



HAL
open science

Films polymères minces à base de méthacrylate de glycidyle pour l'élaboration d'interfaces immunoréceptrices : étude par résonance de plasmon de surface

Dior Diop Bernand-Mantel

► **To cite this version:**

Dior Diop Bernand-Mantel. Films polymères minces à base de méthacrylate de glycidyle pour l'élaboration d'interfaces immunoréceptrices : étude par résonance de plasmon de surface. Matériaux. Université Paris-Est, 2010. Français. NNT : . tel-00610387v1

HAL Id: tel-00610387

<https://theses.hal.science/tel-00610387v1>

Submitted on 22 Jul 2011 (v1), last revised 4 Apr 2011 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris EST
Ecole Doctorale Sciences, Ingénierie, et Environnement

THESE DE DOCTORAT

Présentée par :

Dior Diop Bernand-Mantel

Pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS EST

Spécialité : Chimie et Sciences des Matériaux

Sujet de la thèse :

**Films polymères minces à base de méthacrylate de glycidyle pour l'élaboration
d'interfaces immunoréceptrices : étude par résonance de plasmon de surface**

Soutenue publiquement le 17 décembre 2010

Composition du jury :

M. Moilleron : Professeur, HDR

Président

L. Janus : Maître de Conférences, HDR

Rapporteur

Mohamed M. Chéhim : Directeur de Recherche, HDR

Rapporteur

E. Maillart : R&D Project Manager, Dr

Examineur

M.C. Millot : Professeur

Directeur de hèse

B. Carbonnier : Maître de Conférences

Co-directeur de thèse

**Thèse préparée au sein de
l'équipe Systèmes Polymères Complexes, ICMPE, CNRS, Thiais**

Résumé : Dans ce travail, nous avons cherché à mettre en évidence l'influence de la méthode de préparation de films minces de polymère pour la biofonctionnalisation de surfaces planes. Dans un premier temps, un polymère réactif, le poly(méthacrylate de glycidyle) p(GMA) a été choisi et sa capacité de fixation vis-à-vis d'une biomolécule modèle l'albumine de sérum bovin a été étudiée. Deux stratégies principales de préparation du film polymère ont été utilisées : la technique du « grafting onto » et celle du grafting from » avec deux voies de synthèse : la polymérisation radicalaire classique (PRC) avec l'amorceur en solution et la polymérisation initiée à partir de la surface avec un amorceur photochimique. Il a été montré que la méthode du « grafting from » permettait l'obtention de films d'épaisseur plus élevées que la technique du « grafting onto » avec une meilleure capacité de fixation de biomolécules de BSA. Ces films de p(GMA) se sont révélés relativement hydrophobes, ce qui nous incités à analyser l'influence de la balance hydrophobe/hydrophile des interfaces sur leurs propriétés, dans un second temps. Par la préparation de films copolymères poly (GMA-co-acrylamide) et poly(GMA-co-méthacrylate de glycérol) et la modification des films de poly(GMA) par de l'éthanolamine, l'influence de l'hydrophilie du film sur la capacité de fixation en molécules de BSA et l'activité de reconnaissance moléculaire de celles-ci ont été évaluées. Il a été démontré que par un choix judicieux de la méthode d'hydrophilisation du film polymère, il est possible de réduire considérablement l'adsorption non-spécifique de biomolécules d'où l'obtention de films polymères bioinertes. De plus, les résultats préliminaires ont montré qu'il est possible d'améliorer sensiblement la capacité de reconnaissance moléculaire entre la BSA et son anticorps l'anti-BSA.

Mots-clés : film mince de polymère, or, SPR, méthacrylate de glycidyle, polymère hydrophile, bioinertie, reconnaissance moléculaire, BSA, anti-BSA.

Protein-functionnalized ultrathin poly(glycidyl methacrylate) grafts on gold surface for the development of optical biosensors based on SPR detection.

Abstract: It is now well accepted that polymeric spacers permit to attach proteins to surfaces efficiently as they carry several binding sites. Moreover, direct attachment of proteins to surfaces might result in the decrease of bioactivity which is critical in the case of the development of biosensors. In this context, we modified gold substrates by polymer grafts via the so-called (i) *grafting onto* and (ii) *grafting from* strategies. In (i) preformed polymer chains were attached to the surface, whilst in (ii) surface-confined photopolymerization was performed on either acrylic monomer- or initiator-functionalized gold substrates. The polymer grafts were further biofunctionalized by covalent immobilization of an active protein (bovine serum albumin, BSA). Given the protein-polymer and polymer-gold covalent bonds, the gold/polymer/BSA hybrids permitted to design robust optical biosensors. The modified gold substrates were characterized in terms of chemical composition (X-ray photoelectron spectroscopy), hydrophobicity (contact angle measurements), and polymer coating thickness (surface plasmon resonance, SPR). SPR was also used to monitor in real time the interaction between the grafted antigen to the specific antibody (aBSA). Using unique reactive monomer, glycidyl methacrylate (GMA) in the present case, the implementation of these three methods is assumed to provide polymer films of similar chemical composition but varied interfacial chains conformation. In this respect, influence of polymer chains mobility on the performance of the immunosensing reaction was evaluated. In a further step, hydrophobic/hydrophilic balance of the polymer films was modulated through copolymerization of GMA with acrylamide, and with glycerol methacrylate. It was demonstrated that control over the surface chemical composition of the polymer grafts allows preparing bioinert films, *i.e.* resistant to non specific adsorption, with enhanced biospecific activity.

Keywords: thin polymer films, gold, SPR, glycidyl methacrylate, hydrophilic, immunosensing reaction, bioinert films, BSA, aBSA.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe Systèmes Polymères Complexes de l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est (UMR 7182).

Je tiens tout d'abord à remercier, le Docteur Jacques Penelle, le Professeur Catherine Amiel, ainsi que le Professeur Valérie Langlois qui se sont succédés à la direction du laboratoire Systèmes Polymères Complexes de m'avoir accueillie et permis de réaliser ma thèse au sein de leur laboratoire.

Je remercie chaleureusement ma directrice de thèse, le Professeur Marie-Claude Millot et mon co-directeur de thèse le Docteur Benjamin Carbonnier. Je leur suis reconnaissante de m'avoir encadrée, guidée et soutenue et des opportunités qui m'ont été offertes tout au long de cette thèse. Je les remercie pour toutes les discussions scientifiques et conseils qui m'ont permis d'acquérir une rigueur scientifique. Je sors « grandie » de cette expérience à vos côtés.

Je voudrais également remercier Mohamed Chehimi pour m'avoir initiée à la spectroscopie photoélectronique X. Il a toujours montré beaucoup d'intérêt pour notre travail. Je le remercie de m'avoir donnée la possibilité de faire une conférence à Antalya ainsi que pour sa gentillesse.

J'adresse également mes remerciements les plus sincères aux membres du jury pour avoir accepté d'examiner et juger ce travail : le Professeur Régis Moilleron de l'Université Paris-Est, Créteil, le Docteur Ludovic Janus, maître de conférences à l'Université Lille 1, le Docteur Emmanuel Maillart de la société Génoptics, et le Docteur Mohamed Chehimi, directeur de recherche à l'Université Denis Diderot Paris VII.

Merci à Géraldine Melizzi de la société Génoptics qui m'a guidée dans mes premiers pas avec l'appareillage et l'utilisation de la SPR et par sa réactivité à mes nombreuses questions. Je voudrais aussi remercier Philippe Lang directeur de recherche à l'Université

Denis Diderot de m'avoir initiée à la technique d'analyse du PMIRRAS, pour ses précieux conseils et pour son extrême gentillesse.

Je remercie le Docteur Sébastien Péralta, maître de conférences à l'Université de Cergy-Pontoise. Je te remercie infiniment pour les images AFM et pour m'avoir consacré un peu de temps.

Un grand merci aux membres du laboratoire SPC qui ont été plus que des collègues durant ces années passées au laboratoire. Vous m'avez soutenue, portée et fait office de « famille » de cœur. J'ai beaucoup appris de chacun de vous.

Un merci particulier à Solo pour sa patience et sa gentillesse lors de mes débuts avec l'ATRP. Je remercie vivement Nicole Thuaud pour ses analyses SEC, Véronique Wintgens pour toutes ses astuces et discussions annexes et pour la confiance et l'amitié qu'elle m'a accordée, j'ai été heureuse de partager votre bureau. Un grand merci à Nelly Lacoudre, tu auras été un peu une petite mère pour moi.

Un merci particulier à Domitille, Amani, Christine, Armelle, pour nos dîners de filles qui auront été des moments uniques de partage et d'amitié.

A mes compagnons de route d'un mois, une année et plus, Virginie, les « Julien », Sandrine, David, Xavier, Farah, Gwenaëlle, Nicolas, Nassima, Rim, Tarek, Maciek, Justyna, Estelle... Spéciale dédicace à Thanh-Xuan pour avoir été là depuis bientôt 10 ans. J'ai eu énormément de plaisir à te côtoyer et je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite.

Je voudrais remercier ma famille, mes parents pour leurs encouragements, ma sœur, mon frère, malgré la distance qui nous sépare, vous avez toujours été à mes côtés en pensées. Merci d'avoir supporté mon stress et mes coups de fils malgré les 4000 km qui nous séparent. Merci à mes autres familles de cœur la famille Diop du Mesnil-Raoult, et la famille Djighaly, pour votre présence dans tous les événements qui auront marqué mon existence depuis que j'ai quitté mes parents.

Enfin, tout cela n'aurait pu être possible sans mon mari Casimir, merci pour ton implication dans cette thèse, tes encouragements journaliers et ton soutien indispensable. Merci à ma petite Camille.

Liste des abréviations 9

Introduction générale.....10

Chapitre 1 : Etude bibliographique 12

1.1 Les monocouches auto-assemblées (SAM)13

1.2 Formation d'un film polymère sur une surface17

1.2.1 Cas de l'immobilisation de polymères préformés17

 1.2.1.1 Adsorption17

 1.2.1.2 Grafting onto18

1.3 Polymérisation « in situ »20

 1.3.1 Polymérisation par voie radicalaire classique22

 1.3.2 Polymérisation in situ par radicalaire contrôlée27

1.4 Biofonctionnalisation d'un film polymère35

1.4.1 Immobilisation covalente d'une biomolécule sur le film polymère37

1.4.2 Effet de la mouillabilité du film polymère sur l'immobilisation d'une protéine. 39

1.4.3 Conformation d'espèces biologiques greffées sur une interface polymère41

 1.4.3.1 Les acides aminés41

 1.4.3.2 Les protéines42

1.5 Conclusion44

Chapitre 2 : Rappel des techniques de caractérisation de surface utilisées dans ce travail 45

2.1 Présentation de la résonance des plasmons de surface (RPS).....46

 2.1.1 Propriétés des plasmons de surface47

 2.1.2 Excitation des plasmons de surface à l'aide d'un couplage par prisme.....49

 2.1.3 Mesure de l'épaisseur d'une couche mince par RPS51

 2.1.4 Imagerie par résonance des plasmons de surface par imagerie (SPRi) et méthodologie..... 54

 2.1.5 Modélisation des courbes plasmons de surface56

2.2 La spectrométrie photoélectronique X (XPS)58

2.3 Le PM-IRRAS59

Chapitre 3 : Elaboration d'interfaces immunoréceptrices à base de films minces de poly (méthacrylate de glycidyle) greffés sur des substrats d'or et fonctionnalisés par l'albumine de sérum bovin61

3.A Immobilisation de films minces de P(GMA) sur des surfaces d'or par différentes techniques de greffage..... 63

3.A.1 Immobilisation de films minces de P(GMA) sur des surfaces d'or par la méthode du « grafting onto » : greffage de polymères préformés.64

3.A.1.1 Chimisorption de la cystéamine	64
3.A.1.2 Variation de l'épaisseur du film de P(GMA) en fonction de la masse molaire moyenne en nombre du P(GMA) préformé.....	67
3.A.1.3 Mise en évidence de la fonctionnalisation des films de P(GMA) préparés par <i>grafting onto</i> par le greffage de l'octylamine.	70
3.A.2 Immobilisation de films minces de poly(GMA) sur des surfaces d'or par la méthode du « <i>grafting from</i> » : polymérisation in-situ	74
3.A.2.1 Synthèse <i>in situ</i> de films minces de P(GMA) à partir d'une monocouche vinylique.....	74
3.A.2.2 Synthèse <i>in situ</i> de films minces de P(GMA) par <i>grafting from</i> à partir d'une surface d'or fonctionnalisée par un amorceur de type AIBN	77
3.A.3 Discussion	86
3.B Biofonctionnalisation de films minces de P(GMA) greffés sur des surfaces d'or par l'albumine de sérum bovin et évaluation des propriétés immunoréceptrices.	98
3.B.1 Greffage de la BSA sur des films minces de P(GMA).....	99
3.B.1.1 Cas des films minces de P(GMA) préparés par <i>grafting onto</i>	99
3.B.1.2 Cas des films minces de P(GMA) synthétisés <i>in situ</i> par <i>grafting from</i>	100
3.B.2 Evaluations des propriétés immunoréceptrices des interfaces à base de films minces de P(GMA) greffés par l'albumine de sérum bovin.....	102
3.B.2.1 Cas des interfaces immunoréceptrices à base de films minces de P(GMA) préparés par <i>grafting onto</i>	103
3.B.2.2 Cas des interfaces immunoréceptrices à base de films minces de P(GMA) préparés par <i>grafting from</i> à partir d'une couche vinylique.....	105
3.B.2.3 Cas des interfaces immunoréceptrices à base de films minces de P(GMA) préparés par <i>grafting from</i> à partir d'une couche d'amorceur de type AIBN.....	106
3.B.3 Discussion.....	107
Conclusions.....	110

Chapitre 4 : Effet de l'hydrophilie des films polymères sur l'efficacité de la reconnaissance moléculaire **112**

4.1 Adsorption d'anti-albumine de sérum bovin sur des films minces à base de méthacrylate de glycidyle d'hydrophilie variable.....	115
4.1.1 Fonctionnalisation post-polymérisation d'un film mince de P(GMA) par l'éthanolamine.....	115
4.1.2 Immobilisation de films copolymères minces à base de méthacrylate de glycidyle par la méthode du <i>grafting from</i> à partir d'une couche vinylique.....	118
4.2 Etude des films copolymères à base de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide.	125
4.2.1 Détermination du taux d'incorporation d'acrylamide dans les films minces copolymères.....	125
4.2.2 Biofonctionnalisation des films minces à base de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide greffés par l'albumine de sérum bovin.....	129
4.2.3 Evaluation des propriétés immunoréceptrices de films minces à base de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide biofonctionnalisés par l'albumine de sérum bovin.....	134
4.3 Etude des films copolymères minces préparés par <i>grafting from</i> à partir d'une couche d'amorceur <i>via</i> le cogreffage successif de poly(méthacrylate de glycidyle) et de poly(acrylamide) par polymérisation radicalaire amorcée à partir de la surface.....	136
4.4 Biofonctionnalisation de films minces de copolymères de méthacrylate de glycidyle et de méthacrylate de glycérol par l'albumine de sérum bovin et évaluation des propriétés immunoréceptrices.....	138
4.4.1 Stratégie biofonctionnalisation par greffage de l'albumine de sérum bovin par réaction avec les fonctions époxyde du méthacrylate de glycidyle.....	138

4.4.2 Stratégie biofonctionnalisation par greffage de l'albumine de sérum bovin par réaction avec les fonctions hydroxyle du méthacrylate de glycérol après activation.....	140
Conclusions	144
Partie expérimentale	151
Conclusion générale et perspectives	159

Liste des abréviations

AFM	microscopie à force atomique
AIBN	2,2'-azobis(isobutyronitrile)
anti-BSA	anti albumine de sérum bovin
ATR-FTIR	Infrarouge à transformée de Fourier
ATRP	polymérisation radicalaire par transfert d'atome
BSA	albumine de sérum bovin
CDI	1,1'-carbonyldiimidazole
DP _n	degré de polymérisation moyen
GMA	méthacrylate de glycidyle
GMAOH	méthacrylate de glycérol
HEMA	méthacrylate d'hydroxy-éthyle
Ip	indice de polymolécularité
LCST	température de transition critique (lower critical solution temperature)
M _n	Masse moyenne en nombre
M _w	Masse moyenne en poids
NHS	N-hydroxysuccinimide
NIPAM	N-isopropyl acrylamide
P(GMA)	poly(méthacrylate de glycidyle)
pI	point isoélectrique
PMMA	poly(méthacrylate de méthyle)
PRC	polymérisation radicalaire classique
PS	poly(styrène)
RIU	Unité d'Indice de Réfraction
RMN	
H1/C13	résonance magnétique nucléaire du proton/ et du carbone 13
RPS	résonance de plasmon de surface
SAM	Self Assembled Monolayer (monocouche auto-assemblée)
UV	ultra-violet
XPS	spectrométrie photoélectronique X
Σ	densité de chaînes par unité de surface

INTRODUCTION GENERALE

Les avancées scientifiques de ces dernières décennies dans le domaine des sciences de la vie et de la santé permettent d'envisager dans un futur proche une évolution fondamentale des outils liés au diagnostic médical et à la thérapeutique. En particulier, on observe depuis quelques années un développement de microsystèmes analytiques permettant de répondre aux besoins de la génomique et de la protéomique (puces à ADN, puces à protéines, laboratoires sur puces, etc.). La conception de ces dispositifs miniaturisés nécessite selon le cas de fonctionnaliser des surfaces planes, des capillaires ou des microcanaux par des ligands variés (molécules d'intérêt biologique, molécules organiques). Quel que soit le type d'application envisagé, les méthodes utilisées pour le traitement de surface doivent répondre à un certain nombre d'exigences. Elles doivent en particulier être simples à mettre en œuvre et conduire à des surfaces stables, reproductibles et biocompatibles. En effet, il est important dans le domaine des biopuces à protéine, de pouvoir immobiliser de grandes quantités de protéines sur des petites surfaces. La majorité des systèmes microfluidiques à base de polymères sont constitués par des polymères tels que du polycarbonate, du poly (méthacrylate de méthyle) ou encore du poly (siloxane de diméthyle). Malgré les nombreuses méthodes de modification de surface et de substrats proposées ces dernières années, le système parfait n'a pas encore été défini. Les principales caractéristiques d'une puce idéale sont : une reconnaissance efficace entre les molécules sondes et leurs cibles, avec un fort rapport signal sur bruit, une bonne résolution, une reproductibilité du signal, avec une grande sensibilité et spécificité. C'est dans ce contexte que nous avons cherché à mettre en évidence l'influence de la méthode de préparation de films minces réactifs à base de polymère pour la biofonctionnalisation de surfaces métalliques planes. Notre outil de travail principal a été la résonance des plasmons de surface (RPS).

La première partie de ce manuscrit, basée sur une étude bibliographique, s'organise en trois volets. Les deux premiers volets sont consacrés d'une part à la modification de surfaces par des monocouches auto-assemblées, d'autre part aux méthodes de fonctionnalisation des surfaces par des films polymères, leurs avantages et inconvénients. Dans le dernier volet, nous traitons des différentes voies d'immobilisation des protéines sur

des films polymères, et présentons rapidement les protéines et leurs changements de conformation.

Le second chapitre sera consacré à la présentation des différentes techniques de caractérisation de surfaces utilisées dans ce travail.

Le troisième chapitre sera dédié à l'étude de la modification de la surface par du méthacrylate de glycidyle (GMA) par deux approches différentes : le « grafting onto » et le « grafting from ». Dans l'élaboration des films par la technique du « grafting from », plusieurs types de synthèse seront développés : la polymérisation radicalaire classique initiée à partir d'une monocouche vinylique, celle amorcée à partir d'un amorceur de type azobis (isobutyronitrile) (AIBN). Nous étudierons ensuite l'impact du type de fonctionnalisation ainsi que de la technique de synthèse choisis sur la quantité de molécules d'albumine de sérum bovin (BSA) fixées sur le film de P(GMA). L'activité de la BSA sera testée en effectuant des tests de reconnaissance moléculaire avec des anticorps anti-BSA poly clonaux.

Le quatrième chapitre sera consacré à la fonctionnalisation des surfaces d'or par des films copolymères. Dans une première partie, nous présenterons la synthèse de films poly (méthacrylate de glycidyle-co-acrylamide), et dans une seconde partie la synthèse de films poly (méthacrylate de glycidyle-co-méthacrylate de glycérol). Le but de cette étude est de mettre en avant l'influence de l'équilibre hydrophobe/hydrophile du film polymère sur la diminution des interactions non spécifiques, mais aussi sur l'activité des molécules de BSA suivant l'environnement dans lequel elles sont fixées.

CHAPITRE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Sommaire

1.1 Les monocouches auto-assemblées (SAM)	13
1.2 Formation d'un film polymère sur une surface	17
1.2.1 Cas de l'immobilisation de polymères préformés	17
1.2.1.1 Adsorption	17
1.2.1.2 Grafting onto	18
1.3 Polymérisation « in situ »	20
1.3.1 Polymérisation par voie radicalaire classique	22
1.3.2 Polymérisation in situ par radicalaire contrôlée	27
1.4 Biofonctionnalisation d'un film polymère	35
1.4.1 Immobilisation covalente d'une biomolécule sur le film polymère	37
1.4.2 Effet de la mouillabilité du film polymère sur l'immobilisation d'une protéine.	39
1.4.3 Conformation d'espèces biologiques greffées sur une interface polymère	41
1.4.3.1 Les acides aminés	41
1.4.3.2 Les protéines	42
1.5 Conclusion	44

L'objectif du travail de thèse a été de mettre en évidence l'influence de la technique de synthèse des films polymères sur des surfaces d'or et de leur nature hydrophobe ou hydrophile sur la quantité de biomolécules fixées. Par ailleurs, nous avons étudié l'activité de ces biomolécules une fois fixées sur la surface, notamment leurs propriétés de reconnaissance envers leurs anticorps.

