu'il n'est pas possible d'arrêter la libération/réaction en revenant à un état de repos. Pour résoudre ce problème, d'autres types de barrières devraient être testés (de type PDADMA/PAA par exemple). Le concept de *libération réactive induite par étirement* introduit à l'issue de cette étude présente de nombreuses perspectives prometteuses, notamment vis-à-vis de l'approche prodrogue. En effet, certains médicaments ne peuvent être administrés tels quels si bien qu'ils nécessitent d'être liés chimiquement à d'autres molécules. Leur libération effective ne se produit qu'après réaction chimique. Le système développé ici pourrait permettre de stocker des prodrogues dans les films et d'induire la libération des principes actifs en découlant *via* un stimulus mécanique.

Dans la dernière partie du chapitre 3, des systèmes polymériques ont été imaginés pour permettre de déformer *via* un étirement macroscopique la structure locale d'enzymes enfouies. Une première solution envisagée consiste à charger des films multicouches PLL/HA avec des enzymes et à les réticuler chimiquement pour fixer ces dernières dans le réseau. La réticulation a d'abord été optimisée, de façon à avoir un film étirable tout en conservant une activité enzymatique, car le but visé est de déformer les enzymes par étirement du film, pour les

désactiver de façon réversible. Les essais d'étirement n'ont cependant pas été concluants : aucun effet de l'étirement sur l'activité enzymatique des films n'a été constaté. Ceci peut s'expliquer par le fait que la proportion d'enzymes fixées dans les films correspond précisément à la diminution relative de l'activité constatée après réticulation : les enzymes fixées seraient inactivées lors de la formation du réseau covalent.

La deuxième solution proposée utilise une façon plus commune de former des réseaux covalents : la fabrication d'hydrogels. Dans ce cas, les enzymes ont été ajoutées directement au mélange réactionnel donnant naissance au gel. La recette du gel a d'abord été optimisée pour avoir une bonne tenue mécanique à l'étirement et une bonne élasticité. Ensuite, une étude a été réalisée pour permettre l'étirement de ce type de gel : pour cela, il faut en premier lieu l'immobiliser sur des feuilles de PDMS préalablement modifiée chimiquement en surface. La polymérisation du gel en présence des enzymes a certes permis d'en confiner certaines dans les mailles du réseau, mais la fixation covalente n'est probablement pas assez significative. Pour résoudre ce problème, les enzymes ont elles aussi été modifiées chimiquement avec des acrylates, de façon à ce qu'elles se couplent de façon covalente lors de la polymérisation du gel de polyacrylamide. L'enzyme sélectionnée s'avère cependant être très sensible à la température : toute activité est perdue après la polymérisation, qui est exothermique.

Pour répondre à la problématique posée, une autre approche pourrait être employée : il faudrait trouver le moyen de charger le gel de polyacrylamide ou le film réticulé après polymérisation, et d'induire une réaction *a posteriori* entre le réseau formé et les enzymes. A cette fin, des modifications chimiques des polymères mis en jeu seraient probablement nécessaires.

Les résultats de l'étude décrite dans le chapitre 4 sont prometteurs dans l'optique de concevoir un revêtement qui libérerait des molécules sous l'action de contraintes mécaniques. Cette étude permet en effet d'approfondir les connaissances relatives au chargement, à la diffusion et à la libération d'albumine-FITC ( $\text{HSA}^{\text{FITC}}$ ), une protéine modèle, dans un film PLL/HA, qui est un film à croissance exponentielle. Ces films agissent comme de véritables éponges à albumine : ces protéines sont y en effet concentrées très fortement et conservent leur structure. Lorsqu'une solution à 1 mg/mL est mise en contact du film pendant 30 minutes et que celui-ci est rincé pendant 30 minutes également, la concentration en albumine atteint 70 mg/mL à l'intérieur ! La diffusion de  $\text{HSA}^{\text{FITC}}$  en fonction de sa concentration dans le film a été caractérisée par des expériences de FRAP, dont les résultats ont été exploités avec une nouvelle méthode

utilisant la transformée de Fourier spatiale. Là aussi, les résultats sont spectaculaires : la concentration a une très grande influence sur le comportement diffusif. Plus la concentration est élevée, plus la mobilité est réduite au sein du film. Finalement, des expériences sur la libération de ces protéines ont permis d'obtenir un résultat similaire : plus la concentration en HSA<sup>FITC</sup> est importante, plus la quantité relative de protéines libérées hors de ces films PLL/HA est petite ! Il existe certainement un lien logique entre ces phénomènes : la libération de protéines est *a priori* une conséquence de la diffusion.

Ces travaux présentent de nombreuses perspectives dans le domaine des matériaux adaptatifs mécanosensibles. En biologie, on pourrait imaginer d'insérer des agents de transfection dans des films réservoir/barrière, qui ne transfecteraient effectivement les cellules cultivées sur le film que sous étirement. De même, le croisement des résultats communiqués dans cette thèse pourrait permettre de créer et de comprendre des revêtements mécanosensibles pour la libération de molécules. Une étude préliminaire a été menée récemment et concerne l'influence de l'étirement sur la mobilité de HSA<sup>FITC</sup> dans un film (PLL/HA)<sub>24</sub>/PLL. La figure I ci-dessous présente l'évolution temporelle du recouvrement de la fluorescence pour différents taux d'étirement.

Le recouvrement paraît d'autant plus grand que l'étirement est important. Ces expériences montrent un effet significatif de l'étirement du film sur la mobilité des protéines. Ainsi, il serait envisageable que la libération de l'albumine depuis ce type de films soit favorisée par un étirement. Ceci ouvrirait la voie vers l'élaboration de revêtements chargés avec des molécules d'intérêt thérapeutique dont la libération serait modulée par les contraintes exercées sur la surface.

En définitive, ce travail de thèse met à disposition de la communauté scientifique de nouveaux outils pour mieux comprendre les phénomènes de diffusion sur les surfaces. De plus, il exploite réellement les possibilités qu'offrent les films multicouches de polyélectrolytes, notamment par la mise au point de systèmes à l'architecture et aux fonctionnalités très pointues. Enfin, il propose un nouveau regard sur la problématique des surfaces mécanosensibles introduite au sein du laboratoire, notamment en introduisant l'utilisation d'hydrogels.

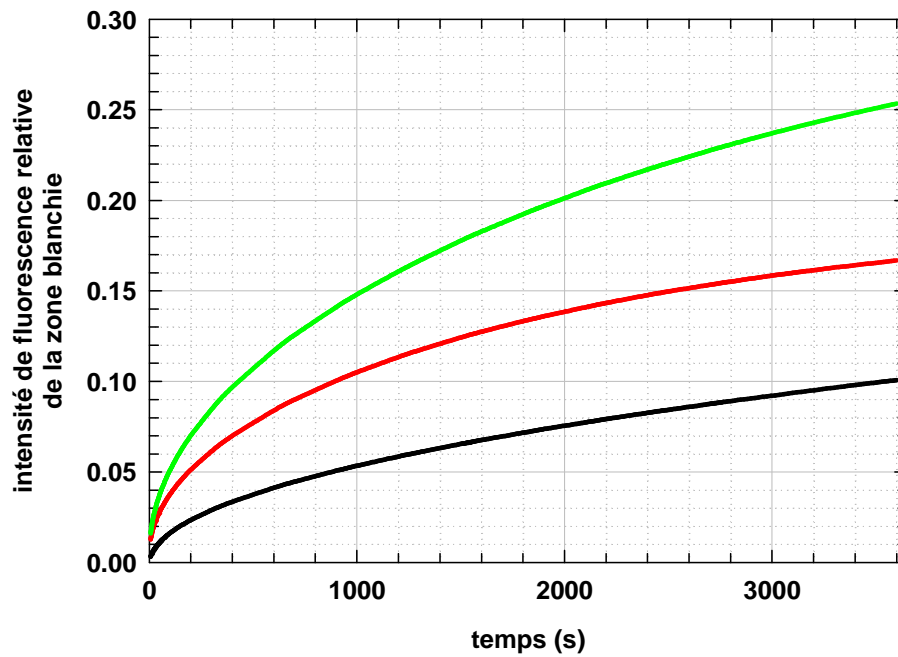


Figure I : évolution temporelle du recouvrement de fluorescence pour un film  $(PLL/HA)_{24}/PLL/HSA^{FITC}$  au repos (noir) ou étiré à 40 % (rouge) ou à 80 % (vert). L'intensité relative représentée correspond au rapport de l'intensité absolue de la zone blanchie divisée par l'intensité moyenne de la zone périphérique. Pour ces expériences, l'image étudiée a une taille de  $42 \mu\text{m}$  et la zone blanchie est un disque de rayon  $11 \mu\text{m}$ . Les courbes ont été normalisées de façon à avoir une intensité nulle à  $t = 0$ .



# Annexe 1

*Concerne la partie 3.2.2.2*

## ***Materials and methods***

**Materials.** All aqueous solutions were prepared using ultrapure water (resistivity close to 18.2 M $\Omega$ .cm) and stored at 3°C.