La première partie de ce chapitre est consacrée à rappeler une méthode simple de la modification d'une surface par l'intermédiaire d'une monocouche auto-assemblée (SAM). Dans une deuxième partie, nous présenterons les différentes approches de fonctionnalisation de la surface par un film polymère, soit par « grafting onto » ou par « grafting from ». Nous verrons ensuite les stratégies de synthèse par « grafting from » qui se distingueront par la voie de polymérisation. Une dernière partie visera à présenter en détail les voies d'immobilisation des biomolécules sur les films polymères, mais aussi les structures et conformation des protéines.

1.1 Les monocouches auto-assemblées (SAM)

Les monocouches auto-assemblées, plus connues sous le nom de SAMs (« self assembled monolayers ») sont des couches organisées de molécules amphiphiles dont l'une des extrémités a une affinité particulière pour le substrat. Afin d'atteindre un bon état d'organisation moléculaire, les réactifs utilisés pour former les SAMs sont généralement

constitués de longues chaînes alkyle qui s'assemblent entre elles par interactions hydrophobes. Un segment hydrocarboné avec $n \geq 10^1$ est nécessaire pour atteindre une bonne organisation moléculaire de la monocouche à la surface. Ils comportent une extrémité réactive capable de se greffer ou de s'adsorber sur le substrat et un groupement fonctionnel situé à l'autre extrémité, conférant à la surface les propriétés recherchées (Figure 1.1) : mouillabilité^{2,3}, hydrophobie, réactivité chimique^{4,5}, etc.

Les surfaces de SAMs ont ainsi ouvert un nouveau pan dans la science des matériaux en apportant de nouveaux revêtements de surface, uniformément homogènes.

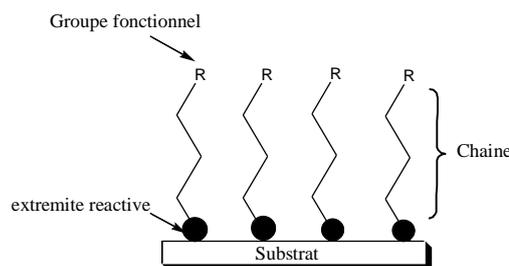


Figure 1.1 : Représentation de la structure d'une SAM

L'or est le substrat le plus utilisé de par son caractère inerte et sa résistance à l'oxydation⁶, pour l'obtention de monocouches auto-assemblées, cependant elles peuvent être formées sur d'autres surfaces métalliques tels que l'argent⁷⁻⁹, le cuivre⁷, le palladium^{10,11}, ou encore le platine¹². De plus, les surfaces d'or se caractérisent aisément par des techniques optiques telles que l'ellipsométrie ou encore par spectroscopie infrarouge. Les SAMs sur l'or ont des propriétés électrochimiques et optiques utiles à l'élaboration des biocapteurs¹³. Une grande partie des SAMs formées sur les surfaces d'or le sont avec des thiols car l'or forme aisément des liaisons avec les atomes de soufre, les thiols ont une grande affinité avec l'or¹⁴. Les alcanes thiols sont facilement adsorbés à partir d'une solution ou en phase vapeur afin de réaliser la monocouche auto-assemblée (SAM). La formation de SAM par immersion de la surface d'or dans une solution d'alcane thiol est la méthode la plus utilisée car très facile à mettre en œuvre. Le thiol est généralement mis en solution dans de l'éthanol ou un mélange eau-éthanol à des concentrations comprises entre 1 et 10 mM pendant 12 heures à 48 heures¹⁵⁻¹⁷, pour atteindre une bonne organisation moléculaire. Les temps longs d'assemblage tendent à donner des structures cristallines compactes. Il est aussi important de minimiser l'exposition du substrat à l'oxygène, durant le processus d'assemblage, afin de limiter l'oxydation des thiols en sulfides ou en autres espèces

oxygénées, mais aussi d'améliorer la reproductibilité des propriétés du matériau modifié par la SAM^{7, 10}, en dégazant la solution de thiol et en la maintenant sous atmosphère inerte.

Les SAMs sont réputées pour être stables au contact de l'air, de l'éthanol durant de longues durées, mais elles désorbent à des températures supérieures à 70°C ou quand elles sont irradiées par une source de lumière en présence d'oxygène.

Par ailleurs, il est aussi possible d'obtenir des SAMs sur des surfaces planes de silice. En effet, le support de silicium est un des matériaux les plus communément utilisés pour la polymérisation initiée à partir de la surface, de par son faible prix et ses caractéristiques physiques, notamment une surface lisse et réfléchive. La surface de silice est constituée d'une couche mince d'oxyde de silicium et de liaisons Si-OH. Elle se distingue du verre, par sa possibilité d'être caractérisée par infrarouge et par ellipsométrie, cependant elle n'est pas transparente. Un traitement aux chlorosilanes ou alcoxy-silanes forment par la suite, des réseaux de polysiloxane qui sont liés par des liaisons covalentes Si-O-Si aux groupements natifs Si-O_x de la surface. Les chlorosilanes sont plus réactifs en particulier avec l'eau et forment généralement des monocouches auto-assemblées moins ordonnées qu'avec les alcoxy-silanes. De plus, la synthèse de dérivés d'alkoxy-silane est plus aisée et permet d'accéder à des transformations variées et à des techniques de purification dont la chromatographie sur silice modifiée¹⁸. Les SAMs à base de siloxane, sont stables aussi bien thermiquement que chimiquement sauf aux pH extrêmes¹⁹. Elles sont difficiles à hydrolyser avec un acide ou une base à cause des liaisons Si-O-Si, en revanche elles peuvent être retirées de la surface en particulier par un traitement à l'acide fluorhydrique.

Le contrôle des propriétés physiques et chimiques des SAMs est conditionné par la nature des groupements fonctionnels fixés à l'extrémité libre de l'alcane thiol. Ainsi, la mouillabilité du substrat peut-être augmentée par l'introduction de fonctions OH et COOH^{2, 3}.

Les groupements fonctionnels peuvent être également utilisés pour effectuer des modifications chimiques aux interfaces. Quelques exemples sont présentés dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 : Exemples de réactions chimiques réalisées sur des SAMs.

Groupements fonctionnels	Réactions générales
Alcènes	<p>Addition</p> $\text{S} \left[\text{C} \begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \text{H}_2 \end{array} \right]_n \text{CH}=\text{CH}_2 \xrightarrow{\text{R-SH}} \begin{array}{l} \text{S} \left[\text{C} \begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \text{H}_2 \end{array} \right]_n \text{C}-\text{C}-\text{S}-\text{R} \\ \text{S} \left[\text{C} \begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \text{H}_2 \end{array} \right]_n \text{C}(\text{H})-\text{CH}_3 \\ \text{S}-\text{R} \end{array}$
Halogénure d'alkyle	<p>Substitution nucléophile</p> $\text{S} \left[\text{C} \begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \text{H}_2 \end{array} \right]_n \text{C}-\text{Br} \xrightarrow[\text{R}_2-\text{NH}_2]{\text{R-OH, R}_1-\text{SH}} \begin{array}{l} \text{S}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{R} \\ \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \\ \text{S}-\text{C}-\text{C}-\text{S}-\text{R}_1 \\ \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \\ \text{S}-\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{R}_2 \\ \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \quad \text{H} \end{array}$
Thiols	$\text{S} \left[\text{C} \begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \text{H}_2 \end{array} \right]_n \text{C}-\text{SH} \xrightarrow{\text{R-SH}} \text{S} \left[\text{C} \begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \text{H}_2 \end{array} \right]_n \text{C}-\text{S}-\text{S}-\text{R}$ <p>Formation des disulfures</p>

La formation de SAMs réactives à la surface d'un substrat est également une étape clé lorsqu'il s'agit de le biofonctionnaliser. En effet les SAMs peuvent être conçues et modifiées pour lier de l'ADN, des protéines, ou encore des cellules^{4, 15}.

D'une manière générale, les réactions chimiques effectuées une fois la monocouche construite sont possibles tant qu'elles ne détruisent pas celle-ci et qu'il n'y a pas de gêne stérique au niveau de ses groupements fonctionnels. La gêne stérique peut-être réduite en utilisant une monocouche mixte : les groupes chimiques seront portés par une chaîne thiolée plus longue ce qui la placera au-dessus de la couche sous-jacente. Les monocouches mixtes peuvent être avantageuses puisqu'elles permettent d'espacer les groupes réactifs et ainsi facilitent les nouvelles réactions et l'immobilisation de molécules.

1.2 Formation d'un film polymère sur une surface

Dans cette partie, nous parlerons des différentes méthodes de préparation de films polymère sur une surface et leurs caractéristiques. On distingue en général deux types de méthodes de préparation des films polymère :

- les films préparés à partir de polymères préformés
- la synthèse in situ du film polymère à partir d'une couche d'amorceur greffée sur la surface.

1.2.1 Cas de l'immobilisation de polymères préformés

1.2.1.1 Adsorption

Dans ce cas, la nature des interactions entre le polymère et la surface est principalement physique (électrostatique, Van der Waals, etc.) (Figure 1.2)



Figure 1.2 : Chaînes de polymères physisorbées à la surface

Les méthodes disponibles pour la modification de surface par un film polymère sont variées. L'homogénéité du film et le contrôle de ses caractéristiques dépendent de la technique de préparation. Parmi l'ensemble des méthodes existantes, le spin-coating est le plus communément utilisé. Le polymère est dissous dans un solvant adapté, le mélange est ensuite déposé sur la surface qui est alors soumise à une série de rotations au cours desquelles le solvant s'évapore pour laisser place au film de polymère sur toute la surface.

Pour un polymère donné, l'épaisseur du film obtenu dans un tel système dépend des paramètres suivants :

- c la concentration de la solution de polymère,
- ω la vitesse de rotation,

- la nature du solvant²⁰.

En ajustant judicieusement ces paramètres, il est possible de faire varier l'épaisseur du film du nanomètre à quelques microns.

Les études menées sur l'évolution de l'épaisseur des films obtenus par spin-coating ont montré que celle-ci augmente linéairement avec la concentration²¹ et diminue avec la vitesse de rotation. L'épaisseur des films de PS et de PMMA formés à partir de solutions de toluène selon cette méthode vérifie la relation²²: $h \propto \omega^{-1/2} c$.

L'utilisation de solvants reste toutefois un facteur limitant, car tous les polymères ne sont pas solubles dans les solvants usuels et une évaporation non contrôlée (évaporation non homogène ou présence résiduelle de solvant) peut entraîner des hétérogénéités et altérer les propriétés ultérieures du film.

L'avantage de l'immobilisation des polymères par adsorption est sa facilité de mise en œuvre, cependant ses principaux inconvénients résident dans les éventuels problèmes de stabilité de la couche polymère quand on change le milieu au contact de la surface.

1.2.1.2 Grafting onto

Le « **grafting onto** » est une méthode d'immobilisation qui consiste à faire réagir des chaînes de polymères fonctionnalisées avec des sites appropriés en surface. Une étape de fonctionnalisation préalable de la surface est souvent requise pour assurer l'ancrage du polymère sur la surface.

Dans ce cas-ci, l'interaction entre chaque chaîne et le support se fait par création d'une ou plusieurs liaisons covalentes²³ (Figure 1.3). Ces liens chimiques entre les polymères et la surface assurent la stabilité et l'adhésion du film.

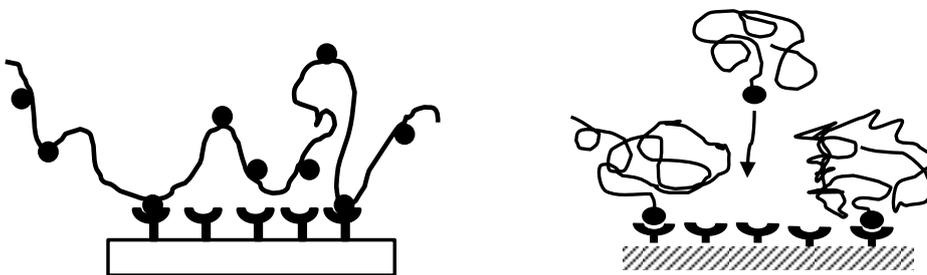


Figure 1.3 : Chaîne greffée à la surface

Etant donné que le « grafting onto » met en jeu une réaction chimique, la technique utilisée consiste à immerger la surface dans une solution de polymères. Une autre technique consiste à la mise en circulation de la solution du polymère au contact de la surface à l'aide d'une pompe.

Les paramètres qui influent sur l'élaboration de ce type de film sont les masses molaires (M_n et M_w) des polymères et éventuellement leur concentration. Ils permettent de contrôler l'épaisseur h du film, la densité de greffage Σ (nombre de chaînes par unité de surface) ou la distance D entre deux points de greffage.

Le paramètre D est important dans le cas de chaînes monofonctionnelles, car selon le rapport entre D et R_g (rayon de giration d'une chaîne non perturbée), on distingue plusieurs cas :

- si $D > 2 R_g$, les chaînes sont isolées et ont tendance à s'étaler à la surface
- si $R_g < D < 2 R_g$, les chaînes commencent à s'interpénétrer.
- si $D < R_g$, il y a de fortes contraintes stériques et les chaînes adoptent une conformation plus étirée, on parle alors de brosses (brush).

La longueur des chaînes joue un rôle important car la diffusion des polymères est ralentie par les enchevêtrements. Selon Luzinov *et al.*²⁴, l'épaisseur des films obtenus en fin de réaction augmente avec la masse molaire M_n des polymères puis chute lorsque M_n est supérieure à la masse critique d'enchevêtrement M_c . Cette différence de comportement est liée à la conformation des chaînes dans le film. La densité maximale du film, obtenue pour des chaînes dont la M_n est proche de M_c , correspond au taux d'étirement des chaînes le plus important.

La technique du « grafting onto » offre une grande diversité de combinaisons polymère-support ; les fonctions chimiques portées par les chaînes et par la surface doivent néanmoins être susceptibles de réagir entre elles. De plus, la quantité de polymère qui peut être immobilisée dépend fortement des conditions de réaction, de manière plus spécifique, de la concentration du polymère en solution²⁵. Une caractérisation des polymères avant greffage permet d'établir des relations entre les propriétés du film (h , σ , masse du polymère par unité de surface, etc.) et celles des polymères (M_n , I_p , fonctionnalité, etc.). Il est donc possible de modifier certaines caractéristiques du film en ajustant celles des chaînes.

Cependant la méthode du « grafting onto » est non adaptée quand on cherche à obtenir des films épais. En effet, la diffusion des espèces constitue une limite majeure de la technique. Cet inconvénient est d'autant plus marqué que les chaînes sont longues. Au cours du greffage, les sites libres en surface deviennent de moins en moins accessibles et les

chaînes doivent lutter contre un gradient de concentration de plus en plus défavorable (Figure 1.4). Par conséquent, des taux de greffages élevés sont rarement atteints.

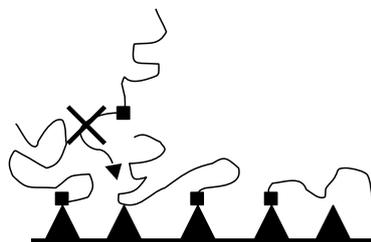


Figure 1.4 : Illustration de la restriction à la diffusion et de l'étalement des chaînes à la surface

L'augmentation du taux de greffage n'est pas régulière au cours du processus²⁶. La cinétique de greffage se décompose en trois étapes.

- la vitesse de greffage est d'abord limitée par le transport des chaînes vers la surface,
- puis l'accélération de la seconde phase est attribuée à l'équivalence des concentrations en polymère au voisinage de la surface et en volume.
- Enfin, la vitesse devient quasiment nulle. Même si seulement un site en surface sur dix a réagi, plus aucune chaîne ne se greffe.

1.3 Polymérisation « in situ »

La technique du « grafting from » a suscité beaucoup d'intérêt dans la préparation de films polymères sur des surfaces. Les amorceurs sont d'abord immobilisés sur la surface, ensuite la polymérisation est amorcée à partir de la surface ce qui génère un film de polymère ancré à la surface. Dans cette configuration, la diffusion des monomères vers la surface selon le gradient de concentration assure la croissance des chaînes. La restriction à la diffusion devient un facteur moins limitant vis-à-vis de la densité de greffage, car il n'y a plus de chaînes en croissance dans la solution (Figure 1.5). Deux voies de préparation seront présentées ci-dessous :

- la polymérisation radicalaire classique
- et la polymérisation radicalaire contrôlée

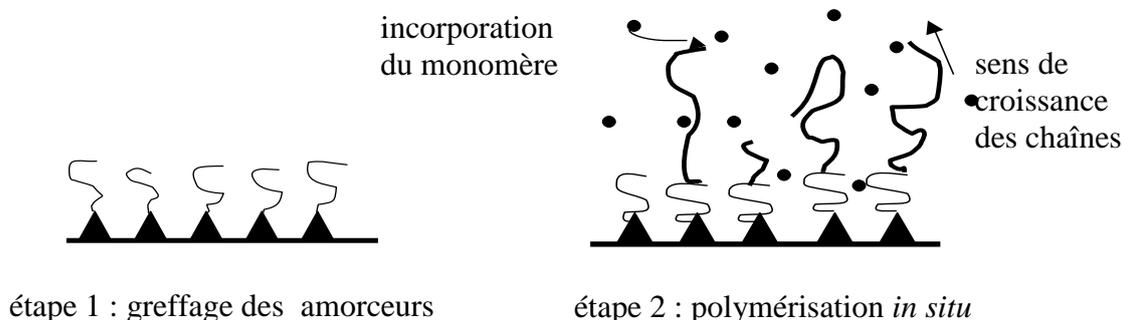


Figure 1.5 : Etapes de la méthode « grafting from »

Dans le cas de surfaces minérales, la première étape consiste à la fixation des amorceurs en surface. Elle peut se faire soit par le greffage de l'amorceur sur une monocouche auto-assemblée (SAM), par la fixation d'une molécule bifonctionnelle à la surface conduisant éventuellement à une SAM, ou encore par l'utilisation d'un macroamorceur. Une fois que la SAM choisie est fixée, il est possible de réaliser une photopolymérisation, une polymérisation radicalaire classique thermique, ou encore une polymérisation radicalaire contrôlée.

Dans le cas de l'utilisation d'un macroamorceur²⁷⁻³², la fonctionnalisation de la surface par un polymère présentant des groupements fonctionnels susceptibles de réagir avec des groupements amorceurs remplace la modification directe de la surface par une couche d'amorceurs. En effet, une fois le polymère déposé à la surface, la couche d'ancrage réagit dans un premier temps avec la surface avec la formation de liaisons covalentes. Ensuite, les unités réactives disponibles au niveau des « boucles » et « queues » du polymère permettront la fixation ultérieure de la couche d'amorceur. En fonction de la technique de polymérisation, l'amorceur peut être un radical libre, ionique, d'ouverture par méthathèse, ou encore de type polymérisation radicalaire contrôlée. En variant la nature du substrat (or, silicium, nanoparticules, etc.), la technique de dépôt de l'amorceur et la voie de synthèse du polymère, offrent un nombre illimité de possibilités pour la formation de polymère en brosse.

Il est aussi possible de modifier des matériaux polymères par un film polymère par « photogreffage³³ ». Cette technique consiste à mettre en contact le matériau polymère et la solution d'amorceur et le monomère choisi et à les soumettre à un rayonnement UV.

L'amorceur utilisé dans ce cas, est souvent de type benzophénone et la longueur d'onde d'irradiation est en dessous de 300nm.

Les interactions spécifiques fortes créées (par formation de liaisons covalentes) entre certains groupes du copolymère et la surface garantissent la fixation des amorceurs. Durant la seconde étape, s'effectue la polymérisation. Les chaînes se forment, et croissent à partir des amorceurs greffés lors de la première étape. La polymérisation se fait en surface et en volume. Le polymère formé en solution provient des amorceurs supplémentaires ajoutés dans le volume pour stabiliser la polymérisation ou de radicaux apparus lors de la dissociation des amorceurs en surface.

Les comparaisons effectuées sur la taille des chaînes formées en volume et en surface mènent à des conclusions divergentes selon les auteurs. Pour certains^{34, 35} les deux populations ont des masses molaires du même ordre de grandeur voire identiques. D'autres³⁶ observent une augmentation de la masse molaire des polymères greffés avec le taux de conversion, celle des polymères libres restant constante au cours de la polymérisation.

1.3.1 Polymérisation par voie radicalaire classique

1.3.1.1 Principe

La polymérisation radicalaire classique est le procédé de polymérisation le plus couramment employé industriellement pour la synthèse de polymères et de copolymères de hautes masses molaires³⁷. Il se distingue des autres procédés de polymérisation par sa facilité de mise en œuvre. Les conditions de réaction sont en effet peu contraignantes et les polymérisations ont lieu en masse, en solution, en émulsion ou en suspension à des températures de réactions modérées³⁸ (40 à 150°C). Seule la présence d'oxygène est proscrite, car il agit comme un inhibiteur de radicaux. Par ailleurs, la polymérisation radicalaire s'applique à un grand nombre de monomères vinyliques. Le principal inconvénient de la polymérisation radicalaire est l'obtention de polymères présentant une grande hétérogénéité tant au niveau des masses molaires que des compositions.

Néanmoins, la polymérisation radicalaire classique à partir de la surface se distingue des autres techniques de polymérisation telles que la polymérisation radicalaire vivante³⁹⁻⁴², la polymérisation par ouverture de cycle⁴³, de la polymérisation anionique⁴⁴ ou cationique⁴⁵⁻⁴⁷, parce qu'elle permet l'utilisation d'une grande variété de monomères incluant ceux qui sont polaires et ceux qui possèdent des groupements fonctionnels non protégés. Les

systèmes qui peuvent amorcer la polymérisation radicalaire classique sont divers ; les plus répandus sont le 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN), le peroxyde de benzoyle, et les dérivés de la benzoïne. Parmi ces trois composés, l'AIBN⁴⁸⁻⁵² a été utilisé majoritairement dans les stratégies de « grafting from » pour la synthèse de films polymère. Le dérivé de l'AIBN peut être activé thermiquement au-dessus de 60°C ou photochimiquement par irradiation entre 300 et 360 nm. Cependant, dans les deux cas l'étape d'amorçage est relativement lente, l'AIBN a une demi-vie de 10 heures à 65°C⁵³ et son efficacité photochimique est inférieure à 0,5 dans le cas du styrène⁵⁴. Ainsi, deux types de radicaux (Figure 1.6) sont formés tout au long de la réaction, les uns fixés à la surface, les autres libres en solution, le clivage homolytique de la liaison azo donne un sous produit et deux radicaux.

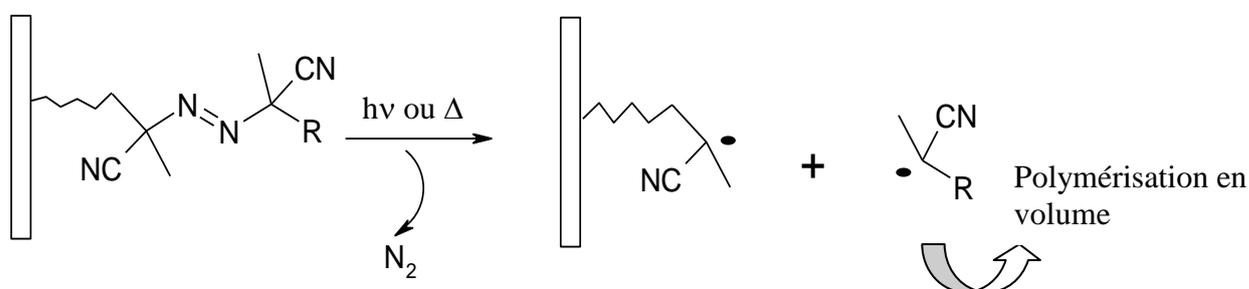


Figure 1.6 : Mécanisme de la polymérisation radicalaire classique à partir d'un amorceur de type 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN).

Ces deux radicaux formés peuvent amorcer une polymérisation. Seul un des radicaux amorceurs est lié à la surface, de ce fait, il se forme du polymère en solution. Ce polymère libre s'enchevêtre dans le polymère attaché à la surface. Il en résulte une étape nécessaire de lavage au soxhlet ou aux ultra-sons, après la polymérisation, pour retirer le polymère physisorbé. Cette étape de lavage de la surface représente un des principaux inconvénients de la polymérisation radicalaire classique initiée à partir de la surface.

1.3.1.2 Les types d'amorceurs utilisés selon la nature du substrat

La polymérisation radicalaire classique amorcée à partir de la surface a été réalisée sur différents supports. L'immobilisation des amorceurs radicaux sur la surface nécessite souvent plusieurs étapes. Par exemple, Boven *et al*⁵⁵. ont traité des billes de verre par du 3-

aminopropyltriéthoxysilane (γ -APS) pour obtenir des groupements amine sur la surface. Les amorceurs azo ont été ensuite immobilisés à travers la formation de liaisons amides entre la surface modifiée par le γ -APS et un amorceur de type azo fonctionnalisé par un chlorure d'acide. Ils ont pu ainsi synthétiser des chaînes de poly (méthacrylate de méthyle). Minko et al.⁵⁶⁻⁶² ont étudié la polymérisation radicalaire amorcée à partir d'un substrat solide ; en exemple on peut citer la polymérisation du styrène sur des wafers de silicium. Les groupements azo ont été introduits sur le silicium par la méthode décrite par Tsubokawa et al.⁶³ Pour cela, les substrats de silicium ont subi un traitement par du 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane suivi d'une réaction avec de l'acide 4,4'-azobis (4-cyanovalérique). La quantité de chaînes greffées sur la surface a été étudiée par des mesures d'ellipsométrie réalisées in situ⁵⁸. Bachmann et al.⁶⁴ ont étudié la polymérisation du styrène amorcée par des groupements peroxydes immobilisés sur différents supports de silice. Pour ce faire, deux voies ont été choisies : dans la première voie, les groupes silanols ont été chlorés par du chlorure de thionyle ou du tétrachlorosilane ; dans la seconde voie, par l'intermédiaire du chlorure de 1, 3, 5-tricarbonyl de benzène, des groupements de chlorure d'acide sont immobilisés à la surface. La formation des groupements peroxydes sur la surface est obtenue par la réaction entre les groupements chlorosylilés ou chlorure d'acide et du tert-butyl hydroperoxyde. La polymérisation du styrène est ensuite effectuée en masse à 80°C. Il a été montré que la plus grande quantité de chaînes de poly (styrène) greffées est obtenue à partir de la modification du gel de silice par du chlorure de 1, 3, 5-tricarbonyl de benzène.

Huang⁶⁵ et son équipe ont pu réaliser la polymérisation radicalaire par voie thermique du styrène à 60°C sur une surface d'or, par l'intermédiaire d'une simple réticulation pour augmenter la stabilité de la monocouche. Ils se sont servis du mercaptopropyltriméthoxysilane (Figure 1.7) pour former une couche d'adhésion réticulée sur laquelle est fixée par la suite la couche d'amorceur. Grâce à cette modification préalable de la surface d'or, en variant les temps de polymérisation du styrène, à 60°C, ils ont pu obtenir des épaisseurs variant de 10 à 80 nm, alors qu'elles étaient inférieures à 5 nanomètres lorsque la polymérisation était réalisée à partir d'une monocouche auto-assemblée.

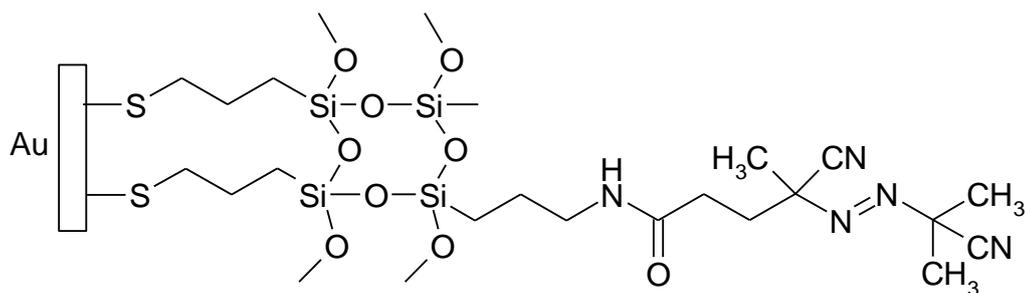


Figure 1.7 : Modification d'une surface d'or par un dérivé de l'AIBN.

Outre la voie thermique, il est possible aussi d'utiliser la voie photochimique lors de la polymérisation radicalaire classique initiée à partir de la surface. La préparation de la couche d'amorceur est la même que celle décrite précédemment. Tout comme pour la voie thermique, la plupart des amorceurs utilisés sont des amorceurs de type AIBN, la polymérisation sera activée sous une longueur d'onde variant entre 300 et 360 nm. Dyer *et al.*⁶⁶ ont réalisé la photopolymérisation du styrène à partir d'une surface d'or préalablement modifiée. Pour cela, ils ont synthétisé un amorceur de type AIBN à partir de la modification chimique de l'acide 4,4'-azobis 4-cyanovalérique qui est disponible dans le commerce. Les étapes nécessaires à son obtention sont illustrées dans le schéma ci-dessous (Figure 1.8).

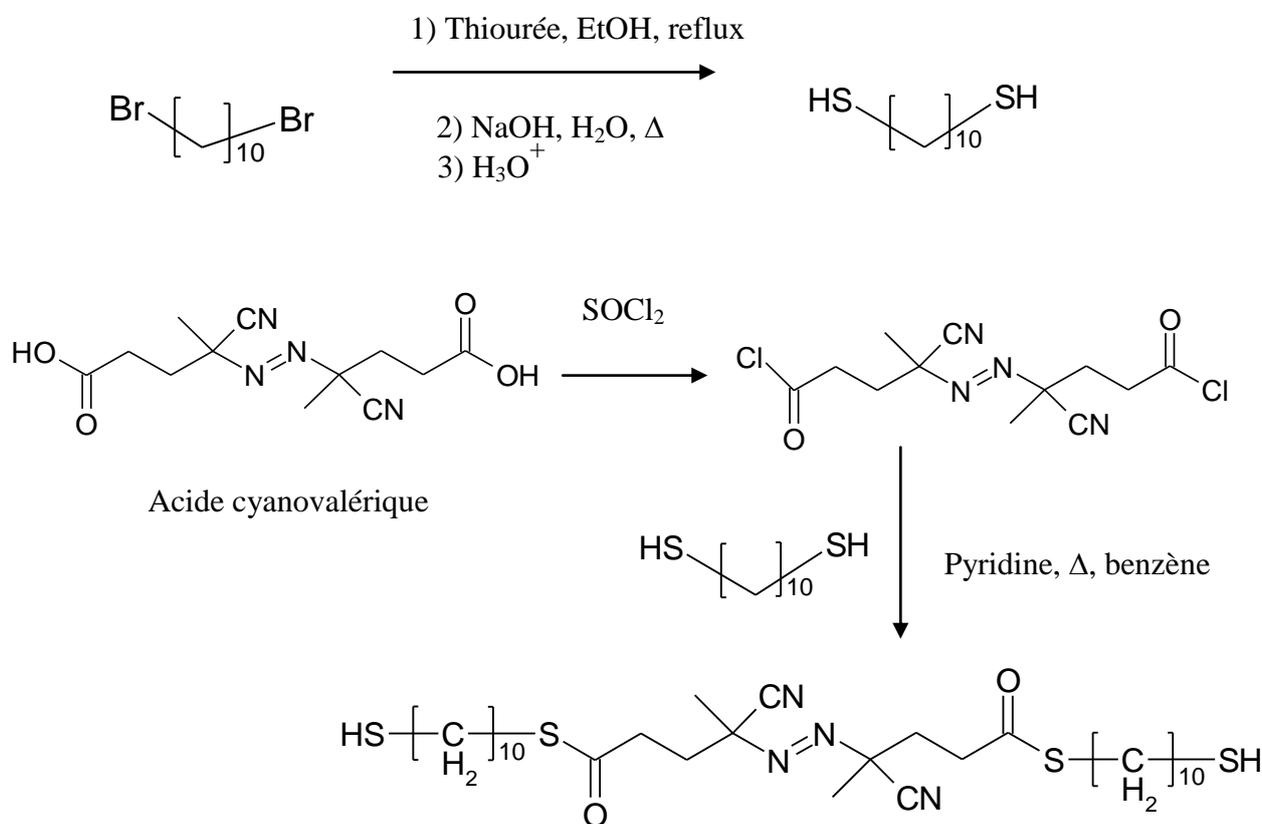


Figure 1.8 : Synthèse d'un amorceur de type AIBN à partir de l'acide cyanovalérique.

L'amorceur obtenu (Figure 1.8) est utilisé pour former la monocouche auto-assemblée. Cette monocouche a été caractérisée par XPS afin de déterminer le motif de la chaîne thiolée à la surface de l'or, qui peut-être étendue ou repliée. D'après les résultats de la XPS, ils ont pu démontrer que la structure de la monocouche était moyennement désordonnée et que la conformation de la chaîne thiolée était plutôt étendue, avec un groupe de soufre terminal à l'interface de l'air. Cependant il subsiste des motifs de forme repliée. Un film de poly (styrène) de 30 nm d'épaisseur est obtenu, une fois la polymérisation amorcée à partir de cette monocouche, avec une irradiation à 300 nm durant 6 heures, suivie d'un rinçage au soxhlet de 2 heures.

1.3.1.3 La polymérisation radicalaire classique : ses avantages et ses limites

La polymérisation radicalaire classique à partir de la surface permet l'obtention de films polymères d'épaisseur allant jusqu'à une centaine de nanomètres avec une facilité dans la mise en œuvre et assez peu de contraintes au niveau des conditions des réactions. Cependant, la polymérisation radicalaire « vivante » ou contrôlée a un certain nombre d'avantages par rapport à la polymérisation radicalaire classique. Les deux principaux avantages qu'un processus vivant offre sont : un contrôle fiable de la masse moléculaire du polymère et des indices de polymolécularité faibles. Ainsi, la nature du processus de polymérisation permet de pouvoir contrôler et varier les caractéristiques structurales des polymères en brosse greffées. De nombreuses approches efficaces ont été décrites sur la synthèse de brosses de polymères par polymérisation radicalaire « vivante »⁶⁷⁻⁸⁶. Dans le paragraphe suivant, nous parlerons la polymérisation initiée à partir de la surface avec comme technique de polymérisation dite « vivante », la polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome (ATRP). Nous décrirons son utilisation dans la voie photochimique et thermique.

1.3.2 Polymérisation in situ par radicalaire contrôlée

1.3.2.1 Principe

Les techniques de polymérisation contrôlée / vivante sont particulièrement attrayantes pour la préparation de polymères en brosse par la méthode du « grafting from » car elles permettent d'avoir un contrôle sur l'épaisseur du film, leur composition et leur architecture. Parmi les différentes techniques de polymérisation contrôlée/vivante, les stratégies à base de radicaux sont les plus fréquemment utilisées. Comparées aux autres méthodes de polymérisation contrôlées/vivantes, les réactions de polymérisation initiées à partir d'un radical présentent plusieurs avantages, notamment en terme de bonne compatibilité aussi bien dans les milieux organiques que dans les milieux aqueux mais aussi d'une grande tolérance envers une grande variété de groupements fonctionnels.

La polymérisation radicalaire contrôlée s'appuie sur un équilibre entre espèces dormantes et espèces actives propageantes (Figure 1.9). Cet équilibre permet souvent de réduire la concentration instantanée en radicaux propageants et ainsi, de façon cinétique, de diminuer la probabilité d'apparition de réactions de terminaison.

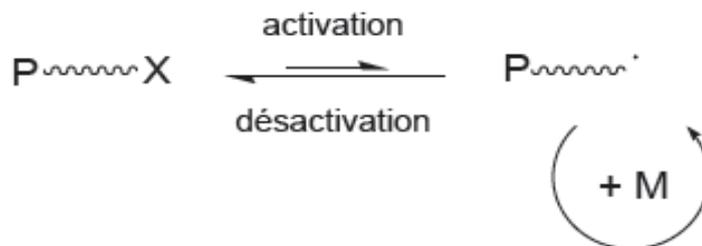


Figure 1.9 : Equilibre d'activation / désactivation en polymérisation radicalaire contrôlée.

Dans la mesure où la réaction d'amorçage est rapide face à la réaction de propagation, les critères qui caractérisent ce type de polymérisation sont les suivants :

- Si x est la conversion en monomère, alors l'évolution de la courbe $\ln 1/(1-x) = f(t)$ est linéaire et indique une concentration constante en radicaux propageants (cinétique d'ordre un en monomère).
- D'autre part, l'évolution de la courbe $DP_n = f(x)$ est linéaire, ce qui indique l'absence de réactions de transfert irréversible.
- L'indice de polymolécularité $I_p = M_w/M_n$ diminue avec la conversion et la distribution des masses molaires suit une loi de Poisson (équation 1).

$$I_p = \frac{M_w}{M_n} \xrightarrow{n \rightarrow +\infty} 1 + \frac{DP_n}{(DP_n + 1)^2} \cong 1 + \frac{1}{DP_n}$$

Le caractère vivant d'une polymérisation se traduit aussi par la fonctionnalisation des extrémités de chaînes liée à la nature de l'espèce dormante. Pour permettre une extension ultérieure des chaînes, il est nécessaire de maintenir un faible taux de chaînes mortes. Une des autres caractéristiques qui différencie la polymérisation radicalaire contrôlée de la polymérisation radicalaire classique réside dans la durée de vie du radical. En effet celle-ci est de l'ordre de 10^{-2} s dans la polymérisation radicalaire classique, tandis que dans le cadre de la polymérisation radicalaire contrôlée, le temps de vie des radicaux est fractionné (*via* l'équilibre activation/désactivation) sur une durée pouvant s'étendre à plusieurs heures, ce qui permet la synthèse d'architectures complexes.

Parmi les nombreux procédés disponibles, dans le cadre de la polymérisation « vivante » pour la réalisation de polymères en brosse, la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP) se distingue de par ses différentes qualités. En effet, l'ATRP à partir d'amorceurs immobilisés à la surface permet d'obtenir des polymères et des copolymères, de masse moyenne en nombre assez précise, avec une composition et une architecture bien définies. Par ailleurs, l'ATRP tolère bien l'eau et les impuretés, elle s'applique à un large éventail de monomères, elle permet, de plus, d'effectuer les polymérisations à des températures relativement basses. De plus, elle permet de travailler avec une large gamme de monomères, du styrène, des acrylates et des méthacrylates. L'ATRP fait appel à un mécanisme de terminaison réversible, l'équilibre repose sur une réaction rédox entre un complexe de métal de transition et un halogénure d'alkyle. Ce mécanisme est issu du concept plus connu d'effet Kharash⁸⁷ ou plus récemment ATRA (Atom Transfer Radical Addition) et a été développé en parallèle par Matyjaszewski et Sawamoto dès 1955.

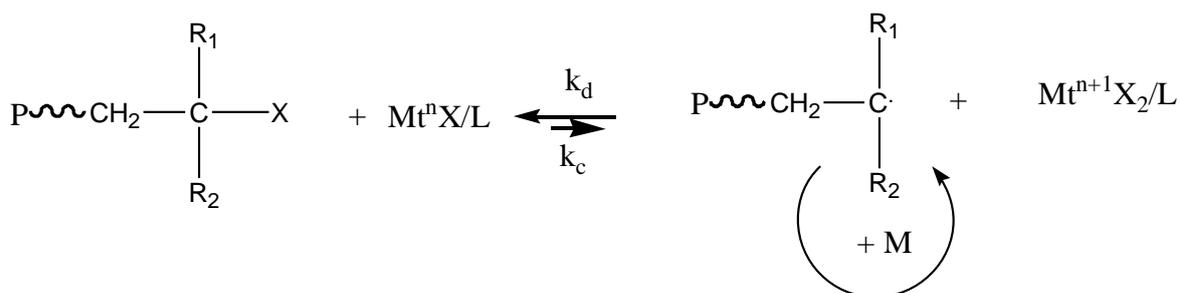


Figure 1.10 : Equilibre activation/désactivation en ATRP.

Ainsi, les réactions de transfert et de terminaison sont négligeables. La croissance simultanée des chaînes tout au long de la réaction est assurée par un amorçage rapide des chaînes et par une grande stabilité des centres actifs. Le DP_n des polymères obtenus augmente alors linéairement avec le taux de conversion et est inversement proportionnel à la concentration en amorceur. Un catalyseur efficace en ATRP comprend un métal de transition (Mt^n) capable d'étendre sa sphère de coordination et d'augmenter son degré d'oxydation, un ligand complexant (L) et un contre-ion qui peut former une liaison covalente ou ionique avec le métal. Le complexe métallique (Mt^n/L) est responsable de la coupure homolytique de la liaison alkyle-halogène R-X qui génère le complexe métallique correspondant au degré d'oxydation $n+1$ (Mt^{n+1}/L) et un radical organique R \cdot . Ce dernier peut ensuite propager avec un monomère vinylique, se terminer avec un autre radical organique ou être réversiblement désactivé par ($Mt^{n+1}X/L$) et former une chaîne polymère dormante halogénée. La plupart du temps le métal de transition utilisé est le cuivre tandis que l'halogène est le brome ou le chlore. Les ligands classiques sont de type alkylamines, pyridines, phosphones ou éthers. Ils servent à solubiliser le catalyseur.

Il est possible de passer d'un côté ou de l'autre de l'équilibre pour démarrer la polymérisation. Si un halogénure d'alkyle est mis en présence d'un métal complexé par un ligand on parle d'ATRP directe⁸⁸. En revanche si la réaction est amorcée par un amorceur radicalaire conventionnel en combinaison avec ($Mt^{n+1}X/L$), on parlera d'ATRP inverse⁸⁹. Ce dernier procédé permet d'éviter les problèmes de stabilité des catalyseurs à l'air, lorsqu'ils sont à des degrés d'oxydation bas. Cet aspect est important lorsque les catalyseurs sont très actifs et donc très sensibles à l'oxydation. Ce cas est de plus en plus répandu, dans l'optique de contrôler des monomères de moins en moins réactifs et d'utiliser des quantités de catalyseurs de plus en plus faibles.

L'ATRP a été amorcée à partir de surfaces diverses, portant des alcools ou des amines, qui peuvent être facilement transformés en des amorceurs correspondants (2-bromoesters ou 2-bromoamides). Dans la majorité des cas, les groupes amorceurs sont bien localisés, grâce à l'utilisation de techniques de fonctionnalisation appropriées telles que la silanisation, ou des monocouches auto-assemblées de thiols sur une surface d'or ou encore à partir d'un macroamorceur en surface^{27, 90}.