Poly(L-lysine) bromide (PLL, 60 kDa), poly(diallyldiamine ammonium) chloride (PDADMA, 200-350 kDa) and sodium poly(styrene sulfonate) (PSS, 60 kDa) were supplied by Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Sodium hyaluronate (HA, 400 kDa) was supplied by Lifecore Biomedical (Chaska, USA). Alkaline Phosphatase (ALP, type XXIV from human placenta) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and fluorescein diphosphate (FDP) from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Rhodamine Red®-X succinimidyl ester (Rho), which was used for the labeling of ALP, was purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France).

1 mg/mL polyelectrolyte solutions were prepared by dissolution of the respective adequate polymer amounts in a 0.15 M NaCl aqueous solution buffered at pH 7.4 with 0.01 M tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS).

The labeling of ALP with Rho was performed as follow: ALP was dissolved at 5 mg/mL in a sodium bicarbonate solution (0.1 M, pH = 8.5) whereas Rho was extemporaneously dissolved in dimethylsulphoxide at 10 mg/mL. The two solutions were mixed, to have a ratio of 10 moles of Rho per mol of ALP, and gently agitated at 3°C during 1 hour. Then, ALP<sup>Rho</sup> was purified by several dialyses with the bicarbonate buffer (Cut Off 10000 Da, Spectra Por 7 Dialysis Membrane, Spectrum Europe B.V., Breda, Netherlands), until the presence of Rho was no more detectable by UV-visible spectroscopy. The two final dialyses were performed with the previously described NaCl/TRIS buffer solution.

ALP<sup>Rho</sup> and FDP solutions were prepared at 0.5 mg/mL and 0.1 mg/mL respectively, with the same buffer solution as used to dissolve polyelectrolytes.

**Step-by-step build-up of films.** 18×18 mm<sup>2</sup> polydimethylsiloxane sheets (Specialty Manufacturing Inc., Saginaw, Michigan, U.S.A.), cleaned with absolute ethanol and ultra-pure water, were used as substrates. PLL/HA films were constructed with an automatic dipping machine (Dipping Robot DR3, Riegler & Kirstein GmbH, Potsdam, Germany) by alternate dipping of the PDMS sheets in a PLL solution (5 min), two rinsing solutions (2×5 min), a HA solution (5 min), two rinsing solutions (2×5 min), and so on. PDADMA/PSS films were constructed with a micropipette by covering alternatively the substrates with a PDADMA solution (1 min), a rinsing solution (1 min), a PSS solution (1min), again a rinsing solution (1 min) and so on.

In fact, after a (PLL-HA)<sub>30</sub>-PLL system was built, a 0.1 mg/mL FDP solution was brought in contact with it during 30 min, and the obtained system was rinsed three times with buffer solution (3×10 min). Then, the coated PDMS was fastened on a lab-made stretching device (see the “stretching device” part below). Finally, a (PDADMA-PSS)<sub>10</sub> system was built *in situ* on the previous one and ALP<sup>Rho</sup> was deposited on top of it by putting a 0.5 mg/mL ALP<sup>Rho</sup> solution in contact with the film during 30 min and by rinsing three times with buffer solution (3×10 min). The final system can be described with the following formula: (PLL-HA)<sub>30</sub>-PLL-FDP-(PDADMA-PSS)<sub>10</sub>-ALP. It was maintained always hydrated – even in the stretched state – in contact with buffer solution.

**Stretching device.** The stretching device enabled elongation of the silicone substrates directly under the confocal microscope [REF]. The stretching degree is defined by the parameter  $\alpha = (l - l_0) / l_0$ , where  $l_0$  and  $l$  correspond respectively to the initial and to the stretched length of the silicone sheet. The stretching motion is achieved by a precision electric motor at a velocity of 0.74 mm/s. All of the stretching experiments were carried out at ambient temperature in liquid conditions.

**Confocal laser scanning microscopy (CLSM).** The imaging of films were performed on a Zeiss LSM 510 confocal microscope equipped with an Argon laser (488 nm) and a HeNe laser (543 nm). A 40× objective lens with a numerical aperture of 0.3 (Zeiss Achroplan) was used. Fluorescein and fluorescein monophosphate (FMP) (enzymatic dephosphorylation of FDP by ALP yields to FMP and fluorescein) fluorescence was detected after excitation at  $\lambda = 488$  nm with a cut-off dichroic mirror of 488 nm and an emission band-pass filter of 505-530 nm (green emission). Rhodamine fluorescence was detected after excitation at  $\lambda = 543$  nm, with a dichroic



mirror of 543 nm and an emission band-pass filter of 505-530 nm (red emission). A z-section of the films and their supernatant can be obtained after deconvolution and reconstruction of (x, y) stacked images. This allow to localize fluorescent molecules in depth, and to measure distances in the z-direction, e.g. to determine the film thickness.

**Quartz Crystal Microbalance.** The build-up process of multilayer films was monitored in situ by quartz crystal microbalance-dissipation using the Q-Sense 401 flow module (QCM-D, E1, Q-Sense, Västra Frölunda, Sweden). The QCM technique consists in measuring the resonance frequency  $f$  of a quartz crystal induced by molecule adsorption on the crystal, in comparison with the crystal in contact with buffer solution. The crystal used here is a QSX 303 (Q-Sense), it is coated with a 100 nm thick SiO<sub>2</sub> film. The quartz crystal is excited at its fundamental frequency, 5 MHz, and its harmonic frequencies, 15, 25, 35, 45, 55 and 65 MHz. Changes in the resonance frequency,  $\Delta f$  during each adsorption step are measured for each excitation frequency. A shift in  $\Delta f$  can be associated, in first approximation, with a variation of the mass adsorbed on the crystal. To characterize the film at a given step, only the frequency at the end of the rinsing steps following the exposure to either polycation or polyanion were taken into consideration.

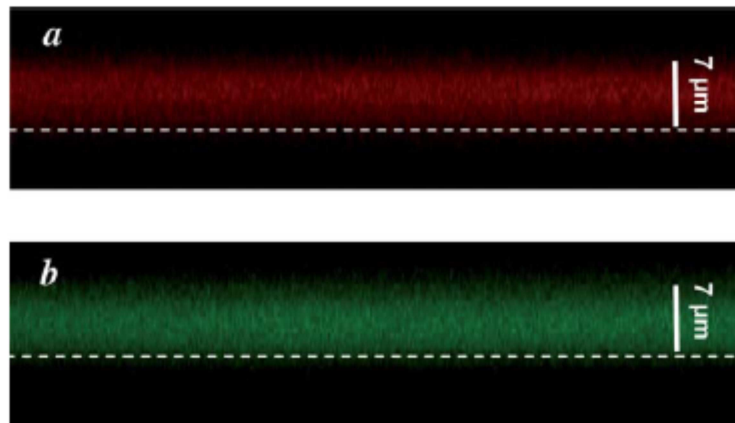
**Fluorimetry.** The presence of fluorescein and FMP in solutions was monitored by fluorescence intensity measurements with a Bio-Rad Versafluor™ fluorometer (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). It is equipped with a UV lamp and wavelength filters: excitation at 490 nm (10 nm band width) and emission at 520 nm (10 nm band width).

**Atomic force microscopy.** Atomic force imaging was performed using a Multimode scanning probe microscope (Veeco, Santa Barbara, CA). The apparatus operated in the contact mode in dry condition. Cantilevers with a spring constant of 0.03 N.m<sup>-1</sup> ending with a silicon tip were used (MSCT model, Veeco, Santa Barbara, CA). Surfaces of PDMS sheets coated with films were imaged after the stretching procedure, if necessary, and after drying by an air flow.



# Annexe 2

Sections virtuelles ( $x,y$ ) réalisées par microscopie confocale de films multicouches  $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}/\text{ALP}^{\text{Rho}}/(\text{PLL}/\text{HA})_2$  (a) et  $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}/\text{ALP}^{\text{FITC}}/(\text{PLL}/\text{HA})_2$  (b) déposés sur des feuilles de PDMS. Deux marqueurs de fluorescence ont été testés pour confirmer que les propriétés de diffusion de l'enzyme sont indépendantes du marquage. L'épaisseur des films est de  $7\ \mu\text{m}$  environ. Les lignes en pointillés indiquent l'interface entre la feuille de PDMS et le film [Mertz, Vogt et al. 2011].





# Annexe 3

Cette annexe décrit la théorie utilisée pour extraire certaines données d'expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP).