1.3.2.2 Les types d'amorceurs utilisés selon la nature du substrat

Les premiers résultats concernant l'ATRP initiée à partir d'une surface ont été décrits par Huang et Wirth⁹¹ qui avaient greffé des brosses de poly (acrylamide) sur des particules de silice modifiées par du chlorure de benzyle. Peu après, Ejas *et al.*⁹² ont décrit la préparation de brosses de poly (méthacrylate de méthyle) qui ont grandi à partir de monocouches auto-assemblées de 2-(4-chlorosulfonylphényl) d'éthyle silane obtenues à partir de la technique de Langmuir-Blodgett. Ces auteurs ont pu démontrer la nécessité d'ajouter de l'amorceur sacrificiel libre en solution, dans leur cas du chlorure de *p*-sulfonyltoluène afin d'avoir une polymérisation contrôlée. En l'absence d'amorceur sacrificiel, la concentration des espèces dormantes Cu^{II} est trop faible pour permettre une polymérisation contrôlée. Une autre alternative pour enrayer ce problème est d'ajouter directement ces espèces Cu^{II} dormantes en solution durant la polymérisation. Cette technique a été démontrée par Matyjasewski *et al.*⁹³ lors de la synthèse de brosses de poly (styrène) sur des substrats de silicium fonctionnalisés par du 2-bromoisobutyrate d'éthyle. Jusque dans les années 2000, la synthèse de films polymères sur des surfaces d'or était très rare, l'ATRP était plutôt réalisée sur d'autres surfaces, notamment de la silice ou autre, l'une des contraintes majeures de la surface d'or réside dans l'instabilité des liaisons thiols aux températures supérieures à 60°C. Bruening⁶⁷ et son équipe ont été parmi les premiers à s'essayer à la synthèse de films de polymère par ATRP sur une surface d'or, pour contourner la contrainte de la température, ils se sont aidés des conditions trouvées par Matyjasewski⁹⁴ *et al.* pour réaliser la synthèse de polyacrylates par ATRP à température ambiante. Ainsi, la synthèse de films de polyméthacrylate de méthyle sur une surface d'or à 25°C a pu être réalisée. Parmi les nombreux avantages de l'ATRP à température ambiante, on peut noter que la contrainte de surfaces incompatibles avec les températures de polymérisation élevées disparaît, de plus une simple étape de lavage sans extraction au soxhlet permet d'obtenir une surface avec un film mince de polymère, les chaînes polymère ont seulement grandi à partir de la surface. Afin d'obtenir la couche d'amorceur compatible avec la polymérisation radicalaire par transfert d'atome, le substrat préalablement modifié au 11-mercaptoundecanol est ensuite plongée dans une solution de bromure de 2-bromopropionyle en présence de triéthylamine (voir Figure 1.11).

Le ligand utilisé pour la polymérisation est le tris-2-(diméthylamino) éthylamine (Me₆TREN). Des films de poly (méthacrylate de méthyle), d'épaisseur variant entre 30 nm

et 40 nm ont été obtenus au bout de 12 heures de polymérisation à 25°C, l'uniformité du film a été validée par les mesures ellipsométriques et d'AFM. Une des avancées majeures de cette étude est que l'on a pu avoir accès à la masse moyenne en nombre du polymère accroché à la surface grâce l'extraction de celui-ci par de l'iode. L'analyse par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) du poly(MMA) extrait donne une M_n de 44 500 g/mol avec un indice de polymolécularité de 1,3.

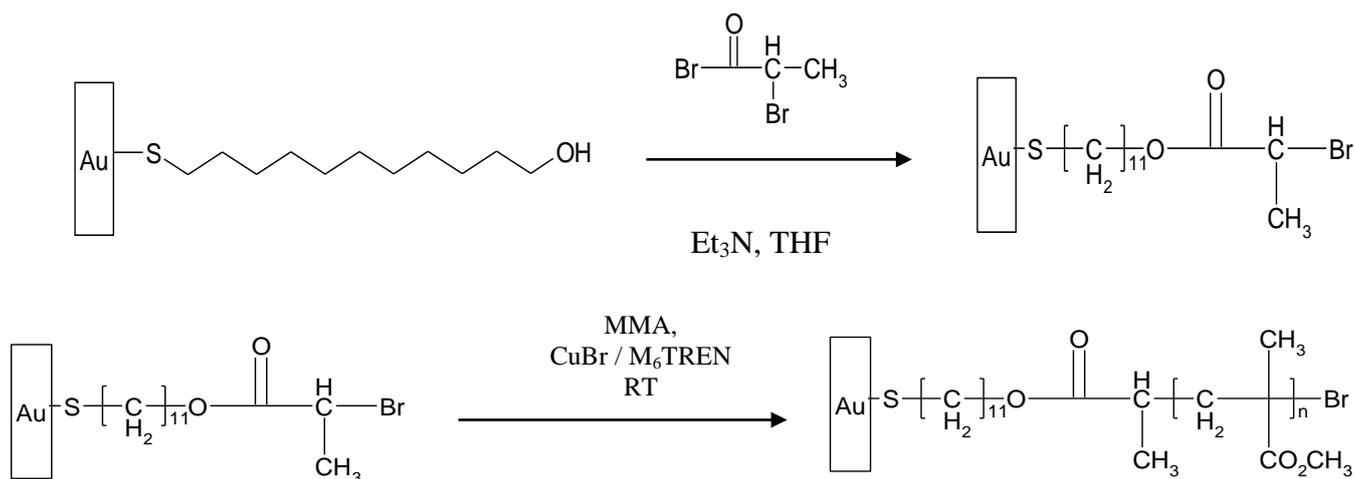


Figure 1.11 : Schéma réactionnel de la synthèse du polyméthacrylate de méthyle sur une surface d'or par ATRP

Un des avantages de l'ATRP évoqué plus haut est sa tolérance à l'eau. Il a été aussi démontré que l'eau constitue un formidable accélérateur de l'ATRP avec les monomères hydrophiles et ne joue pas uniquement le rôle d'un solvant. En effet, l'équipe de Bruening⁸⁴ a obtenu des films de poly(méthacrylate de 2-hydroxyéthyle) avec une épaisseur de 700 nm au bout de 12 heures de polymérisation à température ambiante avec un milieu réactionnel comprenant entre autres, un mélange 50/50 d'eau et de monomère, le méthacrylate de 2-hydroxyéthyle. La même expérience effectuée sans eau ne donne que des épaisseurs de films d'environ 6 nm. Par ailleurs, de par leur expérience, ils ont confirmé l'importance du couple CuCl / CuBr_2 par rapport au couple CuBr / CuBr_2 comme catalyseur. En effet, avec le couple CuCl / CuBr_2 , on observe une augmentation plus linéaire de l'épaisseur du film en fonction du temps de réaction et donc un meilleur caractère « vivant » de la réaction. Le caractère vivant des chaînes de poly(HEMA) a été ensuite mis en évidence par la synthèse d'un bloc de poly (méthacrylate de diméthylaminoéthyle).

1.3.2.3 Caractéristiques des films polymère obtenus

On a longtemps expliqué que la gêne stérique empêchait les chaînes de croître à partir de chaque amorceur de la monocouche auto-assemblée⁹⁵. En effet, il a été observé que la zone section moyenne d'une chaîne polymère ($\sim 180\text{-}200 \text{ \AA}^2$) était beaucoup plus importante que l'aire d'une molécule d'amorceur ($\sim 20\text{\AA}^2$). De ce fait, on s'attend à ce qu'un seul amorceur sur dix lié à la surface initie la formation de la brosse de polymère. La gêne stérique causée par les brosses de polymère grandissant les unes à côté des autres pourrait expliquer ce phénomène. D'autre part, il n'est pas clair qu'une grande concentration de radicaux sur notre surface mènerait à une large fraction d'amorceurs et de chaînes polymère propageantes à se terminer par combinaison. Dans ce cas, tous les amorceurs pourraient démarrer une chaîne polymère, mais après une certaine période, un pourcentage de ces chaînes peut se terminer à cause de la proximité des radicaux. Une des autres particularités de l'ATRP est de pouvoir maîtriser la densité des brosses de polymère en surface en variant la densité d'amorceur en surface. Pour cela de nombreuses études explorent l'ATRP à partir de monocouches auto-assemblées mixtes composées d'amorceurs réactifs et inertes en milieu aqueux. L'idée repose sur le fait que les deux molécules ayant la même réactivité envers la surface, il sera possible d'obtenir des concentrations arbitraires d'amorceurs réactifs diluées de manière homogène dans la matrice de molécules inactives. L'intérêt des monocouches auto-assemblées mixtes réside dans l'apport d'informations sur le mécanisme de croissance des brosses de polymère à partir de la surface en solution ainsi que de leur densité et de leur morphologie.

Huck *et al.*⁸⁰ ont utilisé un mélange de monocouches composé du undécane-thiol et du bromoisobutyrate de ω -mercaptoundécyle pour amorcer la polymérisation contrôlée du méthacrylate de méthyle et du méthacrylate de glycidyle à partir d'une surface d'or à température ambiante dans un mélange méthanol, eau. Ils ont remarqué qu'en faisant varier le pourcentage du bromoisobutyrate de ω -mercaptoundécyle de 10 et 50%, les brosses de poly (méthacrylate de méthyle) croissent d'environ 1/10 et d'1/2 par rapport à l'épaisseur des brosses greffées sur des SAMs composées à 100% de celui-ci. Une relation quasi-linéaire se forme entre la densité d'amorceur en surface et la vitesse de croissance des brosses de polymère et leur épaisseur. Cela ne s'avère vrai, en revanche que pour les brosses de P(GMA). Les brosses de poly(MMA) quant à elles, s'arrêtent de grandir au bout de 100 minutes de polymérisation, ceci est probablement lié à des réactions de terminaison ou au

fait que les chaînes propageantes sont entravées par le film polymère. Ce résultat est à l'opposé de ce qui est attendu, notamment que le couplage bimoléculaire pourrait diminuer avec la dilution en amorceur et accroîtrait ainsi l'efficacité de l'amorceur. La constance de l'efficacité de l'amorceur pourrait s'expliquer par une séparation des phases thiolées en deux îlots incorporés dans l'undécane-thiol. Les avantages de cette méthode sont l'insensibilité aux cinétiques durant les étapes d'ancrage des amorceurs, la capacité de couvrir des surfaces de taille et de forme différente, ainsi que de pouvoir généraliser cette méthode à des surfaces allant des oxydes inorganiques aux matériaux naturels tels que la cellulose. Afin de pallier ces effets d'îlots de l'amorceur, Bao *et al.*⁹⁶ ont adopté une autre stratégie pour contrôler la densité de brosses de polymère à partir de la surface, de façon à créer des blocs de polymères de densité arbitraire sur des surfaces d'or. Tout d'abord ils ont modifié la surface d'or en une monocouche avec des fonctions alcool en se servant du mercaptoundécane-thiol. Le traitement de cette surface, ensuite, par un mélange de bromure d' α -bromopropionyle et de bromure d' α -méthylpropionyle produit des amorceurs actifs dispersés dans une matrice d'esters d' α -méthylpropionate inactifs. Comme l'amorceur qui en résulte et les molécules dans lesquelles il est dilué, ne diffèrent que par la substitution d'un atome de brome à un groupe méthyle, on s'attend à ce qu'ils soient peu séparés en phase. Ils ont ensuite fait grandir à partir de la monocouche des chaînes de poly(MMA) et de poly(HEMA). Il leur est apparu que l'épaisseur des films dépend énormément de la densité en amorceur, lorsque la fraction d'amorceurs dans la monocouche est inférieure à 10 %, l'efficacité de l'amorçage est grande. De plus, le contrôle de la densité des brosses de poly(HEMA) leur a permis un gonflement dans l'eau de l'ordre de 85 à 200 %, ainsi avec des densités d'amorceur de 0,1 % les films de poly(HEMA) gonflent 20 fois plus dans l'eau que ceux préparés à partir de monocouches composées uniquement d'amorceurs. Un tel contrôle permettra l'utilisation des polymères en brosse pour l'immobilisation de biomolécules actives et accessibles tels que les brins d'ADN ou encore des anticorps.

Cette même chimie de l'ATRP est aussi développée sur les surfaces de silice avec de bons résultats à la clé. Par exemple, Huck et son équipe⁹⁷ ont effectué l'ATRP du méthacrylate de glycidyle et du mélange de celui-ci avec du méthacrylate de méthyle sur des « wafers » en silice à température ambiante. La synthèse des brosses de poly (GMA) et celles de poly (GMA-co-MMA) s'est faite dans un mélange méthanol/eau. La fixation de l'amorceur trichlorosilané a été réalisée en présence d'une petite quantité de triéthylamine. En effet sans ajout de triéthylamine, la couche d'amorceur a une épaisseur d'environ 40 nm,

valeur très au-dessus de celle attendue ($\approx 2\text{nm}$) et la caractérisation de la surface par AFM montre une structure irrégulière composée de grands globules comme si les particules de l'amorceur trichlorosilané avaient polymérisé et formé un réseau réticulé de siloxane. L'ajout de triéthylamine a permis d'obtenir une couche d'amorceur de 0,9 nm, plus en accord avec l'épaisseur de la véritable monocouche de silane. De plus, la caractérisation de la surface montre la disparition des globules notés auparavant, et une couche plus homogène. Le système de polymérisation utilisé est composé de CuCl, de CuBr₂ et du 2,2'-dibipyridyl comme ligand. Il a été démontré que l'association entre le chlore et le brome permet un meilleur contrôle de l'ATRP, car les liaisons C-Cl sont plus stables que les liaisons C-Br⁹³. Des brosses de poly (GMA) et poly (GMA-co-MMA) d'épaisseur de 120 nm ont été obtenues au bout de 4 heures, avec une relation quasi-linéaire entre l'épaisseur et le temps de polymérisation avec les réactifs choisis. Les conditions de synthèse des brosses de poly (GMA-co-MMA) sont semblables à celles choisies pour la réalisation de des brosses de P(GMA). La vitesse de croissance des brosses est plus rapide lorsque le mélange en monomères contient plus de GMA.

Une autre approche pour réaliser l'ATRP sur des surfaces est d'avoir comme amorceur une couche d'ancrage macromoléculaire⁹⁰, autrement dit, passer par un couplage polymère, amorceur pour la synthèse de couches de polymère greffé. Ce polymère est constitué de groupes fonctionnels actifs (telles que des fonctions époxydes, alcools, ou anhydride) envers la surface et l'amorceur spécifique d'ATRP. Une réaction de couplage est réalisée entre les deux. Cette méthode permet à la fois l'utilisation du « grafting onto » et du « grafting from » pour la synthèse de brosses de polymère. Le polymère utilisé dans la première étape de modification, réagit avec la surface par la formation de liaisons covalentes. Les unités réactives localisées dans les boucles et les queues de la macromolécule attachée ne sont pas connectées à la surface. Elles serviront par la suite de sites potentiels pouvant réagir avec l'amorceur lors de sa fixation et former ainsi la couche de macro-amorceur. Cette méthode a été utilisée par l'équipe de Luzinov²⁷ dans le cadre de la synthèse de brosses de poly(styrène), la couche formée après la première étape de modification est constituée de poly(méthacrylate de glycidyle). Leur choix s'est orienté vers un polymère ayant des fonctions époxydes car celles sont très réactives avec les groupements fonctionnels carboxyles, hydroxyles, amines, et anhydrides. Les unités de méthacrylate de glycidyle qui ne sont pas connectées à la surface servent de liaisons pour le greffage de l'amorceur pour l'ATRP. Dans leur cas, le macro-amorceur est synthétisé à travers la réaction des sites époxydes du P(GMA) à la surface et les groupements

fonctionnels carboxyles de l'acide bromoacétique. Le P(GMA) est fixé sur la surface par « dip-coating », ensuite l'acide bromoacétique est rajouté par le biais de la phase gazeuse et sous pression réduite. En faisant varier le temps et la température entre 30 et 110°C, ils parviennent à contrôler l'épaisseur de l'acide bromoacétique. L'acide bromoacétique n'ayant pas réagi avec le P(GMA) est retiré par différents lavages à l'éthanol sous ultrasons. Une fois la couche d'acide bromoacétique fixée, la polymérisation contrôlée du styrène est initiée avec comme ligand le 2,2'-dipyridyl de 4,4'-dinonyl, du CuBr, du bromoacétate d'éthyle, et de CuBr₂ ceci en proportion 300/2/1/1/0,5. L'épaisseur des films obtenus a été caractérisée par ellipsométrie, au bout de huit heures de polymérisation, l'épaisseur du film est d'environ 30 nm. Par ailleurs, l'efficacité de la couche de macro-amorceur a été prouvée par le fait que la synthèse du poly (styrène) réalisée sans la réaction de l'acide bromoacétique sur la couche de P(GMA) fixée préalablement ne donnait pas de polymère. De plus, en l'absence d'amorceur libre en solution et de CuBr₂, la réaction de polymérisation se comporte comme une polymérisation radicalaire classique, avec la formation rapide de brosses de poly (styrène) de 50 à 100 nm en 1 heure.

1.4 Biofonctionnalisation d'un film polymère

La chimie et l'organisation d'une surface influent sur sa réponse biologique et sont d'une importance fondamentale, surtout lorsque des systèmes vivants rencontrent les surfaces synthétiques. La plupart des biomolécules ont un immense pouvoir de reconnaissance moléculaire, en termes de liaison spécifique, tout en ayant une tendance à s'adsorber physiquement sur un substrat solide ne possédant aucun récepteur spécifique de reconnaissance créant ainsi de l'adsorption non spécifique. Cette adsorption non spécifique réduit typiquement la fonctionnalité d'une interface en générant par exemple des bruits de fond indésirables ou des faux positifs. Ainsi, pour réaliser des matériaux utiles pour nombre d'applications biotechnologiques, des interfaces qui possèdent à la fois une forte capacité de liaison spécifique, et réduisent les interactions non spécifiques, sont requises. Ces contraintes ont conduit au développement des méthodes de modification de surface, dont certaines ont été présentées dans les paragraphes précédents. Celles-ci ont permis d'améliorer la mouillabilité, l'adhésion, des surfaces par l'introduction d'une variété de groupements polaires, tout en essayant de prendre en compte un minimum la spécificité du groupement fonctionnel. Par ailleurs, ces modifications de surface constituent les étapes initiales de la fixation de composés bioactifs tels que les protéines, ou l'ADN.

On peut distinguer plusieurs méthodes d'immobilisation d'un composé bioactif sur une surface polymère dans le cadre de la fabrication de capteurs chimiques ou encore de biocapteurs. Ces méthodes sont les suivantes (Figure 1.12):

- l'adsorption par le biais d'interactions électrostatiques, hydrophiles ou hydrophobes. L'adsorption non covalente est quelquefois souhaitée, tel est le cas dans certaines applications de libération de principes actifs⁹⁸. Elle est aussi appropriée dans le cas de textiles régénérables antimicrobiens⁹⁹⁻¹⁰¹.
- l'interaction ligand / récepteur comme dans le cas de biomolécules biotynilées qui se fixent sur l'avidine. L'interaction entre la biotine et l'avidine est la plus forte des interactions non covalentes répertoriées de l'ordre de 150 pN¹⁰².
- la liaison covalente, le composé biologique est couplé sur la surface par le biais d'une réaction chimique telle que la formation d'une liaison peptidique ou par la formation d'une liaison avec une surface activée par des fonctions thiols, époxyde, amine ou encore carboxylique.
- Le piégeage qui correspond à un emprisonnement physique du composé bioactif à l'intérieur du film.
 - La réticulation qui est similaire au piégeage, seul un agent de polymérisation tel que la glutaraldéhyde a été utilisé pour apporter des liaisons chimiques supplémentaires entre le composé bioactif piégé et le film qui le contient.