Si des molécules diffusent comme des particules Browniennes dans un plan, leur concentration  $c(x, y, t)$ , en un point de l'espace de coordonnées  $(x,y)$  au temps  $t$  ( $t > 0$ ), est régie par la loi de Fick :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} \right) \quad (1)$$

avec  $D$  le coefficient de diffusion. Si  $n$  molécules sont situées en  $(0,0)$  à  $t = 0$ , la solution de cette équation différentielle partielle est [Crank 1956] :

$$c(x, y, t) = \frac{n}{4\pi Dt} e^{-\frac{x^2+y^2}{4Dt}} \quad (2)$$

Maintenant, considérons  $n$  molécules uniformément distribuées, à  $t = 0$ , dans un rectangle de largeur  $l$  et de longueur  $L$  centré en  $(0,0)$ . La concentration en molécules au point de coordonnées  $(x,y)$ , sur le plan contenant le rectangle, pour  $t > 0$ , est donnée par :

$$c(x, y, t) = \frac{c_0}{4\pi Dt} \int_{-l/2}^{l/2} dx' \int_{-L/2}^{L/2} dy' e^{-\frac{(x'-x)^2+(y'-y)^2}{4Dt}} \quad (3)$$

où  $c_0$  est un facteur de normalisation (voir ci-dessous). Les intégrations selon  $x'$  et  $y'$  amènent à :

$$c(x, y, t) = \frac{c_0}{4} \left[ \operatorname{erf} \left( \frac{x + \frac{l}{2}}{2\sqrt{Dt}} \right) - \operatorname{erf} \left( \frac{x - \frac{l}{2}}{2\sqrt{Dt}} \right) \right] \left[ \operatorname{erf} \left( \frac{y + \frac{L}{2}}{2\sqrt{Dt}} \right) - \operatorname{erf} \left( \frac{y - \frac{L}{2}}{2\sqrt{Dt}} \right) \right] \quad (4)$$

où "erf" signifie "fonction erreur" [Abramowitz & Stegun 1972] définie par

$\operatorname{erf}(z) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^z e^{-u^2} du$ . La conservation du nombre total de molécules diffusives impose :

$$\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} c(x, y, t) dx dy = n \quad (5)$$

Ainsi  $c_0 = \frac{n}{LL}$ , c'est-à-dire la concentration initiale à l'intérieur du rectangle source de molécules. Si les  $n$  molécules se répartissent en différents groupes ayant chacun leur propre coefficient de diffusion, l'équation (4) se réécrit :

$$c(x, y, t) = \frac{c_0}{4} \sum_{i=1}^{N_G} p_i \left[ \operatorname{erf} \left( \frac{x + \frac{l}{2}}{2\sqrt{D_i t}} \right) - \operatorname{erf} \left( \frac{x - \frac{l}{2}}{2\sqrt{D_i t}} \right) \right] \left[ \operatorname{erf} \left( \frac{y + \frac{L}{2}}{2\sqrt{D_i t}} \right) - \operatorname{erf} \left( \frac{y - \frac{L}{2}}{2\sqrt{D_i t}} \right) \right] \quad (6)$$

avec  $D_i$  et  $p_i$  respectivement le coefficient de diffusion et la proportion des molécules constituant le  $i^{\text{ème}}$  groupe ( $1 \leq i \leq N_G$ ).

Dans le cas où le rectangle est très long ( $L \rightarrow \infty$ ), l'équation (6) devient :

$$c(x, t) = \frac{c_0}{2} \sum_{i=1}^{N_G} p_i \left[ \operatorname{erf} \left( \frac{x + \frac{l}{2}}{2\sqrt{D_i t}} \right) - \operatorname{erf} \left( \frac{x - \frac{l}{2}}{2\sqrt{D_i t}} \right) \right] \quad (7)$$

La situation lors des expériences de FRAP n'est pas tout à fait celle-là : en fait, les molécules sont au départ uniformément distribuées sur tout le plan. Puis, une zone rectangulaire est photoblanchie, c'est-à-dire qu'au moins une partie des molécules fluorescentes y est détruite. La quantité résiduelle de celles-ci est  $\alpha$ , avec  $0 \leq \alpha \leq 1$ . La concentration normalisée est donnée par :

$$\frac{c(x, t)}{c_0} = 1 - \frac{1 - \alpha}{2} \sum_{i=1}^{N_G} p_i \left[ \operatorname{erf} \left( \frac{x + \frac{l}{2}}{2\sqrt{D_i t}} \right) - \operatorname{erf} \left( \frac{x - \frac{l}{2}}{2\sqrt{D_i t}} \right) \right] \quad (8)$$

où  $c_0$  est désormais la concentration en molécules fluorescentes loin de la zone blanchie, c'est-à-dire que  $c_0$  n'est pas influencé par le processus de recouvrement durant le temps de l'observation. Le même raisonnement était suivi par Picart et al. [Picart, Mutterer et al. 2005].

Au milieu du rectangle ( $x = 0$ ), on obtient :

$$\frac{c(0,t)}{c_0} = 1 - (1 - \alpha) \sum_{i=1}^{N_G} p_i \operatorname{erf} \left( \frac{\frac{l}{2}}{2\sqrt{D_i t}} \right) \quad (9)$$

Dans le cas où  $D_1 = 0$ , et  $D_2, \dots, D_{N_G} \neq 0$ , soit dans le cas d'un mélange de molécules mobiles et de molécules strictement immobiles, on obtient :

$$\frac{c(0,t)}{c_0} = 1 - (1 - \alpha) \left\{ p_1 + \sum_{i=2}^{N_G} p_i \operatorname{erf} \left( \frac{\frac{l}{2}}{2\sqrt{D_i t}} \right) \right\} \quad (10)$$

S'il n'y a qu'une sorte de molécules mobiles,  $p$  est défini comme étant la proportion de molécules mobiles et  $(1 - p)$  la proportion de molécules immobiles. Alors :

$$\frac{c(0,t)}{c_0} = 1 - (1 - \alpha) \left\{ (1 - p) + p \operatorname{erf} \left( \frac{\frac{l}{2}}{2\sqrt{D_i t}} \right) \right\} \quad (11)$$

Lorsque le temps après photoblanchiment est très grand ( $t \rightarrow \infty$ ), c'est-à-dire lorsque le temps écoulé est tel que le recouvrement s'est considérablement ralenti, l'équation (11) peut se simplifier :

$$\frac{c(0,t \rightarrow \infty)}{c_0} = \alpha + p (1 - \alpha) \quad (12)$$





# Références bibliographiques

- A**bramowitz M. & Stegun I. A. (1972). Handbook of mathematical functions with formulas, graphs, and mathematical tables. New York, Dover Publications.
- Alves N. M., Picart C. & Mano J. F. "Self assembling and crosslinking of polyelectrolyte multilayer films of chitosan and alginate studied by QCM and IR Spectroscopy." *Macromolecular Bioscience* **9**: 776-785 (2009).
- Ariga K., Mori T. & Hill J. P. "Control of nano/molecular systems by application of macroscopic mechanical stimuli." *Chemical Science* **2**: 195-203 (2011).
- Arm D. M. & Tencer A. F. "Effects of cyclical mechanical stress on the controlled release of proteins from a biodegradable polymer implant." *Journal of Biomedical Materials Research* **35**: 433-441 (1997).
- Axelrod D., Koppel D. E., Schlessinger J., Elson E. & Webb W. W. "Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics." *Biophysical Journal* **16**: 1055-1069 (1976).
- B**anks D. S. & Fradin C. "Anomalous diffusion of proteins due to molecular crowding." *Biophysical Journal* **89**: 2960-2971 (2005).
- Batchelder D. N. & Bloor D. "Strain dependence of the dominant electronic excitation of a conjugated polymer crystal." *Journal of Physics C: Solid State Physics* **11**: L629 (1978).
- Beissenhirtz M. K., Scheller F. W. & Lisdat F. "A superoxide sensor based on a multilayer cytochrome C electrode." *Analytical Chemistry* **76**: 4665-4671 (2004).
- Berk D. A., Yuan F., Leunig M. & Jain R. K. "Fluorescence photobleaching with spatial Fourier analysis: measurement of diffusion in light-scattering media." *Biophysical Journal* **65**: 2428-2436 (1993).
- Binnig G., Quate C. F. & Gerber C. "Atomic Force Microscope." *Physical Review Letters* **56**: 930 (1986).
- Binnig G., Rohrer H., Gerber C. & Weibel E. "Surface studies by scanning tunneling microscopy." *Physical Review Letters* **49**: 57-61 (1982).
- Boulmedais F., Frisch B., Etienne O., Lavallo P., Picart C., Ogier J., Voegel J. C., Schaaf P. & Egles C. "Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of anti-microbial protection for biomaterials." *Biomaterials* **25**: 2003-2011 (2004).
- Boulmedais F., Tang C. S., Keller B. & Vörös J. "Controlled electrodisolution of polyelectrolyte multilayers: a platform technology towards the surface-initiated delivery of drugs." *Advanced Functional Materials* **16**: 63-70 (2006).
- Brinkley M. "A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens and crosslinking reagents." *Bioconjugate Chemistry* **3**: 2-13 (1992).