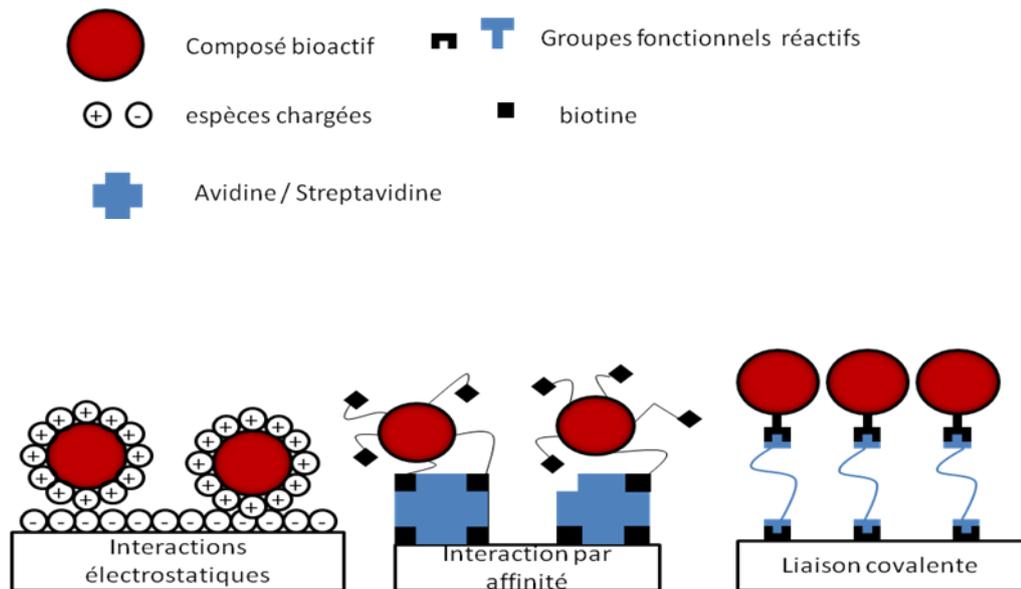


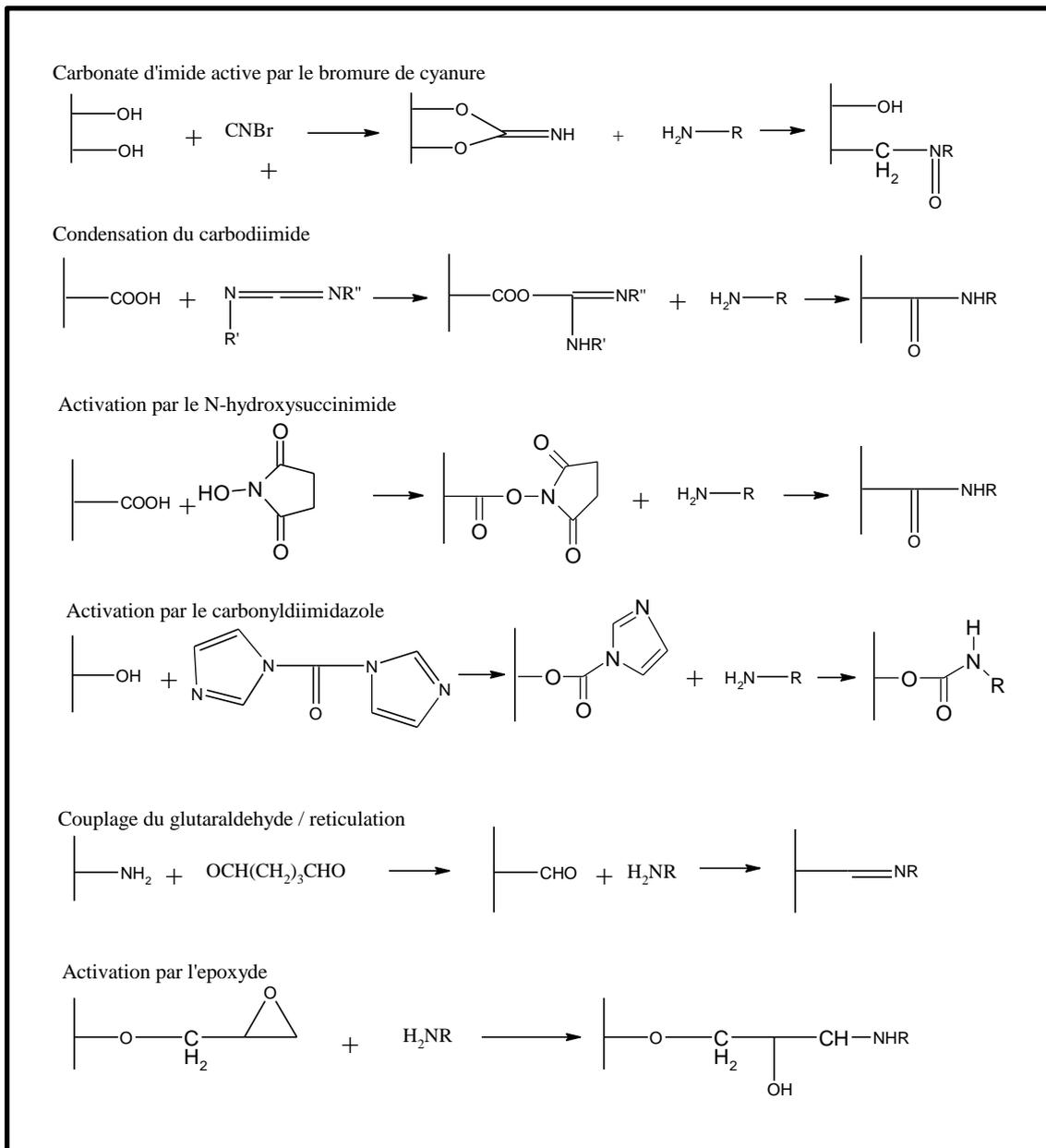
Figure 1.12 : Les différents mécanismes d'immobilisation d'un composé bioactif.

1.4.1 Immobilisation covalente d'une biomolécule sur le film polymère

L'immobilisation covalente offre plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes décrites dans le paragraphe précédent, notamment en apportant une liaison plus stable entre le composé et la surface fonctionnalisée par le polymère. Les capteurs basés sur ce système ont la plus grande résistance aux variations de pH, de la force ionique et de la température et sont parmi les plus stables dans le cadre d'un système réutilisable et recyclable. Dans le domaine biomédical, une immobilisation covalente peut servir à augmenter la demi-vie d'une biomolécule, inhiber son métabolisme par exemple dans les composés qui ont une activité anticancéreuse quand ils sont utilisés localement, mais pouvant être toxiques lorsqu'ils sont métabolisés. Elle permet aussi la bio-activité continue dans le cas d'implants, comme les appareils vasculaires, les « shunts », ou les cathéters^{103, 104}. Dans le cas des applications autour de l'emballage alimentaire, la liaison covalente permet de s'assurer que le composé bioactif ne migre pas dans les aliments et ainsi offre un avantage réglementaire : l'agrément en tant que conservateur alimentaire n'est plus requis¹⁰⁵.

Afin d'immobiliser de façon covalente les molécules bioactives sur la surface du film polymère, la présence de certains groupes fonctionnels à la surface est nécessaire. Les groupes fonctionnels les plus communément utilisés sont les amines primaires, les fonctions thiols, hydroxyles ou encore acides carboxyliques. Le tableau 1.2 récapitule les méthodes d'immobilisations covalentes les plus couramment utilisées.

Tableau 1.2 : Présentation de quelques méthodes d'immobilisation covalente de composés bioactifs R-NH₂ sur la surface polymère



Un grand nombre d'études a été réalisé sur l'utilisation de films polymère pour la fixation de biomolécules ou pour éviter des interactions non spécifiques. Millot *et al.*¹⁰⁶ ont par exemple immobilisé un copolymère de N-vinylpyrrolidone (NVP) et de vinylchloroformiate (VCF) activé par des fonctions carbonate de NHS, avec une épaisseur proche de 21 nm, sur une surface modifiée par de la cystéamine. Le copolymère utilisé est hydrophile et neutre afin de limiter les interactions hydrophobes et/ou électrostatiques avec les protéines. Des anticorps de type IgG ont ensuite été greffés sur les fonctions carbonate de NHS résiduelles du copolymère et ont conduit à la formation d'une monocouche d'IgG.

Millot *et al.*¹⁰⁷ ont également immobilisé des IgG sur un poly (chlorure de méthacryloyle) dont les fonctions réactives ont été transformées en ester de NHS. Deux méthodes ont été utilisées pour la modification de la surface d'or par le polymère. La première a consisté à immobiliser une monocouche de monomères sur la surface d'une SAM constituée de cystéamine puis à polymériser *in situ* les monomères. La seconde a consisté à fixer directement le polymère préformé sur la surface SAM de cystéamine. Le premier procédé a conduit à une structure macromoléculaire moins dense et plus flexible permettant un meilleur contact entre le polymère et les molécules d'IgG. Néanmoins, les quantités d'anticorps greffées sur les deux types de surface se sont avérées être comparables. Par ailleurs, il a été montré que l'introduction d'un bras espaceur sur le polymère avant le greffage de l'anticorps IgG n'augmentait pas forcément la quantité d'IgG fixée mais améliorait les propriétés de reconnaissance entre les IgG immobilisés et les anticorps anti-IgG correspondants. Lee *et al.*¹⁰⁸ ont comparé la quantité de streptavidine fixée sur des brosses de poly (méthacrylate d'éthylène glycol) biotinylées à celle fixée sur des SAMs modifiées par de la biotine par des mesures RPS. Les brosses de poly (méthacrylate d'éthylène glycol) biotinylées ont montré une capacité 2 fois et demie plus grande à fixer de la streptavidine. Xu *et al.*¹⁰⁹ ont utilisé la réactivité de la fonction époxyde pour immobiliser une enzyme, la glucose oxydase sur des brosses de poly (GMA). En augmentant l'épaisseur des brosses de 5 à 55 nm, ils ont remarqué une augmentation de la quantité de glucose oxydase immobilisée ainsi que de son activité en fonction de l'épaisseur du film de P(GMA).

1.4.2 Effet de la mouillabilité du film polymère sur l'immobilisation d'une protéine.

Un nombre grandissant d'études sur le comportement des protéines aux interfaces¹¹⁰⁻¹¹² sont conduites pour répondre aux défis dans les domaines tels que la régulation de l'activité de la protéine sur des surfaces de matériaux biomédicaux¹¹³⁻¹¹⁵, l'amélioration de la performance d'enzyme biocatalytique¹¹⁶⁻¹¹⁸, l'augmentation de la réponse de biocapteurs à base de protéines¹¹⁹⁻¹²¹ ou encore pour créer des matériaux chromatographiques utilisables pour la séparation / purification des protéines¹²²⁻¹²⁴. En appliquant les avancées dans le contrôle de la chimie et de la morphologie de surface, et en fixant ensuite sur ces surfaces des protéines, il est possible de contrôler l'orientation et la conformation de la protéine et ainsi d'atteindre de notables améliorations sur la stabilité et l'activité des protéines.

En effet, il était déjà connu que l'introduction d'un polymère hydrophile tel que le poly (éthylène glycol)^{104, 125} ou le poly (méthacrylate de 2-hydroxy-éthyle) permettait de diminuer voire d'éviter les interactions non spécifiques de la protéine avec la surface de polymère tout en étant biocompatible. Le poly (N-isopropyl acrylamide)^{126, 127} (PNIPAM) est un autre polymère qui est largement utilisé pour diminuer les interactions non spécifiques. Le poly (NIPAM) possède une caractéristique intéressante qui est sa température de transition critique (LCST). Cela lui permet de moduler ses propriétés de surface, il peut être hydrophile et donc résistant à l'adsorption non spécifique de protéines et de cellules ou être à l'état hydrophobe et adsorber des protéines et des cellules. La littérature concernant l'adsorption des protéines sur différents types de polymères est existante. A ce propos, Jeyachandran *et al*¹²⁸. ont étudié l'adsorption de l'albumine de sérum bovin (BSA) sur des surfaces hydrophiles et hydrophobes. Ils ont démontré que les molécules de BSA s'adsorbaient, avec un taux de recouvrement de 95%, sur la surface hydrophile de GeOH avec une plus grande force d'interaction que sur la surface hydrophobe de poly (styrène) sur laquelle le taux de recouvrement de la BSA n'est que de 50%. Ils expliquent cette différence de comportement par un changement de conformation moléculaire et d'orientation de la BSA suivant l'hydrophobie de la surface, néanmoins elle conserve sa structure α -hélicoïdale dans les deux cas. Chen et Thayumanavan¹²⁹ ont étudié l'adsorption de la BSA par spectroscopie aux rayons X (XPS) sur des surfaces amphiphiles d'homopolymères contenant des fonctionnalités hexyle, acides carboxylique, ou les deux, avec comme polymère repère le poly(styrène). Ils montrent qu'il apparaît une diminution de la quantité de BSA adsorbée lorsque la surface est constituée par les polymères amphiphiles. Le mélange constitué par le polymère hydrophile et celui hydrophobe présente le meilleur compromis en terme de réduction des interactions non spécifiques. Les surfaces constituées par les homopolymères hydrophiles ou hydrophobes sont ceux qui adsorbent le plus la BSA.

D'autres études plus récentes mais moins nombreuses, évoquent l'influence de l'hydrophilie du film sur la capacité de fixation d'une biomolécule mais aussi de son activité envers une molécule cible. Chen *et al.*¹³⁰ ont adsorbé de la lipase B *Candida antarctica* (CALB) sur des films minces de polymères contenant des fonctions époxydes. En augmentant l'angle de contact de leurs films de 42° à 55°, donc l'hydrophobie de la surface, il s'ensuit une diminution de la quantité de CALB immobilisée. Ils ont aussi noté la diminution de l'activité totale de l'enzyme immobilisée avec l'augmentation de l'hydrophilie du film, en mesurant la catalyse par la CALB de l'hydrolyse du *p*-butyrate de

nitrophényle. Par une modélisation, ils ont mis en évidence les trois possibles orientations de la CALB suivant l'hydrophilie du film polymère.

1.4.3 Conformation d'espèces biologiques greffées sur une interface polymère

Les protéines sont des macromolécules constituées d'un enchaînement ordonné d'acides aminés unis par des liaisons peptidiques¹³¹. En général, on parle de protéine lorsque la chaîne contient plus de 100 acides aminés, bien que la notion de repliement entre également en compte (les thionines avec 50 acides aminés sont des protéines car elles possèdent un repliement induisant une forme tridimensionnelle).

1.4.3.1 Les acides aminés

Un α -aminoacide est constitué d'un atome de carbone central, appelé carbone α , lié à un groupe amine primaire, un groupe acide carboxylique, un atome d'hydrogène et un groupe R caractéristique appelé chaîne latérale (figure 1.13). Les aminoacides en solution à pH neutre se trouvent essentiellement sous forme de molécules dipolaires, ou zwitterioniques, le groupe amine étant protoné (NH_3^+) et le groupe carboxyle déprotoné (COO^-) (figure 1.13).

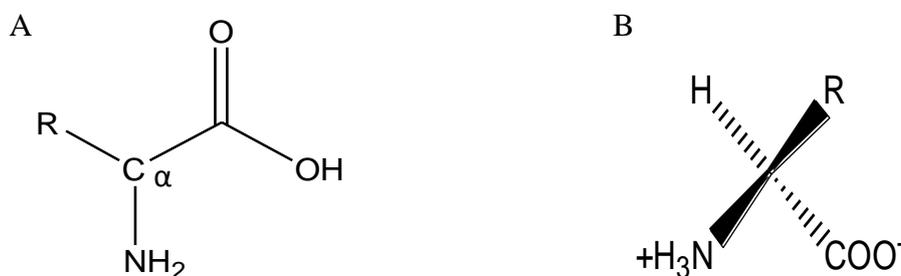


Figure 1.13 : formule chimique d'un acide aminé. A : forme non dissociée. B : forme zwitterionique.

On dénombre environ 500 acides aminés connus mais seuls 20 participent à la synthèse des protéines naturelles. Parmi eux, le corps humain en synthétise 12, les 8 autres, appelés acides aminés essentiels, sont apportés par l'alimentation. Avec quatre groupes différents connectés à l'atome de carbone α tétraédrique, les acides α -aminés sont des molécules chirales, à l'exception de la glycine où R est un hydrogène. Seuls les aminoacides L (projection de Fischer) sont des constituants des protéines (configuration absolue S). Ces

acides aminés présentent différentes propriétés physico-chimiques suivant la nature des chaînes latérales. Ils peuvent être polaires, hydrophobes, acides ou basiques.

1.4.3.2 Les protéines

On distingue plusieurs niveaux d'organisation des protéines : la structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire. Cependant dans les conditions physiologiques, chaque protéine possède une seule conformation spécifique, appelée état natif. Nous allons décrire brièvement ces différentes structures :

- La *structure primaire (I)* qui correspond à l'enchaînement des acides aminés. Plus précisément, les protéines sont des polymères linéaires formés par l'union du groupe α -carboxyle d'un aminoacide au groupe α -amine d'un autre aminoacide par une liaison peptidique. La formation d'un dipeptide à partir de deux acides aminés s'accompagne de la perte d'une molécule d'eau (figure 1.14).

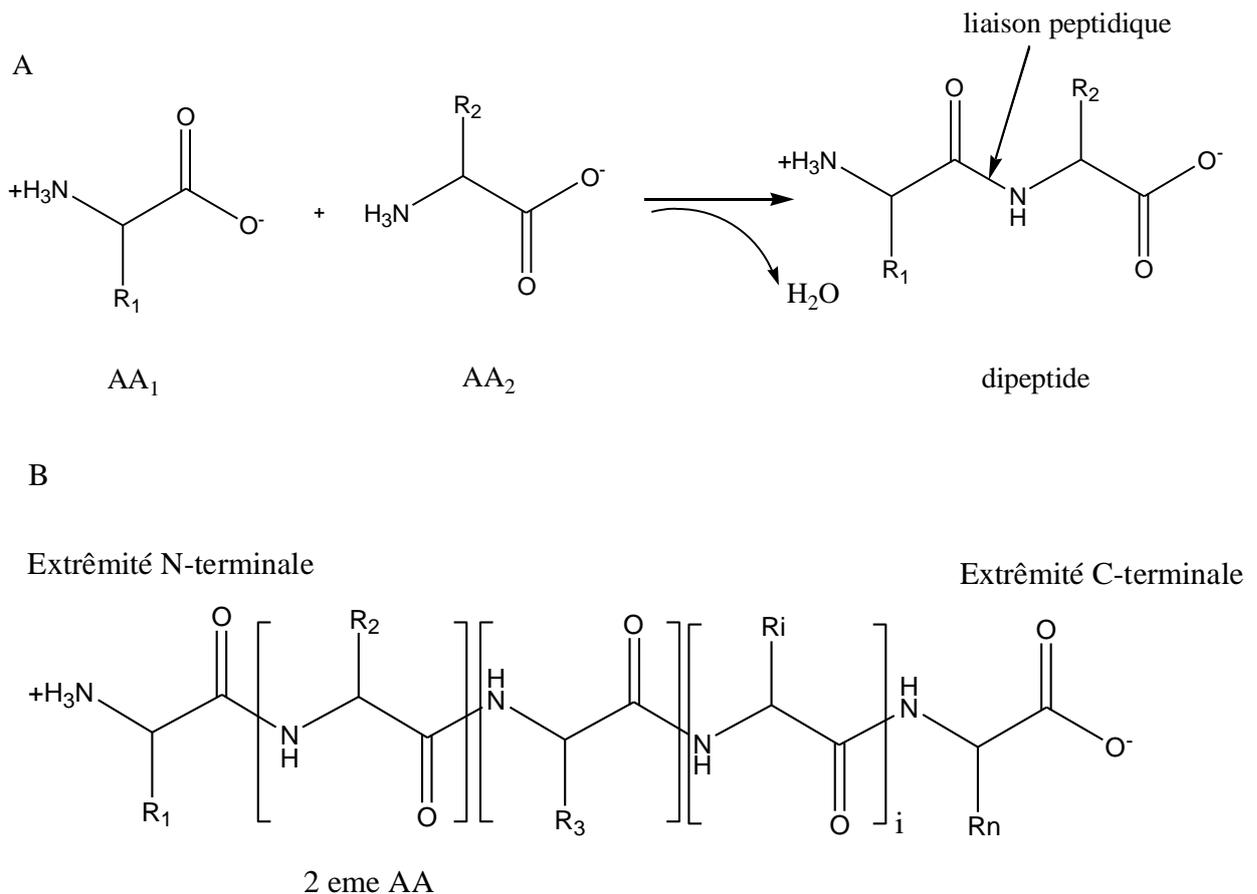


Figure 1.14 : Représentation d'une liaison peptidique, A : formation d'un dipeptide à partir de deux acides aminés, B : obtention d'une chaîne polypeptidique.

- La *structure secondaire (II)* qui décrit le premier niveau de repliement de l'enchaînement peptidique. Elle est assurée par des interactions de type liaisons hydrogène entre les acides aminés voisins et se caractérise par une conformation répétitive localisée. Il existe deux types de structure secondaire : l'hélice α et le feuillet β .

La *structure tertiaire (III)* correspond au repliement et à l'assemblage en domaine des différents éléments de la structure secondaire. Il s'agit de la structure tridimensionnelle de la protéine. Elle est intimement liée à sa fonction et elle dépend de la structure primaire et de l'environnement dans lequel se trouve la protéine. De nombreux facteurs contribuent à moduler la conformation de la protéine : solvant, force ionique, viscosité, concentration. Ainsi, les protéines solubles en milieu aqueux et les protéines membranaires auront des conformations différentes. La tendance thermodynamique conduit les groupes non polaires à éviter la phase aqueuse et les groupes polaires à rester en contact avec le solvant. Il se forme ainsi, dans le cas des protéines solubles, une sorte de noyau hydrophobe à l'intérieur de la molécule protéique, tandis que les groupes polaires sont en majorité à la surface. C'est ce que l'on appelle l'effet hydrophobe. La structure tertiaire est stabilisée par des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogène, des liaisons ioniques ou encore des ponts disulfures (S-S), véritable liaison covalente formée par oxydation entre les fonctions thiols de deux cystéines.

- La *structure quaternaire (IV)* concerne les protéines constituées de plusieurs chaînes polypeptidiques et correspond à l'association de celles-ci par des interactions semblables à celles établies à l'intérieur d'une chaîne polypeptidique, c'est-à-dire des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogène et dans certains cas, des ponts disulfures. C'est le cas par exemple de l'hémoglobine constituée de quatre chaînes protéiques, de même structure tertiaire.

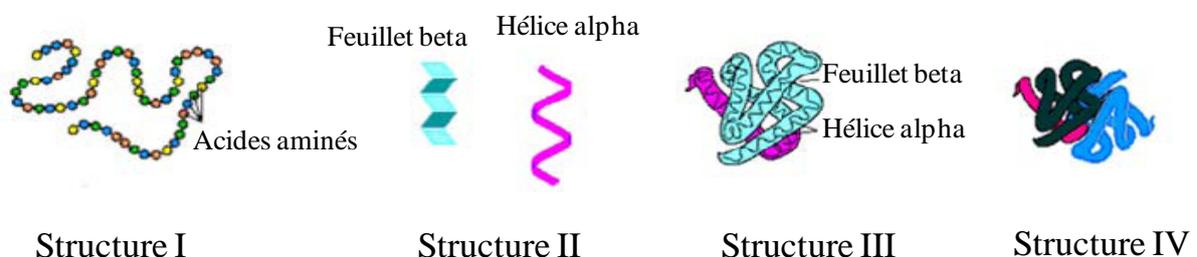


Figure 1.15 : Les quatre niveaux de structures des protéines

1.5 Conclusion

Dans cette partie, nous avons présenté les différentes techniques de modification de surface par un film organique. Notamment, la modification de surfaces par des films polymères. Ces films polymères peuvent être synthétisés par la technique du « grafting onto » ou du « grafting from ». Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la technique du « grafting from » et cela avec plusieurs types de polymérisation. En effet, le « grafting from » offre de nombreux avantages dont une plus importante densité de greffage 10 à 20 fois plus élevée que dans le cas du « grafting onto ». Nous avons pu voir l'influence de la technique de greffage et de synthèse choisie sur la structure des chaînes polymères pouvant aller de chaînes très repliées sur elles mêmes (« grafting onto ») à des chaînes polymères étendues (ATRP). Nous avons montré l'importance de la modification de la surface sur la quantité de biomolécules immobilisée. De plus, les films polymères confèrent une plus grande robustesse et une régénéralité au système grâce à la chimie covalente utilisée.