- Brown A. E. X., Litvinov R. I., Discher D. E., Purohit P. K. & Weisel J. W. "Multiscale mechanics of fibrin polymer: gel stretching with protein unfolding and loss of water." *Science* **325**: 741-744 (2009).
- Bruns N., Pustelny K., Bergeron L. M., Whitehead T. A. & Clark D. S. "Mechanical nanosensor based on FRET within a thermosome: damage-reporting polymeric materials." *Angewandte Chemie International Edition* **48**: 5666-5669 (2009).
- Brynda E. & Houska M. "Multiple alternating molecular layers of albumin and heparin on solid surfaces." *Journal of Colloid and Interface Science* **183**: 18-25 (1996).
- Brynda E., Houska M., Skvor J. & Ramsden J. J. "Immobilisation of multilayer bioreceptor assemblies on solid substrates." *Biosensors & Bioelectronics* **13**: 165-172 (1998).
- Bucur C. B., Sui Z. & Schlenoff J. B. "Ideal mixing in polyelectrolyte complexes and multilayers: entropy driven assembly." *Journal of the American Chemical Society* **128**: 13690-13691 (2006).
- Burke S. E. & Barrett C. J. "pH-dependent loading and release behavior of small hydrophilic molecules in weak polyelectrolyte multilayer films." *Macromolecules* **37**: 5375-5384 (2004).
- Burnham N. A., Dominguez D. D., Mowery R. L. & Colton R. J. "Probing the surface forces of monolayer films with an atomic-force microscope." *Physical Review Letters* **64**: 1931-1934 (1990).
- Calvo E. J., Danilowicz C. & Wolosiuk A. "Molecular "wiring" enzymes in organized nanostructures." *Journal of the American Chemical Society* **124**: 2452-2453 (2002).
- Caruso F., Lichtenfeld H., Donath E. & Mohwald H. "Investigation of electrostatic interactions in polyelectrolyte multilayer films: Binding of anionic fluorescent probes to layers assembled onto colloids." *Macromolecules* **32**: 2317-2328 (1999).
- Caruso F., Niikura K., Furlong D. N. & Okahata Y. "Assembly of alternating polyelectrolyte and protein multilayer films for immunosensing .2." *Langmuir* **13**: 3427-3433 (1997).
- Chen J. Y., Huang L., Ying L. M., Luo G. B., Zhao X. S. & Cao W. X. "Self-assembly ultrathin films based on diazoresins." *Langmuir* **15**: 7208-7212 (1999).
- Cho S. Y., Kim J. G. & Chung C. M. "A fluorescent crack sensor based on cyclobutane-containing crosslinked polymers of tricinnamates." *Sensors and Actuators B-Chemical* **134**: 822-825 (2008).
- Chou J. J., Gaemers S., Howder B., Louis J. M. & Bax A. "A simple apparatus for generating stretched polyacrylamide gels, yielding uniform alignment of proteins and detergent micelles." *Journal of Biomolecular NMR* **21**: 377-382 (2001).
- Collin D., Lavallo P., Garza J. M., Voegel J.-C., Schaaf P. & Martinoty P. "Mechanical properties of cross-linked hyaluronic acid/poly-(L-lysine) multilayer films." *Macromolecules* **37**: 10195-10198 (2004).
- Constantine C. A., Mello S. V., Dupont A., Cao X. H., Santos D., Oliveira O. N., Strixino F. T., Pereira E. C., Cheng T. C., Defrank J. J. & Leblanc R. M. "Layer-by-layer self-assembled chitosan/poly(thiophene-3-acetic acid) and organophosphorus hydrolase multilayers." *Journal of the American Chemical Society* **125**: 1805-1809 (2003).
- Cortez C., Tomaskovic-Crook E., Johnston A. P. R., Radt B., Cody S. H., Scott A. M., Nice E. C., Heath J. K. & Caruso F. "Targeting and uptake of multilayered particles to colorectal cancer cells." *Advanced Materials* **18**: 1998 (2006).

- Crank J. (1956). The mathematics of diffusion. Oxford, Clarendon Press.
- Crouzier T., Ren K., Nicolas C., Roy C. & Picart C. "Layer-By-Layer films as a biomimetic reservoir for rhBMP-2 delivery: controlled differentiation of myoblasts to osteoblasts." *Small* **5**: 598-608 (2009).
- Crouzier T., Szarpak A., Boudou T., Auzely-Velty R. & Picart C. "Polysaccharide-blend multilayers containing hyaluronan and heparin as a delivery system for rhBMP-2." *Small* **6**: 651-662 (2010).
- D**avis D. A., Hamilton A., Yang J., Cremar L. D., Van Gough D., Potisek S. L., Ong M. T., Braun P. V., Martinez T. J., White S. R., Moore J. S. & Sottos N. R. "Force-induced activation of covalent bonds in mechanoresponsive polymeric materials." *Nature* **459**: 68-72 (2009).
- de Menezes Atayde C. & Doi I. "Highly stable hydrophilic surfaces of PDMS thin layer obtained by UV radiation and oxygen plasma treatments." *Physica Status Solidi (c)* **7**: 189-192 (2010).
- Decher G. "Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites." *Science* **277**: 1232-1237 (1997).
- Decher G. "Polyelectrolyte multilayers, an overview." *Multilayer Thin Films (edited by G. Decher, J. B. Schlenoff)*: 30 (2002).
- Decher G., Hong J. D. & Schmitt J. "Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces." *Thin Solid Films* 831-835 (1992).
- Demczyk B. G., Wang Y. M., Cumings J., Hetman M., Han W., Zettl A. & Ritchie R. O. "Direct mechanical measurement of the tensile strength and elastic modulus of multiwalled carbon nanotubes." *Materials Science and Engineering A* **334**: 173-178 (2002).
- Dementiev A. A., Baikov A. A., Ptushenko V. V., Khomutov G. B. & Tikhonov A. N. "Biological and polymeric self-assembled hybrid systems: Structure and properties of thylakoid/polyelectrolyte complexes." *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1712**: 9-16 (2005).
- Drake B., Prater C. B., Weisenhorn A. L., Gould S. A. C., Albrecht T. R., Quate C. F., Cannell D. S., Hansma H. G. & Hansma P. K. "Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope." *Science* **243**: 1586-1589 (1989).
- Dubas S. T. & Schlenoff J. B. "Swelling and smoothing of polyelectrolyte multilayers by salt." *Langmuir* **17**: 7725-7727 (2001).
- E**ckle M. & Decher G. "Tuning the performance of Layer-by-Layer assembled organic light emitting diodes by controlling the position of isolating clay barrier sheets." *Nano Letters* **1**: 45-49 (2001).
- El Haitami A. E., Martel D., Ball V., Nguyen H. C., Gonthier E., Labbé P., Voegel J.-C., Schaaf P., Senger B. & Boulmedais F. "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 (2009).
- Elbert D. L., Herbert C. B. & Hubbell J. A. "Thin polymer layers formed by polyelectrolyte multilayer techniques on biological surfaces." *Langmuir* **15**: 5355-5362 (1999).

- Elvin C. M., Carr A. G., Huson M. G., Maxwell J. M., Pearson R. D., Vuocolo T., Liyou N. E., Wong D. C. C., Merritt D. J. & Dixon N. E. "Synthesis and properties of crosslinked recombinant pro-resilin." *Nature* **437**: 999-1002 (2005).
- Engler A. J., Sen S., Sweeney H. L. & Discher D. E. "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification." *Cell* **126**: 677-689 (2006).
- Evans R. A. "The principle of minimum information." *IEEE Transactions on reliability* **R-18**: 87-90 (1969).
- F**arhat T. R. & Schlenoff J. B. "Corrosion control using polyelectrolyte multilayers." *Electrochemical and Solid State Letters* **5**: B13-B15 (2002).
- Fernandes P. A. L., Delcea M., Skirtach A. G., Möhwald H. & Fery A. "Quantification of release from microcapsules upon mechanical deformation with AFM." *Soft Matter* **6**: 1879-1883 (2010).
- Florin E., Moy V. & Gaub H. "Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs." *Science* **264**: 415-417 (1994).
- Francius G., Hemmerlé J., Ohayon J., Schaaf P., Voegel J.-C., Picart C. & Senger B. "Effect of crosslinking on the elasticity of polyelectrolyte multilayer films measured by colloidal probe atomic force microscope." *Microscopy Research and Technique* **69**: 84-92 (2006).
- Früh J., Köhler R., Möhwald H. & Krastev R. "Changes of the molecular structure in polyelectrolyte multilayers under stress." *Langmuir* **26**: 15516-15522 (2010).
- Fu J. H., Ji J., Yuan W. Y. & Shen J. C. "Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan." *Biomaterials* **26**: 6684-6692 (2005).
- G**an C.-Y., Cheng L.-H. & Easa A. M. "Physicochemical properties and microstructures of soy protein isolate gels produced using combined cross-linking treatments of microbial transglutaminase and Maillard cross-linking." *Food Research International* **41**: 600-605 (2008).
- Gao C., Leporatti S., Moya S., Donath E. & Möhwald H. "Stability and mechanical properties of polyelectrolyte capsules obtained by stepwise assembly of poly(styrenesulfonate sodium salt) and poly(diallyldimethyl ammonium) chloride onto melamine resin particles." *Langmuir* **17**: 3491-3495 (2001).
- Gao M., Craig D., Lequin O., Campbell I. D., Vogel V. & Schulten K. "Structure and functional significance of mechanically unfolded fibronectin type III1 intermediates." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 14784-14789 (2003).
- Garza J. M., Jessel N., Ladam G., Dupray V., Muller S., Stoltz J.-F., Schaaf P., Voegel J.-C. & Lavalle P. "Polyelectrolyte multilayers and degradable polymer layers as multicompartments films." *Langmuir* **21**: 12372-12377 (2005).
- Garza J. M., Schaaf P., Muller S., Ball V., Stoltz J.-F., Voegel J.-C. & Lavalle P. "Multicompartments films made of alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth." *Langmuir* **20**: 7298-7302 (2004).
- Grabarek Z. & Gergely J. "Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters." *Analytical Biochemistry* **185**: 131-135 (1990).

- Gribbon P. & Hardingham T. E. "Macromolecular diffusion of biological polymers measured by confocal fluorescence recovery after photobleaching." *Biophysical Journal* **75**: 1032-1039 (1998).
- Gumpp H., Puchner E. M., Zimmermann J. L., Gerland U., Gaub H. E. & Blank K. "Triggering enzymatic activity with force." *Nano Letters* **9**: 3290-3295 (2009).
- H**abeeb A. F. S. A. "Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid." *Analytical Biochemistry* **14**: 328-336 (1966).
- Harris J. J., DeRose P. M. & Bruening M. L. "Synthesis of passivating, nylon-like coatings through cross-linking of ultrathin polyelectrolyte films." *Journal of the American Chemical Society* **121**: 1978-1979 (1999).
- He J. A., Samuelson L., Li L., Kumar J. & Tripathy S. K. "Photoelectric properties of oriented bacteriorhodopsin/polycation multilayers by electrostatic layer-by-layer assembly." *Journal of Physical Chemistry B* **102**: 7067-7072 (1998).
- He X. M. & Carter D. C. "Atomic-structure and chemistry of human serum-albumin." *Nature* **358**: 209-215 (1992).
- Hemmerlé J., Roucoules V., Fleith G., Nardin M., Ball V., Lavallo P., Marie P., Voegel J.-C. & Schaaf P. "Mechanically responsive films of variable hydrophobicity made of polyelectrolyte multilayers." *Langmuir* **21**: 10328-10331 (2005).
- Heng M. H. & Glatz C. E. "Charged fusions for selective recovery of  $\beta$ -galactosidase from cell extract using hollow fiber ion-exchange membrane adsorption." *Biotechnology and Bioengineering* **42**: 333-338 (1993).
- Hermanson G. T. (2008). Zero-length crosslinkers - EDC plus sulfo-NHS. *Bioconjugate Techniques (Second Edition)*. New York, Academic Press: 219-223.
- Hiller J., Mendelsohn J. D. & Rubner M. F. "Reversibly erasable nanoporous anti-reflection coatings from polyelectrolyte multilayers." *Nature Materials* **1**: 59-63 (2002).
- I**ler R. "Multilayers of colloidal particles." *Journal of Colloid and Interface Science* **21**: 569 (1966).
- Istratov A. A. & Vyvenko O. F. "Exponential analysis in physical phenomena." *Review of Scientific Instruments* **70**: 1233-1257 (1999).
- Izquierdo A., Ono S. S., Voegel J.-C., Schaaf P. & Decher G. "Dipping versus spraying: exploring the deposition conditions for speeding up layer-by-layer assembly." *Langmuir* **21**: 7558-7567 (2005).
- J**aber J. A. & Schlenoff J. B. "Mechanical properties of reversibly cross-linked ultrathin polyelectrolyte complexes." *Journal of the American Chemical Society* **128**: 2940-2947 (2006).
- Jackson M., Choo L.-P., Watson P. H., Halliday W. C. & Mantsch H. H. "Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues." *Biochimica et Biophysica Acta* **1270**: 1-6 (1995).
- Jaynes E. T. "Information theory and statistical mechanics." *Physical Review* **106**: 620-630 (1957).
- Jessel N., Atalar F., Lavallo P., Mutterer J., Decher G., Schaaf P., Voegel J.-C. & Ogier J. "Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins." *Advanced Materials* **15**: 692-695 (2003).

- Jessel N., Oulad-Abdeighani M., Meyer F., Lavallo P., Haikel Y., Schaaf P. & Voegel J.-C. "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 (2006).
- Jiang C., Markutsya S., Pikus Y. & Tsukruk V. V. "Freely suspended nanocomposite membranes as highly sensitive sensors." *Nature Materials* **3**: 721-728 (2004).
- Jomaa H. W. & Schlenoff J. B. "Salt-induced polyelectrolyte interdiffusion in multilayered films: a neutron reflectivity study." *Macromolecules* **38**: 8473-8480 (2005).
- Jönsson P., Jonsson M. P., Tegenfeldt J. O. & Höök F. "A method improving the accuracy of fluorescence recovery after photobleaching analysis." *Biophysical Journal* **95**: 5334-5348 (2008).
- Jourdainne L., Lecuyer S., Arntz Y., Picart C., Schaaf P., Senger B., Voegel J.-C., Lavallo P. & Charitat T. "Dynamics of poly(L-lysine) in hyaluronic acid/poly(L-lysine) multilayer films studied by fluorescence recovery after pattern photobleaching." *Langmuir* **24**: 7842-7847 (2008).
- Juurs D. H., Jacobson R. H., Wigley D., Zhang X.-J., Huber R. E., Tronrud D. E. & Matthews B. W. "High resolution refinement of beta-galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for  $\alpha$ -complementation." *Protein Science* **9**: 1685-1699 (2000).
- K**ang M., Day C. A., Drake K., Kenworthy A. K. & DiBenedetto E. "A generalization of theory for two-dimensional fluorescence recovery after photobleaching applicable to confocal laser scanning microscopes." *Biophysical Journal* **97**: 1501-1511 (2009).
- Karthikeyan S. & Sijbesma R. P. "Probing strain in thermoplastic elastomers using fluorescence resonance energy transfer." *Macromolecules* **42**: 5175-5178 (2009).
- Katsumi A., Orr A. W., Tzima E. & Schwartz M. A. "Integrins in mechanotransduction." *Journal of Biological Chemistry* **279**: 12001-12004 (2004).
- Kirkpatrick S., Gelatt Jr C. D. & Vecchi M. P. "Optimization by simulated annealing." *Science* **220**: 671-680 (1983).
- Kiselev M. A., Gryzunov Y. A., Dobretsov G. E. & Komarova M. N. "The size of human serum albumin molecules in solution." *Biofizika* **46**: 423-427 (2001).
- Klann M. T., Lapin A. & Reuss M. "Stochastic simulation of signal transduction: Impact of the cellular architecture on diffusion." *Biophysical Journal* **96**: 5122-5129 (2009).
- Kocgozlu L., Lavallo P., Koenig G., Senger B., Haikel Y., Schaaf P., Voegel J.-C., Tenenbaum H. & Vautier D. "Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells." *Journal of Cell Science* **123**: 29-39 (2010).
- Kotov N. A. "Layer-by-layer self-assembly: the contribution of hydrophobic interactions." *Nanostructured Materials* **12**: 789-796 (1999).
- Kulcsar A., Voegel J.-C., Schaaf P. & Kekicheff P. "Glassy state of polystyrene sulfonate/polyallylamine polyelectrolyte multilayers revealed by the surface force apparatus." *Langmuir* **21**: 1166-1170 (2005).

- Ladam G., Gergely C., Senger B., Decher G., Voegel J.-C., Schaaf P. & Cuisinier F. J. G. "Protein interactions with polyelectrolyte multilayers: Interactions between human serum albumin and polystyrene sulfonate/polyallylamine multilayers." *Biomacromolecules* **1**: 674-687 (2000).
- Ladam G., Schaaf P., Cuisinier F. J. G., Decher G. & Voegel J.-C. "Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films." *Langmuir* **17**: 878-882 (2001).
- Lavalle P., Boulmedais F., Ball V., Mutterer J., Schaaf P. & Voegel J.-C. "Free standing membranes made of biocompatible polyelectrolytes using the layer by layer method." *Journal of Membrane Science* **253**: 49-56 (2005).
- Lavalle P., Gergely C., Cuisinier F. J. G., Decher G., Schaaf P., Voegel J.-C. & Picart C. "Comparison of the structure of polyelectrolytes multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: An in situ atomic force microscopy study." *Macromolecules* **35**: 4458-4465 (2002).
- Lavalle P., Picart C., Mutterer J., Gergely C., Reiss H., Voegel J.-C., Senger B. & Schaaf P. "Modeling the buildup of polyelectrolyte multilayer films having exponential growth." *Journal of Physical Chemistry B* **108**: 635-648 (2004).
- Le Du M. H., Stigbrand T., Taussig M. J., Ménez A. & Stura E. A. "Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution." *Journal of Biological Chemistry* **276**: 9158-9165 (2001).
- Lee B. J. & Kunitake T. "2-dimensional polymer networks of maleic-acid copolymers and poly(allylamine) by the Langmuir-Blodgett technique." *Langmuir* **10**: 557-562 (1994).
- Lee J.-S., Cho J., Lee C., Kim I., Park J., Kim Y.-M., Shin H., Lee J. & Caruso F. "Layer-by-layer assembled charge-trap memory devices with adjustable electronic properties." *Nat Nano* **2**: 790-795 (2007).
- Lee J. S., Cho J., Lee C., Kim I., Park J., Kim Y. M., Shin H., Lee J. & Caruso F. "Layer-by-layer assembled charge-trap memory devices with adjustable electronic properties." *Nature Nanotechnology* **2**: 790-795 (2007).
- Lee K. Y., Peters M. C., Anderson K. W. & Mooney D. J. "Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices." *Nature* **408**: 998-1000 (2000).
- Lee K. Y., Peters M. C. & Mooney D. J. "Controlled drug delivery from polymers by mechanical signals." *Advanced Materials* **13**: 837-+ (2001).
- Lee S. S., Hong J. D., Kim C. H., Kim K., Koo J. P. & Lee K. B. "Layer-by-layer deposited multilayer assemblies of ionene-type polyelectrolytes based on the spin-coating method." *Macromolecules* **34**: 5358-5360 (2001).
- Leporatti S., Voigt A., Mitlohner R., Sukhorukov G., Donath E. & Möhwald H. "Scanning force microscopy investigation of polyelectrolyte nano- and microcapsule wall texture." *Langmuir* **16**: 4059-4063 (2000).
- Levitani E. S., Lanni F. & Shakiryanova D. "In vivo imaging of vesicle motion and release at the Drosophila neuromuscular junction." *Nature Protocols* **2**: 1117-1125 (2007).
- Liang J. & Fernández J. M. "Mechanochemistry: one bond at a time." *ACS Nano* **3**: 1628-1645 (2009).