Dans la suite du travail, nous avons modifié des surfaces d'or par des films polymères à base de méthacrylates portant des fonctions époxydes par différentes techniques de greffage et de synthèse. Nous avons mis en évidence l'influence de la préparation des films polymères, et de la nature du polymère sur l'efficacité de la fixation de la protéine modèle choisie, la BSA, ainsi que de sa bioactivité, par un test de reconnaissance envers son anticorps l'anti-BSA.

CHAPITRE 2

RAPPEL DES TECHNIQUES DE CARACTERISATION DE SURFACE UTILISEES DANS CE TRAVAIL

Sommaire

2.1 Présentation de la résonance des plasmons de surface (RPS).....	46
2.1.1 Propriétés des plasmons de surface	47
2.1.2 Excitation des plasmons de surface à l'aide d'un couplage par prisme	49
2.1.3 Mesure de l'épaisseur d'une couche mince par RPS	51
2.1.4 Imagerie par résonance des plasmons de surface par imagerie (SPRi) et méthodologie	54
2.1.5 Modélisation des courbes plasmons de surface	56
2.2 La spectrométrie photoélectronique X (XPS)	58
2.3 Le PM-IRRAS	59

L'objectif de ce travail consiste à comparer l'efficacité de différents procédés multi-étapes faisant appel à des films macromoléculaires, pour le greffage de composés bioactifs sur des substrats d'or. L'état de surface du matériau doit être contrôlé après chaque étape pour valider les mécanismes de greffage covalent proposés. Cela implique une mesure des quantités de polymère et de composés bioactifs immobilisés mais aussi un contrôle de la chimie de surface, en particulier des liaisons établies entre les différentes couches déposées à la surface de l'or. Nous présenterons dans cette partie les principales techniques que nous avons utilisées pour la caractérisation des surfaces modifiées : la résonance de plasmon de surface (RPS), la spectrométrie photoélectronique X (XPS) et le PM-IRRAS.

2.1 Présentation de la résonance des plasmons de surface (RPS).

La RPS est une méthode de détection directe (sans marqueurs) qui permet de suivre en temps réel des interactions aux interfaces entre un ligand immobilisé sur une surface métallique et un soluté en solution. C'est une technique sensible aux changements d'indice de réfraction résultant de modifications interfaciales qui peut servir à la détermination de l'épaisseur optique de films minces adsorbés sur la surface¹³². Utilisée en mode imagerie, elle permet d'avoir accès à l'homogénéité des dépôts réalisés sur la surface.

Dans le dispositif utilisé, une lame de verre, recouverte sur une de ses faces par une fine couche d'or (épaisseur ≈ 50 nm), est accolée par capillarité sur un prisme de verre ($n_p = 1,714$) à l'aide d'une huile de couplage de même indice, afin de se trouver dans la configuration de Kretschmann (Figure 2.1). Une cellule à circulation (ou cuve) est ensuite accolée à la surface métallique. Les solutions à tester sont ensuite mises à circuler sur la

surface par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique. La cuve utilisée pour les études de RPS possède un volume de 15 μL .

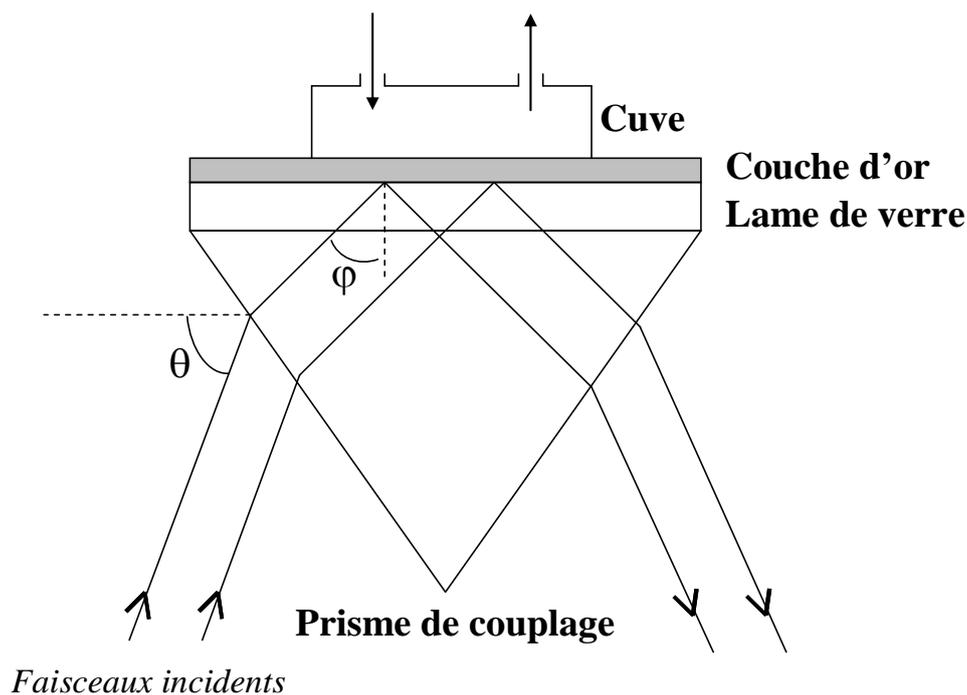


Figure 2.1 : Couplage prisme/lame de verre recouverte d'or/cuve mis en jeu lors des analyses par RPS

2.1.1 Propriétés des plasmons de surface

Le plasmon de surface est une onde électromagnétique qui se propage à l'interface entre deux milieux de constantes diélectriques de signes opposés, notamment un métal et un diélectrique. Cette onde électromagnétique possède une polarisation transverse magnétique (TM) et se propage parallèlement à l'interface métal/milieu diélectrique. D'autre part, elle présente un caractère d'onde évanescente car son amplitude décroît exponentiellement avec la distance à l'interface. De par cette propriété d'onde évanescente, la fixation des molécules sur l'interface va modifier l'information contenue dans l'onde tant au niveau de sa phase que de son amplitude. Ainsi, le suivi de l'évolution de l'onde évanescente en fonction du temps permet de suivre en temps réel des interactions se produisant à l'interface métal/diélectrique. Le caractère évanescent de l'onde plasmon de surface implique que celle-ci se propage sur une distance limitée suivant l'axe des X et l'axe des Z (figure 2.2). Elle est alors caractérisée par sa longueur L_x de propagation sur l'interface et par ses profondeurs L_{Zm} et L_{Zd} de pénétration de part et d'autre de l'interface. La longueur de propagation ainsi que les

profondeurs de pénétration sont définies comme la distance à laquelle l'intensité de l'onde ne vaut plus que 1/e de l'intensité **maximale**. L_x est la longueur de propagation, soit la distance minimale sur laquelle un plasmon se propage. L_{Zm} et L_{Zd} représentent les distances maximales pour lesquelles le champ évanescent est sensible à une variation survenant respectivement dans les milieux métalliques et diélectriques. Au-delà de ces valeurs, l'onde devient insensible aux perturbations du milieu.

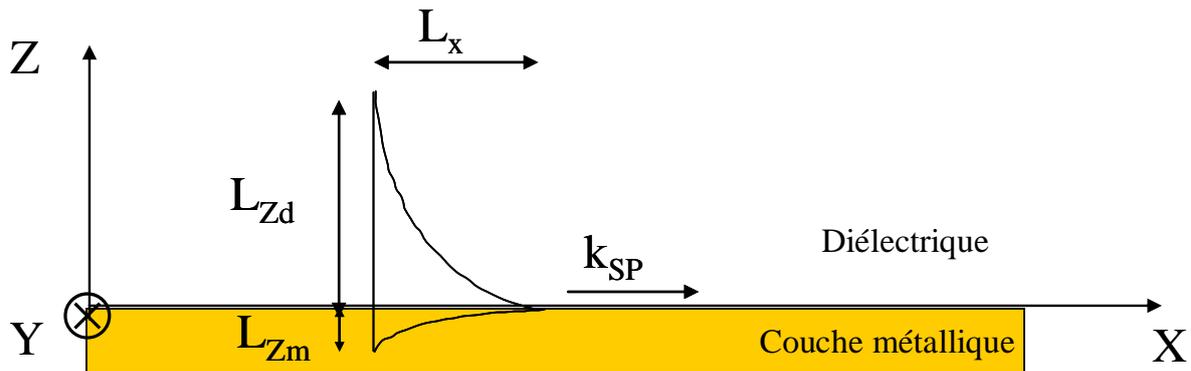


Figure 2.2: Profil de l'amplitude de l'onde plasmon se propageant sur l'interface métal/diélectrique.

Les grandeurs caractéristiques L_x , L_{Zm} et L_{Zd} de l'onde plasmon peuvent être calculées à partir de l'expression de la composante longitudinale $(k_{SP})_x$ du vecteur d'onde de l'onde plasmon de surface^{133, 134}, celle-ci étant définie par l'égalité suivante :

$$(k_{SP})_x = \text{Re} \left\{ \sqrt{\frac{\epsilon_m \cdot \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right\} \cdot \frac{\omega}{c}$$

Equation 2-1

avec ω la fréquence angulaire de l'onde, c la célérité de la lumière dans le vide, ϵ_m (nombre complexe) et ϵ_d les permittivités respectives du métal et du diélectrique. Maillart¹³⁴ a montré que la longueur de pénétration L_{Zd} dans le diélectrique (eau) était égale à 102,1 nm pour une longueur d'onde λ de 660 nm. Ce résultat signifie que la technique utilisée permettra de détecter tout changement se produisant dans le milieu diélectrique à moins de 100 nm de l'interface.

2.1.2 Excitation des plasmons de surface à l'aide d'un couplage par prisme

Les plasmons de surface peuvent être excités par l'intermédiaire d'un faisceau lumineux dirigé sur l'interface métal/diélectrique si deux conditions sont respectées (i) l'onde excitatrice doit être de polarisation TM et (ii) la vitesse de phase de l'onde excitatrice doit être égale à celle de l'onde de surface, autrement dit, la composante longitudinale (k_x) du vecteur d'onde incident doit être égale à la composante longitudinale $(k_{SP})_x$ du vecteur d'onde de l'onde de surface.

La composante longitudinale du vecteur d'onde incident (k_x) est définie par la relation suivante :

$$k_x = \frac{\omega}{c} \cdot \sin(\varphi)$$

Equation 2-2

avec ω la fréquence angulaire de l'onde, c la célérité de la lumière dans le vide et φ l'angle d'incidence du faisceau lumineux sur l'interface métal/diélectrique.

Lorsqu'un faisceau lumineux incident est dirigé directement sur une interface métal/diélectrique, la valeur k_x est inférieure à la valeur de $(k_{SP})_x$ et les plasmons de surface ne peuvent être excités. Afin de parvenir à la relation d'accord de phase $k_x = (k_{SP})_x$, il est alors nécessaire d'augmenter la valeur de k_x . Ceci peut être réalisé en faisant passer le faisceau incident à travers un prisme d'indice de réfraction n_p supérieur à celui du milieu diélectrique.

Le couplage d'une onde lumineuse aux ondes électromagnétiques de surface par l'intermédiaire d'un prisme peut être effectué suivant la configuration d'Otto¹³⁵ ou de Kretschmann¹³⁶. La configuration de Kretschmann est plus simple à mettre en œuvre et consiste à coupler directement le prisme au métal (Figure 2.3). Les études de RPS présentées par la suite ont été effectuées suivant ce procédé.

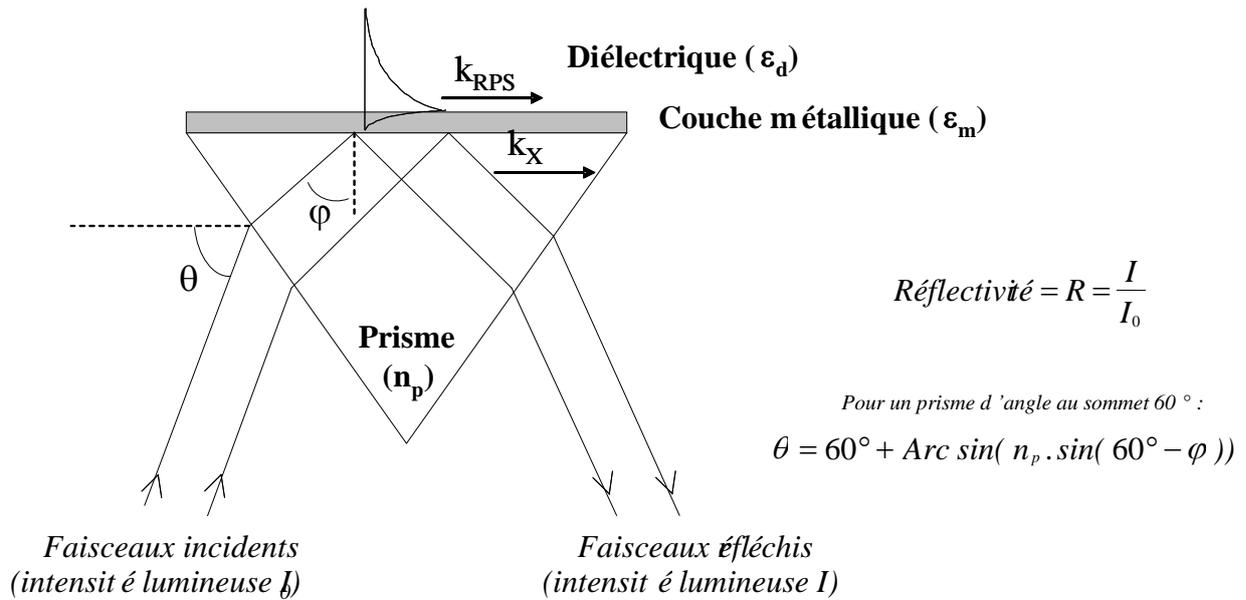


Figure 2.3 : Excitation des plasmons de surface au travers d'un prisme en verre d'indice n_p recouvert d'une couche mince métallique de permittivité ϵ_m (configuration de Kretschmann).

Dans la configuration de Kretschmann, un faisceau lumineux de polarisation TM est dirigé, au travers du prisme, vers l'interface métal/diélectrique avec un angle d'incidence interne φ tel que la réflexion du faisceau soit totale. La composante longitudinale initiale du faisceau lumineux est amplifiée par son parcours dans le prisme et sa nouvelle valeur est donnée par :

$$k_x = n_p \cdot \frac{\omega}{c} \cdot \sin(\varphi)$$

Equation 2-3

avec n_p l'indice de réfraction du prisme.

Pour un angle d'incidence donné, noté φ_0 , la condition d'accord de phase $k_x = (k_{SP})_x$ est vérifiée et peut, à partir des Equation 2-1 et Equation 2-3, être traduite par l'égalité suivante :

$$n_p \cdot \sin(\varphi_0) = \text{Re} \left\{ \sqrt{\frac{\epsilon_m \cdot \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right\}$$

Equation 2-1

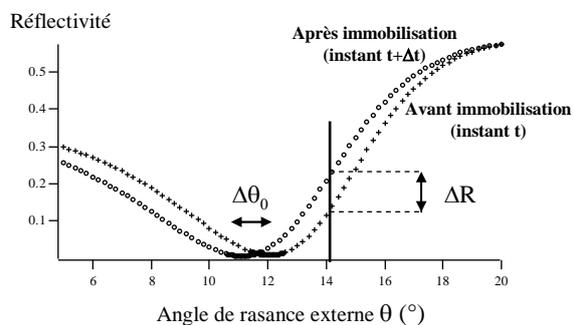
Lorsque la condition d'accord de phase est respectée, l'énergie électromagnétique du faisceau incident est transmise aux plasmons de surface. On parle de résonance des plasmons de surface. Ce phénomène s'accompagne d'une extinction du faisceau réfléchi ($I=0$) ce qui entraîne l'annulation de la réflectivité ($R = \frac{I}{I_0} = 0$). Théoriquement, la résonance des plasmons de surface peut être mise en évidence par l'établissement de la courbe de réflectivité (R) en fonction de l'angle d'incidence (φ). Cette courbe présente alors un pic d'absorption pour la valeur de $\varphi = \varphi_0$. Pour des raisons pratiques, l'angle mesuré expérimentalement est l'angle de rasance externe θ . Les courbes de réflectivité tracées expérimentalement reportent donc la réflectivité (R) en fonction de l'angle de rasance externe (θ) et ces courbes présentent un pic d'absorption pour la valeur de θ_0 correspondant à l'angle φ_0 .

2.1.3 Mesure de l'épaisseur d'une couche mince par RPS

Les courbes de réflectivité (Figure 2.4) présentent un minimum pour la valeur de l'angle de rasance externe θ_0 correspondant à l'angle φ_0 auquel se produit le phénomène de résonance des plasmons de surface. D'après l'Equation 2-4, la valeur de φ_0 est fonction des permittivités du métal (ε_m) et du diélectrique (ε_d) ainsi que de l'indice du prisme (n_p). Autrement dit, φ_0 dépend des indices de réfraction de la couche métallique (n_m), du diélectrique (n_d) et du prisme (n_p).

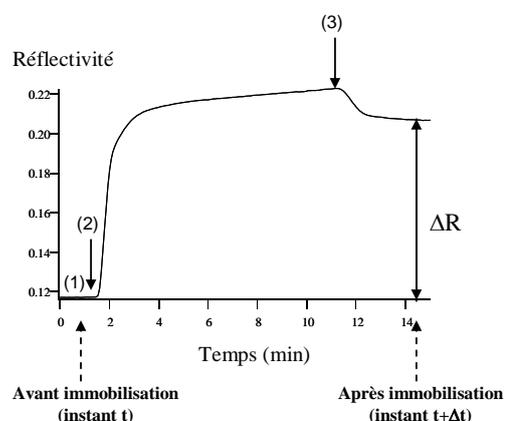
L'immobilisation de molécules sur la surface métallique entraîne une augmentation de l'indice de réfraction n_d du diélectrique¹³⁷ et par suite un déplacement de l'angle de plasmons de surface φ_0 vers les valeurs plus élevées (Cf. Equation 2-4). D'après l'équation donnée sur la Figure 2.3, la valeur de θ_0 tend alors à diminuer (Figure 2.4-a).

Courbe de réflectivité



(a)

Cinétique de fixation



(b)

Figure 2.4 : (a) Courbes plasmons en fonction de l'angle de rasance externe θ , avant (croix) et après (rond) immobilisation de molécules sur une surface d'or et (b) cinétique de fixation au cours du temps obtenue à incidence fixe, (1) : la surface est équilibrée dans une solution donnée (eau, tampon), (2) la solution de réactifs est mise à circuler sur la surface, (3) : la surface est rincée avec la solution initiale utilisée dans la première étape (eau, tampon)

D'après la Figure 2.4-a, il apparaît que si l'on se place à un angle θ fixe dans le domaine linéaire de la courbe de réflectivité (partie droite de la courbe), l'immobilisation de molécules à la surface entraîne une augmentation de la réflectivité. Ainsi, le suivi de la réflectivité en fonction du temps permet d'observer en temps réel les modifications de l'état de surface. L'établissement d'une telle courbe, appelée cinétique de fixation, se décompose en trois étapes (Figure 2.4-b). La surface est tout d'abord équilibrée dans une solution donnée (eau, tampon) (1^{ère} étape), puis la solution de réactifs est mise à circuler sur la surface (2^{ème} étape), ce qui entraîne une augmentation de la réflectivité. Cette variation de réflectivité est due d'une part à la fixation du réactif sur la surface et d'autre part à l'indice de réfraction de la solution introduite dans la cuve. La dernière étape consiste à rincer la surface avec la solution initiale utilisée dans la première étape (eau, tampon) (3^{ème} étape) afin d'éliminer la variation de réflectivité liée à l'indice de réfraction de la solution de réactifs présente dans la cuve. Cette dernière étape se traduit par une diminution de la réflectivité. La variation de réflectivité ΔR obtenue dans ces conditions est uniquement liée à la fixation du réactif sur la surface.

En pratique, la variation d'indice du milieu diélectrique ne fait que décaler angulairement la courbe plasmon sans changer sa forme. Le coefficient de conversion, utilisé dans le logiciel SPRI-1000, permet de convertir la variation de réflectivité liée à ce décalage en taux de recouvrement surfacique. Il suffit donc de faire le lien entre la variation de réflectivité et la variation angulaire pour pouvoir calculer le taux de recouvrement surfacique.

Le programme SPRI-View enregistre les courbes plasmons ainsi que ses dérivées (en %/°). La valeur de ces pentes à l'angle de travail choisi correspond donc au coefficient liant le décalage angulaire d'une courbe à la variation de réflectivité en cinétique. Cette valeur vaut environ 26 %. On obtient ainsi Γ en pg/mm^2 .