- Liu H. Y. & Hu N. F. "Comparative bioelectrochemical study of core-shell nanocluster films with ordinary layer-by-layer films containing heme proteins and CaCO<sub>3</sub> nanoparticles." *Journal of Physical Chemistry B* **109**: 10464-10473 (2005).
- Liu Y. X., He T. & Gao C. Y. "Surface modification of poly(ethylene terephthalate) via hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells." *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **46**: 117-126 (2005).
- Lo C. M., Wang H. B., Dembo M. & Wang Y. L. "Cell movement is guided by the rigidity of the substrate." *Biophysical Journal* **79**: 144-152 (2000).
- Lorenz C. D. & Ziff R. M. "Precise determination of the critical percolation threshold for the three-dimensional "Swiss cheese" model using a growth algorithm." *Journal of Chemical Physics* **114**: 3659-3661 (2001).
- Lösche M., Schmitt J., Decher G., Bouwman W. G. & Kjaer K. "Detailed structure of molecularly thin polyelectrolyte multilayer films on solid substrates as revealed by neutron reflectometry." *Macromolecules* **31**: 8893-8906 (1998).
- Lu C., Mohwald H. & Fery A. "A lithography-free method for directed colloidal crystal assembly based on wrinkling." *Soft Matter* **3**: 1530-1536 (2007).
- Lvov Y. & Caruso F. "Biocolloids with ordered urease multilayer shells as enzymatic reactors." *Analytical Chemistry* **73**: 4212-4217 (2001).
- Lynn D. M. & Langer R. "Degradable poly(beta-amino esters): synthesis, characterization, and self-assembly with plasmid DNA." *Journal of the American Chemical Society* **122**: 10761-10768 (2000).
- M**amedov A. A., Kotov N. A., Prato M., Guldi D. M., Wicksted J. P. & Hirsch A. "Molecular design of strong single-wall carbon nanotube/polyelectrolyte multilayer composites." *Nature Materials* **1**: 190-194 (2002).
- Martin Y., Williams C. C. & Wickramasinghe H. K. "Tip-techniques for microcharacterization of materials." *Scanning Microscopy* **2**: 3-8 (1988).
- McAloney R. A., Sinyor M., Dudnik V. & Goh M. C. "Atomic force microscopy studies of salt effects on polyelectrolyte multilayer film morphology." *Langmuir* **17**: 6655-6663 (2001).
- Mehrotra S., Lynam D., Maloney R., Pawelec K. M., Tuszyński M. H., Lee I., Chan C. & Sakamoto J. "Time controlled protein release from Layer-by-Layer assembled multilayer functionalized agarose hydrogels." *Advanced Functional Materials* **20**: 247-258 (2010).
- Mertter P. (2000). Acrylamide polymerization - a practical approach. Hercules, CA, Bio-Rad Laboratories.
- Mertz D., Hemmerlé J., Boulmedais F., Voegel J.-C., Lavallo P. & Schaaf P. "Polyelectrolyte multilayer films under mechanical stretch." *Soft Matter* **3**: 1413-1420 (2007).
- Mertz D., Hemmerlé J., Mutterer J., Ollivier S., Voegel J.-C., Schaaf P. & Lavallo P. "Mechanically responding nanovalves based on polyelectrolyte multilayers." *Nano Letters* **7**: 657-662 (2007).
- Mertz D., Vogt C., Hemmerlé J., Debry C., Voegel J.-C., Schaaf P. & Lavallo P. "Tailored design of mechanically sensitive biocatalytic assemblies based on polyelectrolyte multilayers." *Journal of Materials Chemistry* **21**: 8324-8331 (2011).



Mertz D., Vogt C., Hemmerlé J., Mutterer J., Ball V., Voegel J.-C., Schaaf P. & Lavallo P. "Mechanotransductive surfaces for reversible biocatalysis activation." *Nature Materials* **8**: 731-735 (2009).

Metropolis N., Rosenbluth A. W., Rosenbluth M. N., Teller A. H. & Teller E. "Equation of state calculation by fast computing machines." *Journal of Chemical Physics* **21**: 1087-1092 (1953).

Minsky M. "Microscopy apparatus." *Patent US/1961/3013467* (1961).

Müller R., Köhler K., Weinkamer R., Sukhorukov G. & Fery A. "Melting of PDADMAC/PSS capsules investigated with AFM force spectroscopy." *Macromolecules* **38**: 9766-9771 (2005).

**N**allicheri R. A. & Rubner M. F. "Investigations of the mechanochromic behavior of poly(urethane-diacetylene) segmented copolymers." *Macromolecules* **24**: 517-525 (1991).

Narvaez A., Suarez G., Popescu I. C., Katakis I. & Dominguez E. "Reagentless biosensors based on self-deposited redox polyelectrolyte-oxidoreductases architectures." *Biosensors & Bioelectronics* **15**: 43-52 (2000).

Nazaran P., Bosio V., Jaeger W., Anghel D. F. & von Klitzing R. "Lateral mobility of polyelectrolyte chains in multilayers." *Journal of Physical Chemistry B* **111**: 8572-8581 (2007).

Neff P. A., Naji A., Ecker C., Nickel B., von Klitzing R. & Bausch A. R. "Electrical detection of self-assembled polyelectrolyte multilayers by a thin film resistor." *Macromolecules* **39**: 463-466 (2006).

Neff P. A., Wunderlich B. K., von Klitzing R. & Bausch A. R. "Formation and dielectric properties of polyelectrolyte multilayers studied by a silicon-on-insulator based thin film resistor." *Langmuir* **23**: 4048-4052 (2007).

Nguyen P. M., Zacharia N. S., Verploegen E. & Hammond P. T. "Extended release antibacterial layer-by-layer films incorporating linear-dendritic block copolymer micelles." *Chemistry of Materials* **19**: 5524-5530 (2007).

**O**nda M., Lvov Y., Ariga K. & Kunitake T. "Sequential actions of glucose oxidase and peroxidase in molecular films assembled by layer-by-layer alternate adsorption." *Biotechnology and Bioengineering* **51**: 163-167 (1996).

Orlova D. Y., Bártová E., Maltsev V. P., Kozubek S. & Chernyshev A. V. "A nonfitting method using spatial sine window transform for inhomogeneous effective-diffusion measurements by FRAP." *Biophysical Journal* **100**: 507-516 (2011).

Ouyang M., Yuan C., Muisener R. J., Boulares A. & Koberstein J. T. "Conversion of some siloxane polymers to silicon oxide by UV/ozone photochemical processes." *Chemistry of Materials* **12**: 1591-1596 (2000).

**P**ardo-Yissar V., Katz E., Lioubashevski O. & Willner I. "Layered polyelectrolyte films on Au electrodes: characterization of electron-transfer features at the charged polymer interface and application for selective redox reactions." *Langmuir* **17**: 1110-1118 (2001).

Park S. N., Park J. C., Kim H. O., Song M. J. & Suh H. "Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking." *Biomaterials* **23**: 1205-1212 (2002).

- Pavoor P. V., Bellare A., Strom A., Yang D. H. & Cohen R. E. "Mechanical characterization of polyelectrolyte multilayers using quasi-static nanoindentation." *Macromolecules* **37**: 4865-4871 (2004).
- Pelham R. J. & Wang Y. L. "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 13661-13665 (1997).
- Periasamy N. & Verkman A. S. "Analysis of fluorophore diffusion by continuous distributions of diffusion coefficients: application to photobleaching measurements of multicomponent and anomalous diffusion." *Biophysical Journal* **75**: 557-567 (1998).
- Peters R., Peters J., Tews K. H. & Bahr W. "A microfluorimetric study of translational diffusion in erythrocyte membranes." *Biochim Biophys Acta* **367**: 282-294 (1974).
- Picart C., Elkaim R., Richert L., Audoin T., Arntz Y., Cardoso M. D., Schaaf P., Voegel J.-C. & Frisch B. "Primary cell adhesion on RGD-functionalized and covalently crosslinked thin polyelectrolyte multilayer films." *Advanced Functional Materials* **15**: 83-94 (2005).
- Picart C., Lavallo P., Hubert P., Cuisinier F. J. G., Decher G., Schaaf P. & Voegel J.-C. "Buildup mechanism for poly(L-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface." *Langmuir* **17**: 7414-7424 (2001).
- Picart C., Mutterer J., Arntz Y., Voegel J.-C., Schaaf P. & Senger B. "Application of fluorescence recovery after photobleaching to diffusion of a polyelectrolyte in a multilayer film." *Microscopy Research and Technique* **66**: 43-57 (2005).
- Picart C., Mutterer J., Richert L., Luo Y., Prestwich G. D., Schaaf P., Voegel J.-C. & Lavallo P. "Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 12531-12535 (2002).
- Pinto S., Alves P., Matos C. M., Santos A. C., Rodrigues L. R., Teixeira J. A. & Gil M. H. "Poly(dimethyl siloxane) surface modification by low pressure plasma to improve its characteristics towards biomedical applications." *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **81**: 20-26 (2010).
- Podsiadlo P., Kaushik A. K., Arruda E. M., Waas A. M., Shim B. S., Xu J., Nandivada H., Pumphlin B. G., Lahann J., Ramamoorthy A. & Kotov N. A. "Ultrastrong and stiff layered polymer nanocomposites." *Science* **318**: 80-83 (2007).
- Porcel C., Lavallo P., Ball V., Decher G., Senger B., Voegel J.-C. & Schaaf P. "From exponential to linear growth in polyelectrolyte multilayers." *Langmuir* **22**: 4376-4383 (2006).
- Press W. H., Flannery B. P., Teukolsky S. A. & Vetterling W. T. (1989). Combinatorial minimization: method of simulated annealing. Numerical recipes in Pascal - The art of scientific computing. Cambridge, Cambridge University Press.
- Puchner E. M., Alexandrovich A., Kho A. L., Hensen U., Schäfer L. V., Brandmeier B., Gräter F., Grubmüller H., Gaub H. E. & Gautel M. "Mechanoenzymatics of titin kinase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 13385-13390 (2008).
- Qiao B., Cerdà J. J. & Holm C. "Poly(styrenesulfonate)-poly(diallyldimethylammonium) mixtures: toward the understanding of polyelectrolyte complexes and multilayers via atomistic simulations." *Macromolecules* **43**: 7828-7838 (2010).

Qiu X. P., Donath E. & Mohwald H. "Permeability of ibuprofen in various polyelectrolyte multilayers." *Macromolecular Materials and Engineering* **286**: 591-597 (2001).

**R**am M. K., Bertoncello P., Ding H., Paddeu S. & Nicolini C. "Cholesterol biosensors prepared by layer-by-layer technique." *Biosensors & Bioelectronics* **16**: 849-856 (2001).

Ramasamy P., El-Maghrabi M. R., Halada G., Miller L. M. & Rafailovich M. "Examination of interactions of oppositely charged proteins in gels." *Langmuir* **23**: 2021-2029 (2007).

Raymond S. & Weintraub L. "Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis." *Science* **130**: 711 (1959).

Reisch A., Hemmerlé J., Chassepot A., Lefort M., Benkirane-Jessel N., Candolfi E., Mesini P., Letscher-Bru V., Voegel J.-C. & Schaaf P. "Anti-fouling phosphorylcholine bearing polyelectrolyte multilayers: cell adhesion resistance at rest and under stretching." *Soft Matter* **6**: 1503-1512 (2010).

Richert L., Boulmedais F., Lavallo P., Mutterer J., Ferreux E., Decher G., Schaaf P., Voegel J.-C. & Picart C. "Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking." *Biomacromolecules* **5**: 284-294 (2003).

Rief M., Oesterhelt F., Heymann B. & Gaub H. E. "Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by Atomic Force Microscopy." *Science* **275**: 1295-1297 (1997).

Rinckenbach S., Hemmerlé J., Dieval F., Arntz Y., Kretz J. G., Durand B., Chakfe N., Schaaf P., Voegel J. C. & Vautier D. "Characterization of polyelectrolyte multilayer films on polyethylene terephthalate vascular prostheses under mechanical stretching." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **84A**: 576-588 (2008).

Rodahl M., Hook F. & Kasemo B. "QCM operation in liquids: an explanation of measured variations in frequency and Q factor with liquid conductivity." *Analytical Chemistry* **68**: 2219-2227 (1996).

Roeffaers M. B. J., De Cremer G., Uji-i H., Muls B., Sels B. F., Jacobs P. A., De Schryver F. C., De Vos D. E. & Hofkens J. "Single-molecule fluorescence spectroscopy in (bio)catalysis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 12603-12609 (2007).

Rusling J. F. "Sensors for toxicity of chemicals and oxidative stress based on electrochemical catalytic DNA oxidation." *Biosensors & Bioelectronics* **20**: 1022-1028 (2004).

Ruths J., Essler F., Decher G. & Riegler H. "Polyelectrolytes I: polyanion/polycation multilayers at the air/monolayer/water interface as elements for quantitative polymer adsorption studies and preparation of hetero-superlattices on solid surfaces." *Langmuir* **16**: 8871-8878 (2000).

**S**alloum D. S. & Schlenoff J. B. "Protein adsorption modalities on polyelectrolyte multilayers." *Biomacromolecules* **5**: 1089-1096 (2004).

Salomäki M., Tervasmäki P., Areva S. & Kankare J. "The Hofmeister anion effect and the growth of polyelectrolyte multilayers." *Langmuir* **20**: 3679-3683 (2004).

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

Sanabria H., Kubota Y. & Waxham M. N. "Multiple diffusion mechanisms due to nanostructuring in crowded environments." *Biophysical Journal* **92**: 313-322 (2007).

- Sato K., Imoto Y., Sugama J., Seki S., Inoue H., Odagiri T., Hoshi T. & Anzai J. "Sugar-induced disintegration of layer-by-layer assemblies composed of concanavalin a and glycogen." *Langmuir* **21**: 797-799 (2005).
- Sauerbrey G. "Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung." *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* **155**: 206-222 (1959).
- Sawada Y., Tamada M., Dubin-Thaler B. J., Cherniavskaya O., Sakai R., Tanaka S. & Sheetz M. P. "Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas." *Cell* **127**: 1015-1026 (2006).
- Saxton M. J. "Lateral diffusion of lipids and proteins." *Current Topics in Membranes* **48**: 229-282 (1999).
- Schlenoff J. B., Dubas S. T. & Farhat T. "Sprayed polyelectrolyte multilayers." *Langmuir* **16**: 9968-9969 (2000).
- Schmidt D. J., Moskowitz J. S. & Hammond P. T. "Electrically triggered release of a small molecule drug from a polyelectrolyte multilayer coating." *Chemistry of Materials* **22**: 6416-6425 (2010).
- Schneider A., Francius G., Obeid R., Schwinté P., Hemmerlé J., Frisch B., Schaaf P., Voegel J.-C., Senger B. & Picart C. "Polyelectrolyte multilayers with a tunable Young's modulus: influence of film stiffness on cell adhesion." *Langmuir* **22**: 1193-1200 (2006).
- Schoeler B., Poptoshev E. & Caruso F. "Growth of multilayer films of fixed and variable charge density polyelectrolytes: Effect of mutual charge and secondary interactions." *Macromolecules* **36**: 5258-5264 (2003).
- Schuetz P. & Caruso F. "Copper-assisted weak polyelectrolyte multilayer formation on microspheres and subsequent film crosslinking." *Advanced Functional Materials* **13**: 929-937 (2003).
- Schwinté P., Ball V., Szalontai B., Haikel Y., Voegel J.-C. & Schaaf P. "Secondary structure of proteins adsorbed onto or embedded in polyelectrolyte multilayers." *Biomacromolecules* **3**: 1135-1143 (2002).
- Sengupta P., Garai K., Balaji J., Periasamy N. & Maiti S. "Measuring size distribution in highly heterogeneous systems with fluorescence correlation spectroscopy." *Biophysical Journal* **84**: 1977-1984 (2003).
- Serpe M. J., Yarmey K. A., Nolan C. M. & Lyon L. A. "Doxorubicin uptake and release from microgel thin films." *Biomacromolecules* **6**: 408-413 (2005).
- Shcharbin D., Janicka M., Wasiak M., Palecz B., Przybyszewska M., Zaborski M. & Bryszewska M. "Serum albumins have five sites for binding of cationic dendrimers." *Biochimica et Biophysica Acta* **1774**: 946-951 (2007).
- Shiratori S. & Hayashibara H. "Ethylene gas adsorbent." *Patent WO/2002/071851* (2002).
- Shiratori S. S. & Rubner M. F. "pH-dependent thickness behavior of sequentially adsorbed layers of weak polyelectrolytes." *Macromolecules* **33**: 4213-4219 (2000).
- Shukla A., Avadhany S. N., Fang J. C. & Hammond P. T. "Tunable vancomycin releasing surfaces for biomedical applications." *Small* **6**: 2392-2404 (2010).