Une fois, la variation angulaire mesurée après fonctionnalisation de la surface, on calcule le taux de recouvrement expérimental Γ s'effectue suivant la formule suivante :

$$\Gamma (\text{pg}/\text{mm}^2) = 5600 * \Delta\theta (\%)$$

Par ailleurs la conversion théorique de la variation angulaire en taux de recouvrement surfacique Γ à 660nm peut aussi être réalisée, sachant que $\Delta\theta = S_{P,\theta} * (n - n_d)$ avec $S_{P,\theta}$ la sensibilité angulaire, n_d l'indice du milieu diélectrique couvrant et que $\Delta R = S_{P,R} * (n - n_d)$ avec $S_{P,R}$ la sensibilité en réflectivité, il est aisé de remplacer les variations de réflectivité par des variations de la position angulaire du minimum de réflectivité.

$$\text{D'où } \frac{\Delta\theta}{S_{P,\theta}} = \frac{\Delta R}{S_{P,R}}$$

$$\Gamma = \frac{\Delta\theta \cdot L_{zd}}{S_{P,\theta} \cdot \delta n / \delta C}$$

$$\text{avec } S_{P,\theta} = \frac{d\theta}{dn_c} = \text{Re} \left\{ \left(\frac{\epsilon_m^{3/2}}{\epsilon_m + n_c^2} \right) \right\} / \sqrt{n_p^2 - N_{SPR}^2} \quad (\text{thèse Emmanuel Maillart,}$$

Développement d'un système optique d'imagerie en résonance de plasmons de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel, 2004, I.2.5.1., page 53)

avec $\Delta\theta$ la variation angulaire mesurée en radians

$$L_{zd} = 1,02 \cdot 10^{-4} \text{ mm}$$

$$\delta n / \delta C = 1,9 \cdot 10^{-10} \text{ mm}^3 / \text{pg}$$

$$S_{P,\theta} = 4215 \text{ (valeur obtenue par calcul)}$$

$$\text{On obtient ainsi } \Gamma (\text{pg}/\text{mm}^2) = 7300 * \Delta\theta (\text{°})$$

Le taux de recouvrement molaire $\Gamma_{molaire}$ en biomolécule pourra ensuite être déterminé à partir de l'égalité $\Gamma_{molaire} = \frac{\Gamma_{massique}}{M}$, avec M la masse molaire de l'espèce considérée. Les valeurs de concentrations molaires reportées dans la littérature sont généralement de l'ordre de la picomole à la femtomole par millimètre carré¹³⁸.

2.1.4 Imagerie par résonance des plasmons de surface par imagerie (SPRi) et méthodologie

Lorsqu'une interaction moléculaire se produit à la surface de l'or, celle-ci engendre une perturbation locale de l'indice du milieu diélectrique ce qui conduit à une modification des conditions de la résonance. L'utilisation de l'imagerie RPS permet de suivre en parallèle les perturbations du milieu diélectrique en différents points repérés sur la surface. Pour ce faire, la variation de la réflectivité, due au déplacement du pic d'absorption de la RPS, est suivie sur différents points repérés sur la surface, l'angle d'incidence et la longueur d'onde étant par ailleurs maintenus constants. Le paramètre mesuré est donc la variation de réflectivité ΔR . Les valeurs de la réflectivité R variant entre 0 et 1, une variation de réflectivité ΔR de 0,01 par exemple est considérée comme une variation de 1 %, les mesures seront toujours effectuées dans un solvant de référence.

Le montage optique utilisé pour l'imagerie est donné sur la Figure 2.5.

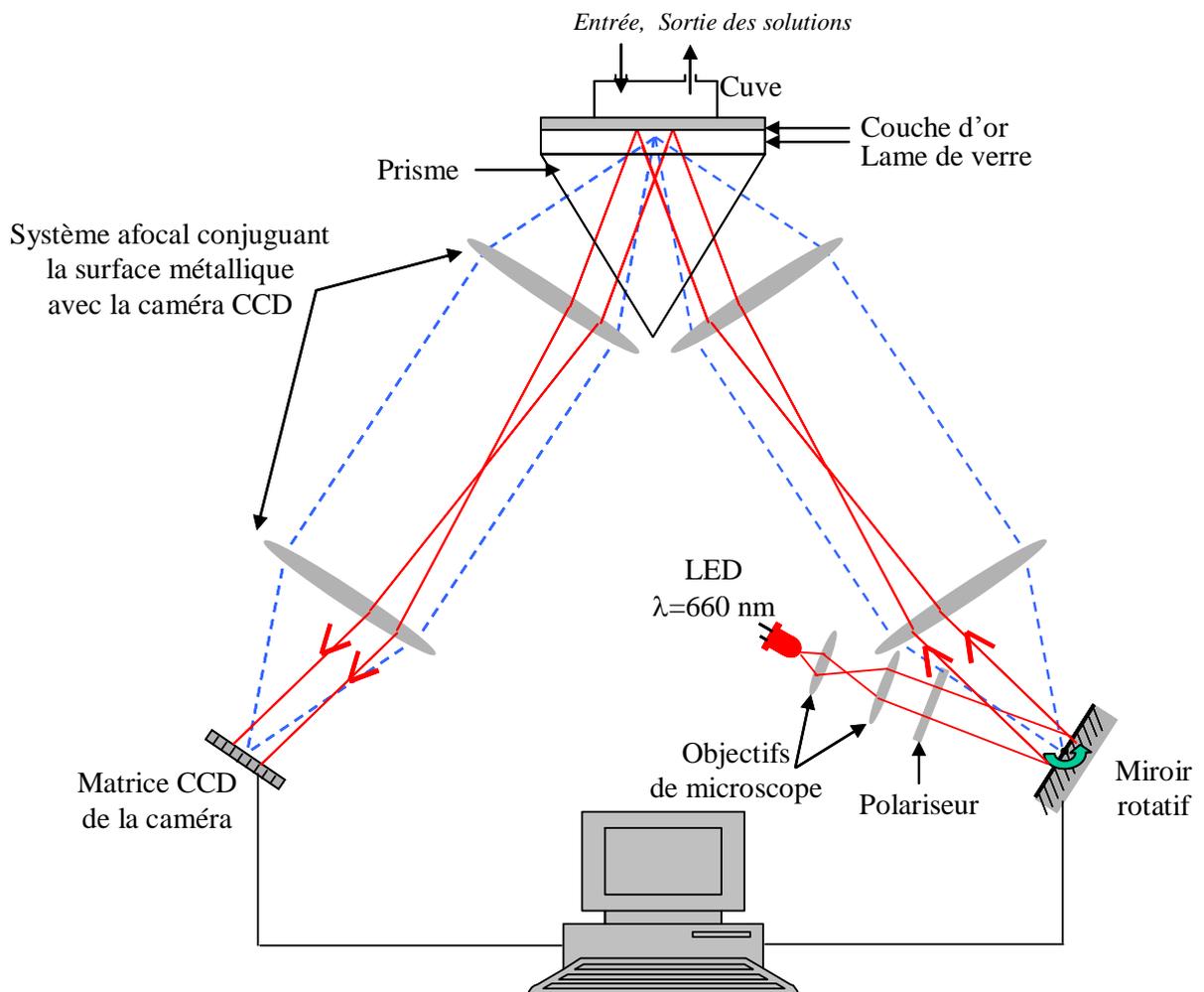


Figure 2.5 : Biocapteur basé sur l'imagerie SPR : schéma du montage optique.

Une diode électroluminescente (LED) de longueur d'onde centrée à $\lambda = 660 \text{ nm}$ (largueur spectrale $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$) éclaire la surface d'or fonctionnalisée en contact avec la cellule d'interaction. Le faisceau incident est de polarisation TM et l'angle d'incidence du faisceau est contrôlé par un système de miroir rotatif. La lumière réfléchie à la base du prisme est ensuite dirigée vers une caméra CCD à l'aide d'un système optique, ce qui permet d'imager la surface métallique fonctionnalisée sur la caméra. Le signal électronique est alors transmis à l'ordinateur puis analysé par un programme SPRIVIEW commercialisé par la société Génoptics.

La position et la dimension des différentes zones étudiées sur la surface d'or, appelées « plots », sont définies manuellement à l'aide du logiciel SPRIVIEW. Ce

programme enregistre pour les différents plots mémorisés chacune des images prises par la caméra CCD au cours d'une analyse et calcule en temps réel, la variation du signal observé. Dans le cas où une réaction se produit au niveau d'un plot, l'indice du milieu diélectrique et l'angle auquel se produit la résonance des plasmons de surface sont modifiés. Ainsi, l'intensité lumineuse réfléchie par ce plot varie et cette variation est enregistrée par l'ordinateur.

Dans la suite de l'étude, l'immobilisation des réactifs sur la lame d'or sera étudiée sur l'ensemble de la surface en suivant la cinétique de fixation sur une cinquantaine de plots virtuels, de forme circulaire et de diamètre 52 pixels, sélectionnés sur une zone de dimensions 25 mm². Chaque plot sera affecté d'un numéro suivant l'ordre défini sur la Figure 2.6.

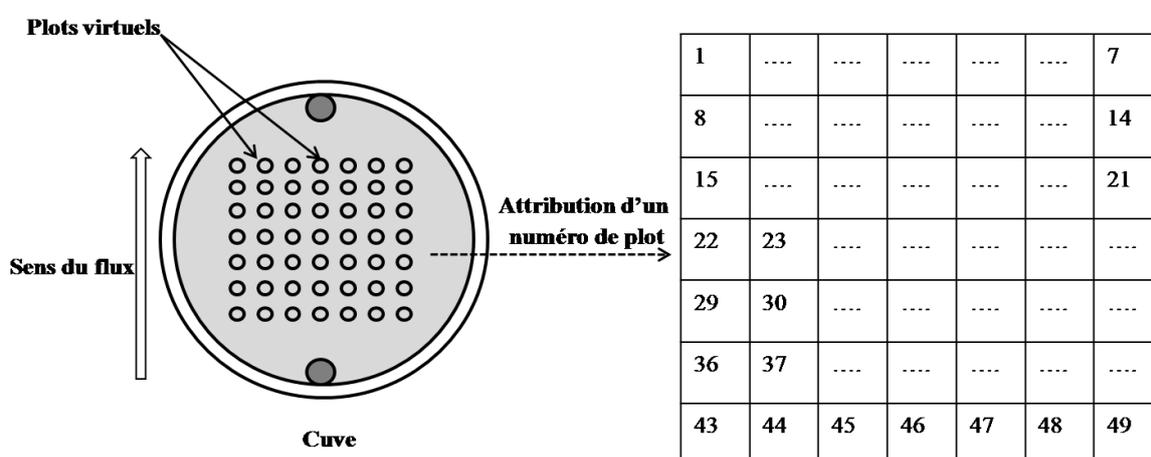


Figure 2.6 : Sélection de 49 plots virtuels (de diamètre 52 pixels sur une surface de dimensions 5mm×5mm) dispersés sur l'ensemble de la surface d'interaction

2.1.5 Modélisation des courbes plasmons de surface

Une fois les mesures effectuées, les courbes plasmons obtenues sur ces 49 plots sont récupérées. Un histogramme réalisé à partir des valeurs de la variation du minimum angulaire ou de la réflectivité de ces courbes permet d'avoir une idée de l'homogénéité de la surface à l'étape « nue » puis après chaque modification de celle-ci. Par la suite, la moyenne de ces mesures est effectuée à chaque étape de fonctionnalisation. La modélisation de cette courbe moyenne permet d'accéder à une épaisseur optique de la couche déposée sur la surface. Pour ce faire, le logiciel Winspall de l'Institut Max Planck a été utilisé. Ce logiciel

travaille avec un modèle multicouche similaire à ce qui est réalisé sur la surface d'or (Figure 2.7).

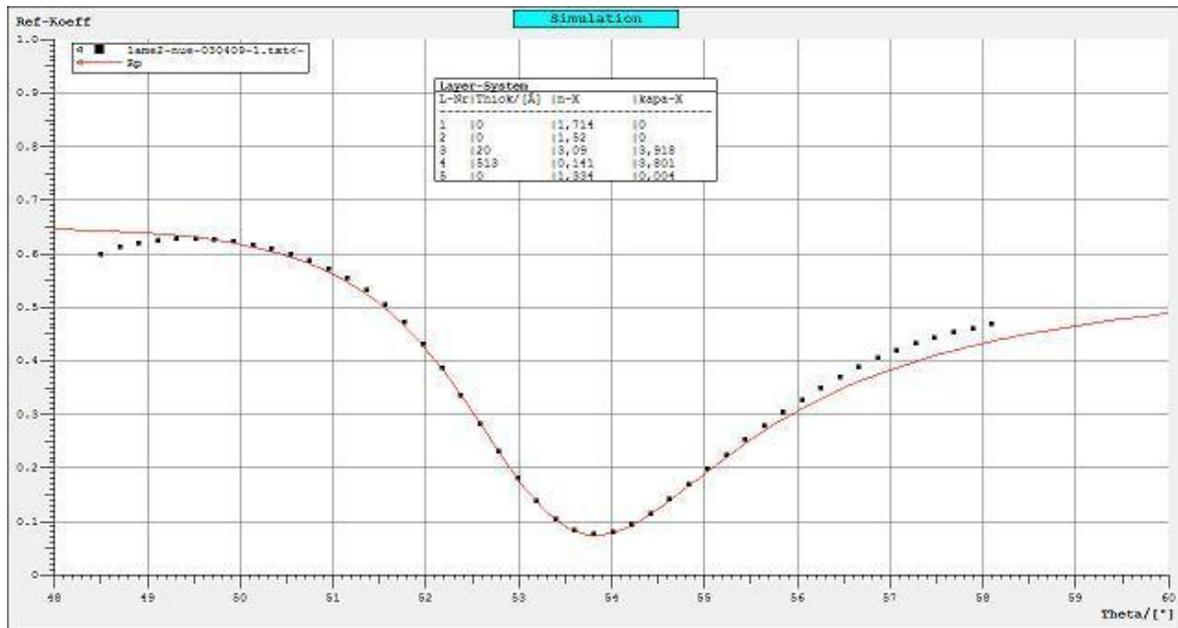


Figure 2.7 : Illustration d'une fenêtre de modélisation du logiciel Winspall d'une lame d'or « nue », trait en pointillés : courbe expérimentale, trait plein : courbe modélisée.

Les quatre premières couches correspondent à l'assemblage prisme et or « nu », dont les paramètres fixes sont connus, notamment :

- La couche **1** correspond au prisme dont l'indice est de 1,714
- La couche **2** correspond à la lamelle associée à l'huile dont l'indice est de 1,52
- La couche **3** correspond à celle du chrome dont l'épaisseur varie entre 10 et 20 Å et dont l'indice complexe est de $3,09 + 3,918*i$
- La couche **4** correspond à celle de l'or dont l'épaisseur varie entre 500 et 520 Å et dont l'indice complexe est de $0,14 + 3,801*i$.

Les couches suivantes qui peuvent être soit l'eau, le PBS, le polymère ou encore la protéine dont les indices sont connus sont ajoutées en fonction de la couche déposée. La dernière couche du modèle correspond toujours à celle de notre milieu de travail, eau, PBS ou encore éthanol.

Dans l'exemple qui suit, la modélisation de la couche de cystéamine fixée sur la surface de l'or est montrée. Pour cela, la couche **5** correspond à l'épaisseur de cystéamine dont on veut déterminer l'épaisseur optique, l'indice utilisé est de 1,44. La couche **6** correspond au milieu de travail qui est le PBS dont l'indice est de 1,334. Après modélisation l'épaisseur de la couche cystéamine déterminée est de 1,4 nm (Figure 2.8).

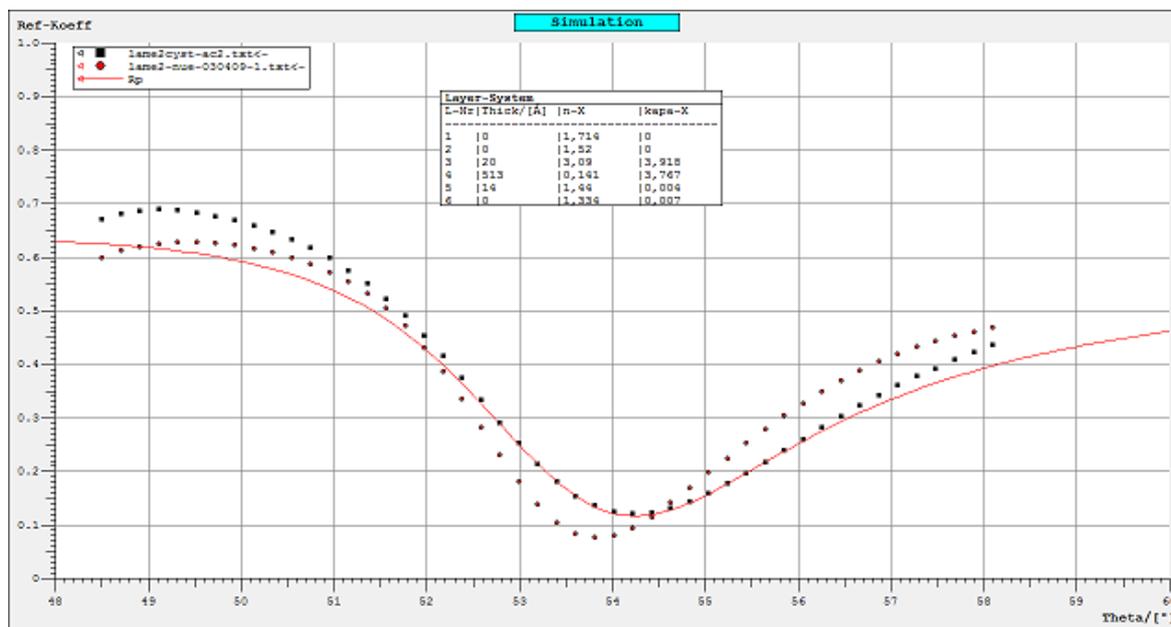


Figure 2.8 : Illustration d'une fenêtre de modélisation du logiciel Winspall d'une lame d'or avant et après fonctionnalisation par la cystéamine.

La RPS a été l'outil de caractérisation principal utilisé dans ce travail, cependant d'autres techniques telles que la spectrométrie photoélectronique (XPS) et le PM-IRRAS nous ont été utiles pour accéder à des informations supplémentaires sur l'état de la surface après chaque modification.

2.2 La spectrométrie photoélectronique X (XPS)

La spectrométrie photoélectronique X (XPS) ou ESCA (« Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) est un outil important pour la caractérisation chimique de la surface de matériaux solides (métaux, polymères, céramiques ...).

Le principe de la technique XPS consiste à obtenir des informations sur l'état et l'environnement d'un atome en mesurant avec précision l'énergie de ses niveaux électroniques par détection des photoélectrons issus d'un bombardement des rayons X. La

détermination précise des énergies des niveaux électroniques se fait par l'utilisation de l'effet photoélectrique et la mesure de l'énergie cinétique E_{cin} des électrons émis.

La conservation de l'énergie dans le cas d'un atome libre s'écrit comme suit :

$$h\nu = E_{cin} + E_{liaison}$$

avec,

E_{cin} l'énergie cinétique de l'électron éjecté et caractéristique de l'élément analysé.

$E_{liaison}$ l'énergie de liaison de l'électron équivalente au travail de sortie.

Parmi les autres techniques d'analyse de surface, la XPS est considérée comme étant la plus quantitative, la plus facilement interprétable et celle qui donne le plus d'informations concernant la composition chimique du matériau. Elle permet la caractérisation des films polymères sur une profondeur pouvant atteindre 20 nm.

De plus, elle présente l'avantage d'être peu destructive, sensible et apporte une analyse totale des éléments sauf pour l'hydrogène et l'hélium. Les informations contenues dans un spectre XPS sont nombreuses, elles vont de l'analyse élémentaire simple, aux détails des déplacements chimiques et de la nature des liaisons chimiques dans la surface analysée, jusqu'aux structures de relaxation qui apportent plus de détails sur la nature de l'échantillon.

2.3 Le PM-IRRAS

Cette spectroscopie infrarouge s'est particulièrement développée ces dernières années grâce notamment à l'utilisation de spectromètres infrarouge à transformée de Fourier. Par exemple, la spectroscopie IRRAS (InfraRed Reflexion-Absorption Spectroscopy) est devenue une technique très utilisée pour l'étude de films minces sur substrat métallique. L'anisotropie et l'exaltation du champ électrique créées à la surface d'un métal sont exploitées pour tirer des informations sur l'orientation des molécules à la surface. Cependant, cette méthode ne permet pas de discriminer les absorptions surfaciques des absorptions volumiques. Il est donc nécessaire de normaliser le spectre de l'échantillon par le spectre du substrat seul afin de faire ressortir les absorptions dues uniquement au film. L'enregistrement non simultané des deux spectres introduit des fluctuations inévitables du montage optique et de l'environnement qui affectent la qualité du spectre IRRAS. Cet inconvénient rend alors difficile la détection des absorptions de films ultra-minces (d'épaisseur inférieure à 10 nm) déposés sur une surface à cause de leurs signaux trop

faibles. Pour pallier ces inconvénients, des techniques différentielles sont apparues comme la spectroscopie PM-IRRAS (Polarization Modulation-InfraRed Reflexion Absorption Spectroscopy).

La spectroscopie PM-IRRAS combine les trois techniques suivantes :

- la réflectivité en lumière polarisée et sous incidence quasi-rasante (IRRAS),
- la modulation rapide de la polarisation du faisceau incident entre les polarisations linéaires p (dans le plan d'incidence) et s (normale au plan d'incidence),
- le filtrage, la démodulation et le traitement mathématique de l'intensité détectée, afin d'obtenir les signaux ($R_p - R_s$) et ($R_p + R_s$), puis le signal de réflectivité différentielle normalisé :

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s}$$

Cette spectroscopie permet d'obtenir des spectres normalisés en temps réel où seules les absorptions de surface sont détectées.

Conclusions

Dans ce chapitre, il a été présenté les différentes techniques d'analyse de surface utilisées dans notre étude. Ces techniques se complètent par les informations auxquelles elles nous permettent d'accéder. La RPS nous permet d'accéder à la quantité de biomolécules fixées sur les films minces de polymères et de remonter après modélisation à l'épaisseur du film mince de polymère. Tandis que la XPS et la spectroscopie PM-IRRAS nous renseignent sur la chimie de surface et l'organisation du film polymère sur la surface d'or.