- Shutava T. G., Kommireddy D. S. & Lvov Y. M. "Layer-by-Layer enzyme/polyelectrolyte films as a functional protective barrier in oxidizing media." *Journal of the American Chemical Society* **128**: 9926-9934 (2006).
- Siffer F., Ponche A., Fioux P., Schultz J. & Roucoules V. "A chemometric investigation of the effect of the process parameters during maleic anhydride pulsed plasma polymerization." *Analytica Chimica Acta* **539**: 289-299 (2005).
- Silva H. S. & Miranda P. B. "Molecular ordering of Layer-by-Layer polyelectrolyte films studied by sum-frequency vibrational spectroscopy." *Journal of Physical Chemistry B* **113**: 10068-10071 (2009).
- Skilling J. & Bryan R. K. "Maximum entropy image reconstruction: general algorithm." *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* **211**: 111-124 (1984).
- Smith M. L., Gourdon D., Little W. C., Kubow K. E., Eguiluz R. A., Luna-Morris S. & Vogel V. "Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells." *PLoS Biol* **5**: e268 (2007).
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. & Klenk D. C. "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Analytical Biochemistry* **150**: 76-85 (1985).
- Smith S., Finzi L. & Bustamante C. "Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads." *Science* **258**: 1122-1126 (1992).
- Sukhorukov G. B., Donath E., Lichtenfeld H., Knippel E., Knippel M., Budde A. & Möhwald H. "Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles." *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects* **137**: 253-266 (1998).
- Sullivan K. D., Sipprell W. H., Brown Jr E. B. & Brown E. B. "Improved model of fluorescence recovery expands the application of multiphoton fluorescence recovery after photobleaching *in vivo*." *Biophysical Journal* **96**: 5082-5084 (2009).
- Swaminathan R. & Periasamy N. "Analysis of fluorescence decay by the maximum entropy method: Influence of noise and analysis parameters on the width of the distribution of lifetimes." *Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Chemical Sciences)* **108**: 39-49 (1996).
- Szyk L., Schaaf P., Gergely C., Voegel J.-C. & Tinland B. "Lateral mobility of proteins adsorbed on or embedded in polyelectrolyte multilayers." *Langmuir* **17**: 6248-6253 (2001).
- Szyk L., Schwinté P., Voegel J.-C., Schaaf P. & Tinland B. "Dynamical behavior of human serum albumin adsorbed on or embedded in polyelectrolyte multilayers." *Journal of Physical Chemistry B* **106**: 6049-6055 (2002).
- T**anaka T. "Gels." *Scientific American* **244**: 124 (1981).
- Tang Z. Y., Kotov N. A., Magonov S. & Ozturk B. "Nanostructured artificial nacre." *Nature Materials* **2**: 413-418 (2003).
- Tang Z. Y., Wang Y., Podsiadlo P. & Kotov N. A. "Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering." *Advanced Materials* **18**: 3203-3224 (2006).
- Tengvall P., Jansson E., Askendal A., Thomsen P. & Gretzer C. "Preparation of multilayer plasma protein films on silicon by EDC/NHS coupling chemistry." *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **28**: 261-272 (2003).

- Thierry B., Kujawa P., Tkaczyk C., Winnik F. M., Bilodeau L. & Tabrizian M. "Delivery platform for hydrophobic drugs: prodrug approach combined with self-assembled multilayers." *Journal of the American Chemical Society* **127**: 1626-1627 (2005).
- Timkovich R. "Detection of the stable addition of carbodiimide to proteins." *Analytical Biochemistry* **79**: 135-143 (1977).
- Tomihata K. & Ikada Y. "Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide." *Journal of Biomedical Materials Research* **37**: 243-251 (1997).
- Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 4350-4354 (1979).
- V**akonakis I., Staunton D., Rooney L. M. & Campbell I. D. "Interdomain association in fibronectin: insight into cryptic sites and fibrillogenesis." *The EMBO Journal* **26**: 2575-2583 (2007).
- Vautier D., Hemmerlé J., Vodouhê C., Koenig G., Richert L., Picart C., Voegel J.-C., Debry C., Chluba J. & Ogier J. "3-D surface charges modulate protrusive and contractile contacts of chondrosarcoma cells." *Cell Motility and the Cytoskeleton* **56**: 147-158 (2003).
- Vodouhê C., Le Guen E., Méndez Garza J., Francius G., Déjugnat C., Ogier J., Schaaf P., Voegel J.-C. & Lavalley P. "Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films." *Biomaterials* **27**: 4149-4156 (2006).
- Vogel V. "Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **35**: 459-488 (2006).
- Vogel V. & Sheetz M. "Local force and geometry sensing regulate cell functions." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**: 265-275 (2006).
- Voigt U., Jaeger W., Findenegg G. H. & von Klitzing R. "Charge effects on the formation of multilayers containing strong polyelectrolytes." *Journal of Physical Chemistry B* **107**: 5273-5280 (2003).
- Voigt U., Khrenov V., Thuer K., Hahn M., Jaeger W. & von Klitzing R. "The effect of polymer charge density and charge distribution on the formation of multilayers." *Journal of Physics-Condensed Matter* **15**: S213-S218 (2003).
- Voinova M. V., Rodahl M., Jonson M. & Kasemo B. "Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: continuum mechanics approach." *Physica Scripta* **59**: 391-396 (1999).
- von Klitzing R. "Internal structure of polyelectrolyte multilayer assemblies." *Physical Chemistry Chemical Physics* **8**: 5012-5033 (2006).
- Vuillaume P. Y., Jonas A. M. & Laschewsky A. "Ordered polyelectrolyte "multilayers". 5. Photocross-linking of hybrid films containing an unsaturated and hydrophobized poly(diallylammonium) salt and exfoliated clay." *Macromolecules* **35**: 5004-5012 (2002).
- W**ang X. & Ji J. "Postdiffusion of oligo-peptide within exponential growth multilayer films for localized peptide delivery." *Langmuir* **25**: 11664-11671 (2009).

- Weiss M. "Challenges and artifacts in quantitative photobleaching experiments." *Traffic* **5**: 662-671 (2004).
- Wiita A. P., Perez-Jimenez R., Walther K. A., Grater F., Berne B. J., Holmgren A., Sanchez-Ruiz J. M. & Fernandez J. M. "Probing the chemistry of thioredoxin catalysis with force." *Nature* **450**: 124-127 (2007).
- Wood K. C., Chuang H. F., Batten R. D., Lynn D. M. & Hammond P. T. "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 (2006).
- Xiao D., Zhang H. & Wirth M. "Chemical modification of the surface of poly(dimethylsiloxane) by atom-transfer radical polymerization of acrylamide." *Langmuir* **18**: 9971-9976 (2002).
- Xu X. P. & Goodman D. W. "Metal-deposition onto oxides - an unusual low initial sticking probability for copper on SiO<sub>2</sub>." *Applied Physics Letters* **61**: 1799-1801 (1992).
- Xu Z. A., Gao N., Chen H. J. & Dong S. J. "Biopolymer and carbon nanotubes interface prepared by self-assembly for studying the electrochemistry of microperoxidase-11." *Langmuir* **21**: 10808-10813 (2005).
- Yoo D., Shiratori S. S. & Rubner M. F. "Controlling bilayer composition and surface wettability of sequentially adsorbed multilayers of weak polyelectrolytes." *Macromolecules* **31**: 4309-4318 (1998).
- Zhang J. T., Chua L. S. & Lynn D. M. "Multilayered thin films that sustain the release of functional DNA under physiological conditions." *Langmuir* **20**: 8015-8021 (2004).
- Zhou X. C., Huang L. Q. & Li S. F. Y. "Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystal microbalance: comparison of oligonucleotide immobilization methods and the application in genetic diagnosis." *Biosensors & Bioelectronics* **16**: 85-95 (2001).
- Zhu X., Mills K. L., Peters P. R., Bahng J. H., Liu E. H., Shim J., Naruse K., Csete M. E., Thouless M. D. & Takayama S. "Fabrication of reconfigurable protein matrices by cracking." *Nature Materials* **4**: 403-406 (2005).
- Zu X. L., Lu Z. Q., Zhang Z., Schenkman J. B. & Rusling J. F. "Electroenzyme-catalyzed oxidation of styrene and cis-beta-methylstyrene using thin films of cytochrome P450cam and myoglobin." *Langmuir* **15**: 7372-7377 (1999).





# Publications

## Articles publiés ou en préparation

Mertz D., Vogt C., Hemmerlé J., Mutterer J., Ball V., Voegel J.-C., Schaaf P. & Lavallo P. "Mechanotransductive surfaces for reversible biocatalysis activation." *Nature Materials* **8**(9): 731-735 (2009).

Mertz D., Vogt C., Hemmerlé J., Debry C., Voegel J.-C., Schaaf P. & Lavallo P. "Tailored design of mechanically sensitive biocatalytic assemblies based on polyelectrolyte multilayers." *Journal of Materials Chemistry* **21**(23): 8324-8331 (2011).

Vogt C., Mertz D., Voegel J.-C., Schaaf P. & Lavallo P. "Stretch-induced Reactive Release from a layer-by-layer enzymatic platform", en préparation.

Vogt C., Ball V., Mutterer J., Widmaier J., Schaaf P., Voegel J.-C., Senger B. & Lavallo P. "Mobility of proteins in highly hydrated polyelectrolyte multilayer films", en préparation.

# Communications

## Communications orales

“Mechanotransductive surfaces for reversible biocatalysis activation”, Materials Research Society (MRS) Spring Meeting, du 5 au 9 avril 2010, San Francisco, CA, Etats-Unis.

“Mechanotransductive surfaces for reversible biocatalysis activation”, EMRS (European MRS) Spring Meeting, du 7 au 11 juin 2010, Strasbourg, France.

“Mobility of proteins in highly hydrated polyelectrolyte multilayer films”, 8th International Symposium on Polyelectrolytes, du 11 au 14 novembre 2010, Shanghai, Chine.

“Smart polymer coatings as platforms for biocatalysis and drug release”, Pr. P.T. Hammond research group at MIT, le 23 mai 2011, Cambridge, MA, Etats-Unis.

## Communications par affiche

“Mechanotransductive surfaces for reversible biocatalysis activation”, 3<sup>ème</sup> journée scientifique du Pôle Matériaux et Nanosciences d'Alsace (PMNA), le 8 octobre 2009, Mulhouse, France.

“Mechanotransductive surfaces for reversible biocatalysis activation”, International Layer-by-Layer Symposium 2011, du 10 au 12 mars 2011, Strasbourg, France.