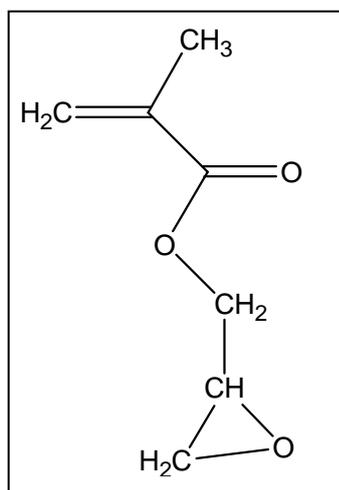
CHAPITRE 3

ELABORATION D'INTERFACES IMMUNORECEPTRICES A BASE DE FILMS MINCES DE POLY (METHACRYLATE DE GLYCIDYLE) GREFFES SUR DES SUBSTRATS D'OR ET FONCTIONNALISES PAR L'ALBUMINE DE SERUM BOVIN.

Sommaire

3.A Immobilisation de films minces de P(GMA) sur des surfaces d'or par différentes techniques de greffage.	63
3.A.1 Immobilisation de films minces de P(GMA) sur des surfaces d'or par la méthode du « <i>grafting onto</i> » : greffage de polymères préformés.....	64
3.A.1.1 Chimisorption de la cystéamine.....	64
3.A.1.2 Variation de l'épaisseur du film de P(GMA) en fonction de la masse molaire moyenne en nombre du P(GMA) préformé.....	67
3.A.1.3 Mise en évidence de la fonctionnalisation des films de P(GMA) préparés par <i>grafting onto</i> par le greffage de l'octylamine.	70
3.A.2 Immobilisation de films minces de poly(GMA) sur des surfaces d'or par la méthode du « <i>grafting from</i> » : polymérisation in-situ.....	74
3.A.2.1 <i>Synthèse in situ de films minces de P(GMA) à partir d'une monocouche vinylique</i>	74
3.A.2.2 <i>Synthèse in situ de films minces de P(GMA) par grafting from à partir d'une surface d'or fonctionnalisée par un amorceur de type AIBN</i>	77
3.A.3 Discussion.....	86
3.B Biofonctionnalisation de films minces de P(GMA) greffés sur des surfaces d'or par l'albumine de sérum bovin et évaluation des propriétés immunoréceptrices.	98
3.B.1 Greffage de la BSA sur des films minces de P(GMA)	99
3.B.1.1 <i>Cas des films minces de P(GMA) préparés par grafting onto.</i>	99
3.B.1.2 <i>Cas des films minces de P(GMA) synthétisés in situ par grafting from.</i>	100
3.B.2 Evaluations des propriétés immunoréceptrices des interfaces à base de films minces de P(GMA) greffés par l'albumine de sérum bovin	102
3.B.2.1 <i>Cas des interfaces immunoréceptrices à base de films minces de P(GMA) préparés par grafting onto</i>	103
3.B.2.2 <i>Cas des interfaces immunoréceptrices à base de films minces de P(GMA) préparés par grafting from à partir d'une couche vinylique</i>	105
3.B.2.3 <i>Cas des interfaces immunoréceptrices à base de films minces de P(GMA) préparés par grafting from à partir d'une couche d'amorceur de type AIBN</i>	106
3.B.3 Discussion	107
Conclusions	110

Dans ce chapitre, une première partie sera consacrée à la formation de films minces de P(GMA) à la surface de l'or par la technique du « grafting onto » et par différentes voies de polymérisation in situ. Les résultats obtenus feront l'objet d'une discussion globale à la fin de cette partie.



Représentation chimique du méthacrylate de glycidyle (GMA).

Dans une deuxième partie, la capacité des différents films de P(GMA) à fixer l'albumine de sérum bovin (BSA) sera évaluée. Il s'agit d'une protéine de masse moléculaire égale à 66 430 g/mol et de point isoélectrique (pI) égal à 4,7. Elle est extraite du sérum bovin. Elle représente environ 60% des protéines plasmatiques. Notre choix a été guidé par sa grande stabilité et son faible coût. L'activité biologique de la BSA sera testée en effectuant des tests de reconnaissance moléculaire avec des anticorps anti-BSA polyclonaux.

3.A Immobilisation de films minces de P(GMA) sur des surfaces d'or par différentes techniques de greffage.

Dans cette partie, sont présentés les résultats expérimentaux obtenus pour l'immobilisation par voie covalente de films de P(GMA) par différentes techniques de greffage sur des substrats d'or. Les techniques de greffage abordées sont celle du « *grafting onto* » qui consiste à greffer un polymère préformé sur une surface présentant une réactivité nucléophile et celles du « *grafting from* » mettant en jeu la polymérisation du méthacrylate de glycidyle à partir d'une surface d'or *via* un photo-amorçage réalisé soit dans la solution de monomère soit à partir de la surface d'or. Dans ces deux derniers cas, la polymérisation

est réalisée in-situ, c'est-à-dire en présence du substrat d'or fonctionnalisé. Les caractéristiques des films de P(GMA), notamment en termes d'épaisseur et de densité de chaînes polymères, seront dans un premier temps présentées en fonction de la technique utilisée puis nous essaierons dans une partie discussion, de comparer les différentes méthodes.

3.A.1 Immobilisation de films minces de P(GMA) sur des surfaces d'or par la méthode du « *grafting onto* » : greffage de polymères préformés.

Ainsi qu'il a été présenté dans le chapitre bibliographie, nous avons testé la technique du « *grafting onto* » pour la fonctionnalisation des surfaces d'or par du P(GMA) préformé. Les échantillons de P(GMA) utilisés ont été synthétisés par photopolymérisation du GMA à 365 nm en utilisant l'AIBN comme amorceur de polymérisation. Les lames d'or sont préalablement fonctionnalisées par une couche de cystéamine qui permettra ensuite l'ancrage du P(GMA) par ouverture des cycles époxyde selon la réaction présentée schématiquement dans la **Figure 3.1**. Dans la suite de ce paragraphe nous allons développer plus amplement les différentes étapes mises en jeu.

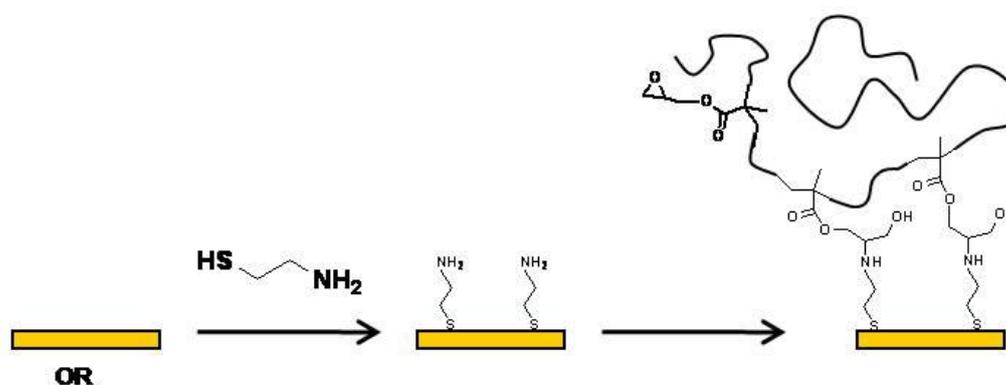


Figure 3.1 : Représentation schématique de la fixation par *grafting onto* de chaînes de P(GMA) sur une lame d'or fonctionnalisée par une couche de cystéamine.

3.A.1.1 Chimisorption de la cystéamine

La chimisorption de la cystéamine sur les lames d'or se fait après un nettoyage minutieux de celles-ci par un mélange d'acide sulfurique et d'eau oxygénée (solution piranha 3/4 d'acide sulfurique et 1/4 d'eau oxygénée), mélange connu pour éliminer les traces de contaminants soufrés à la surface de l'or. Dans un premier temps, la fixation de la cystéamine sur une lame d'or a été suivie par des mesures d'angle de contact afin de

connaître le temps optimum de réaction. Les résultats présentés dans la **Figure 3.2** montrent clairement une forte diminution de la valeur de l'angle de contact mesuré pour une goutte d'eau après 3 heures de fonctionnalisation. Puis, nous observons un plateau au bout de 5 heures de mise en contact. Il semble donc qu'au bout de 5 heures, la fonctionnalisation de la surface d'or par la cystéamine soit optimale. Cependant, pour des raisons de commodité et pour éviter un délai trop long entre les différentes étapes inhérentes à l'élaboration d'un film de P(GMA), les lames d'or ont toujours été mises en contact avec la solution de cystéamine durant 16 heures.

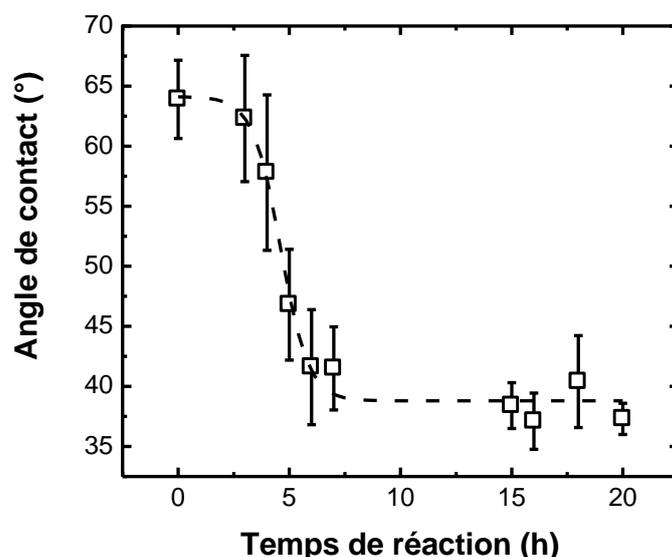


Figure 3.2 : Variation de la valeur de l'angle de contact mesuré pour une goutte d'eau déposée sur une lame d'or modifiée par la cystéamine en fonction du temps de réaction. La fonctionnalisation a été réalisée avec une solution de cystéamine à 0,05 M dans l'acétonitrile. Les résultats présentés sont la moyenne d'au moins trois mesures indépendantes.

Ces mesures d'angle de contact permettent par ailleurs, de démontrer une modification efficace des propriétés interfaciales de la lame d'or par la couche de cystéamine. En effet, la nette différence observée entre les valeurs d'angle de contact qui varient de 63,9° pour l'or nu à 37,3° pour l'or modifié par la cystéamine, traduit un étalement beaucoup plus important de la goutte d'eau dans le cas où la cystéamine est présente à la surface. Cet effet, est clairement démontré par les photographies présentées sur la **Figure 3.3**. Cette modification de l'aspect de la goutte indique que la fixation de la cystéamine à la surface de l'or améliore nettement la mouillabilité du substrat par l'eau.

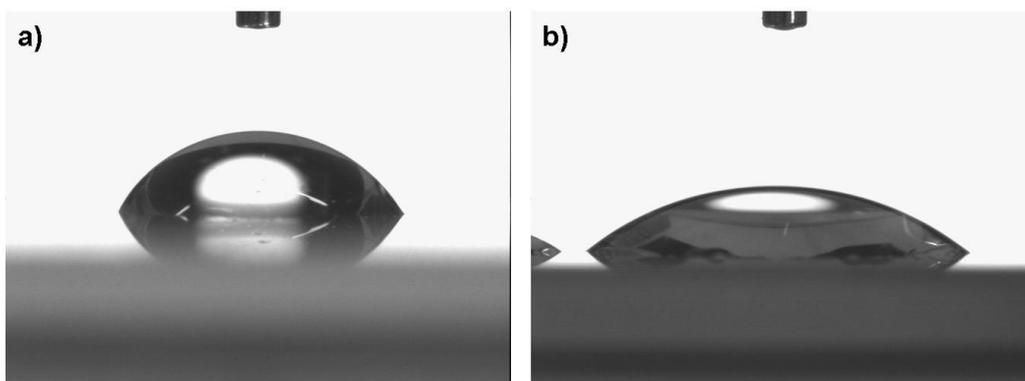


Figure 3.3 : Photographies de gouttes d'eau déposées sur (a) une lame d'or nue et (b) une lame d'or fonctionnalisée par la cystéamine

Nous avons également caractérisé la surface d'or après modification par la cystéamine par des mesures optiques en mode de résonance des plasmons de surface. Comme le montre la **Figure 3.4**, nous pouvons observer un déplacement de la position de l'angle de résonance de plasmon de $0,4^\circ \pm 0,07$ par rapport à la position du minimum de réflectivité observée sur la courbe plasmon moyenne de la surface d'or à l'état nu.

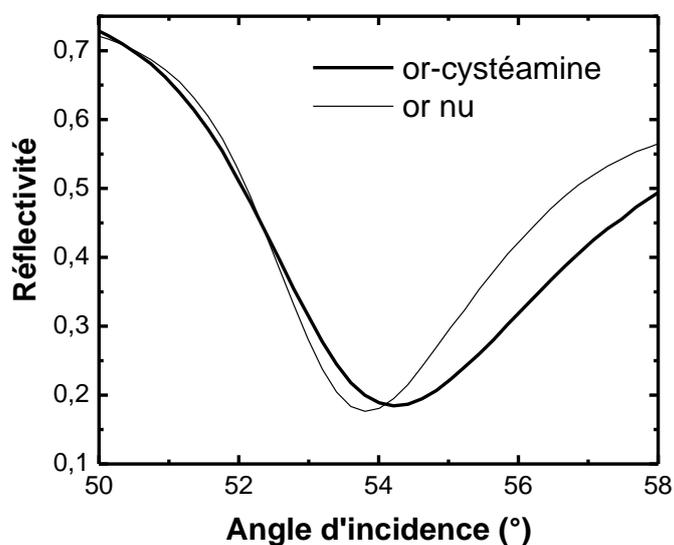


Figure 3.4 : Courbes plasmon mesurées pour une surface d'or nu et une surface d'or modifiée par la cystéamine. La modification de la surface d'or a été réalisée avec une solution de cystéamine à 0,05 M dans l'acétonitrile pendant 16 heures.

Le déplacement de la courbe plasmon s'effectue vers les grandes valeurs d'angle d'incidence, passant de la valeur de $53,8^\circ$ à $54,2^\circ$. Cette variation correspond à une épaisseur

moyenne de la couche de cystéamine de 1,4 nm. Cette valeur a été calculée avec une valeur d'indice pour la couche de cystéamine de 1,44.¹³⁹

3.A.1.2 Variation de l'épaisseur du film de P(GMA) en fonction de la masse molaire moyenne en nombre du P(GMA) préformé

Après fonctionnalisation par la cystéamine, la surface est mise en contact avec une solution de P(GMA) à 3% dans l'acétone durant 45 minutes sous agitation.¹⁴⁰ Une caractérisation de la surface fonctionnalisée par le P(GMA) a été initialement réalisée par PM-IRRAS dans la région de 3750 à 750 cm^{-1} (**Figure 3.5**). Dans cette région, on observe les modes de vibration suivants : la bande d'élongation du groupe carbonyle C=O (autour de 1735 cm^{-1}), les bandes d'élongation des groupes méthylène autour de 2851 cm^{-1} et 2932 cm^{-1} .

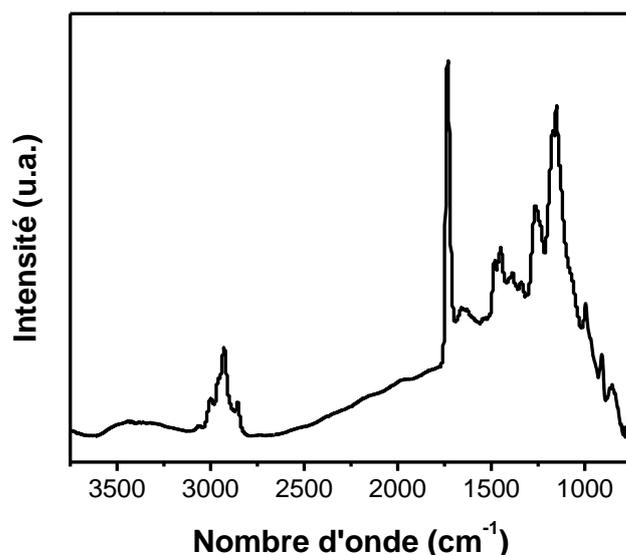


Figure 3.5 : Spectre PM-IRRAS réalisé dans la zone 3750 à 750 cm^{-1} sur une lame fonctionnalisée par du P(GMA) préformé ($M_n = 60\,000\text{ g/mol}$) par la méthode du grafting onto.

Nous avons essentiellement cherché à étudier l'influence de la masse moyenne en nombre M_n des chaînes de P(GMA) sur l'épaisseur du film polymère greffé sur la surface d'or. La M_n des polymères utilisés varie entre 20 000 g/mol et 300 000 g/mol. Cette variation d'un ordre de grandeur de la masse molaire du polymère préformé peut être considérée comme significative et donc comme représentative en partie des variations d'épaisseur des films. Dans chaque cas, l'épaisseur des films polymères a été déterminée

par modélisation des courbes plasmon mesurées après greffage du polymère en milieu aqueux (tampon phosphate).

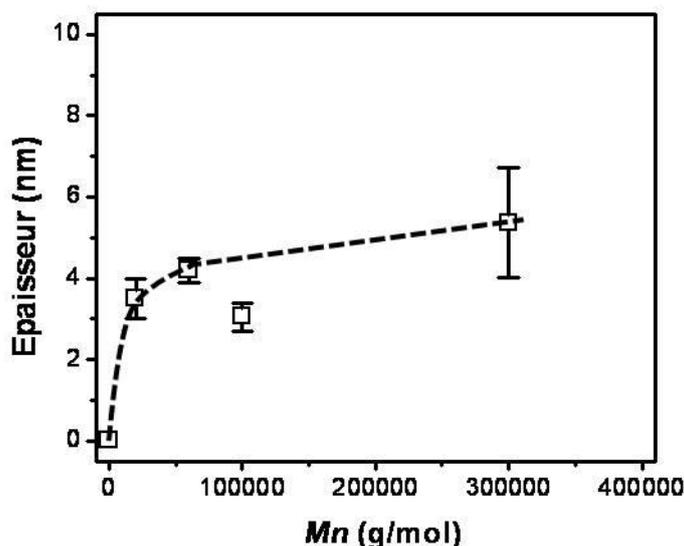


Figure 3.6 : Variation de l'épaisseur du film polymère préparé par grafting onto en fonction de la Mn du P(GMA) préformé. Le tracé en pointillé ne prend pas en compte la valeur d'épaisseur pour la Mn de 100 000 g/mol.

On observe sur la **Figure 3.6**, une légère augmentation de l'épaisseur du film avec la Mn du polymère. En effet pour un polymère de Mn égale à 18 500 g/mol, l'épaisseur est voisine de 3,5 nm alors que pour un polymère de Mn égale à 300 000 g/mol, l'épaisseur atteinte est de 5,4 nm. Cette variation montre donc que l'évolution n'est pas linéaire et qu'il se produit un effet d'infléchissement pour les masses moyennes en nombre élevées.

Par ailleurs, il est possible de calculer la densité de chaînes sur la surface ($\Sigma_{P(GMA)}$ chaînes/nm²) à partir du taux de recouvrement surfacique ($\Gamma_{P(GMA)}$ ng/mm²) du P(GMA), en faisant l'hypothèse que la masse volumique du polymère en masse est identique à celui fixé, grâce à la formule suivante :

$$\Sigma = \frac{\Gamma_{P(GMA)} \times N_a \times 10^{-21}}{M_n} = \frac{6,023 \times \Gamma_{P(GMA)} \times 100}{M_n} \quad \text{eq. (3.1)}$$

avec N_a : le nombre d'Avogadro

M_n : la masse molaire moyenne en nombre du polymère exprimée en g/mol.

Par la suite, Σ est exprimé en chaînes/nm² et Γ est exprimé en ng/mm²

Pour un film mince homogène, la valeur de Γ peut facilement être déterminée à partir de l'équation ci-dessous :

$$\Gamma = ep \times \rho \quad \text{eq (3.2)}$$

avec ep : l'épaisseur du film polymère de P(GMA) exprimée en nm.

ρ : la masse volumique du P(GMA) greffé à la surface en g/cm^{-3} .

Pour la valeur de ρ nous avons choisi d'utiliser la valeur de la masse volumique du poly (méthacrylate de propyle)¹⁴⁰ égale à $1,08\text{g/cm}^{-3}$.

Une comparaison quantitative des grandeurs caractéristiques de l'épaisseur des films de P(GMA) greffé est donnée dans le **Tableau 3.1**. D'après l'équation (3.2) nous voyons qu'il y a une relation directe entre l'épaisseur du film et le recouvrement surfacique alors que la valeur représentative de la densité de chaînes greffées est dépendante de la Mn du P(GMA). Nous pouvons noter que le recouvrement surfacique augmente avec la masse molaire du P(GMA). Par contre, une évolution différente est observée pour la densité des chaînes de P(GMA) greffé.

Mn (g/mol)	ep (nm)	$\Gamma_{(PGMA)}$ (ng/mm ²)	$\Sigma_{(PGMA)}$ (chaînes/nm ²)
18 500	3,5	3,8	0,12
60 000	4,7	5,1	0,05
100 000	3,1	3,3	0,02
300 000	5,4	5,8	0,01

Tableau 3.1 : Effet de la Mn des chaînes de P(GMA) préformé sur les caractéristiques des films de P(GMA) immobilisés sur une surface d'or par la méthode « *grafting onto* ».

D'une manière générale, nous constatons une diminution de la densité de chaînes par unité de surface lorsque la masse molaire moyenne en nombre du polymère augmente. La gamme des densités de chaînes de P(GMA) par unité de surface que nous trouvons est en accord avec celle rapportée par Zdyrko et al.¹⁴¹. Les auteurs ont obtenu pour une épaisseur de film de poly(GMA) de 1,5 nm et de 2,5 nm des densités de chaînes comprises entre 0,01 chaînes/nm² et 0,02 chaînes/nm².

3.A.1.3 Mise en évidence de la fonctionnalisation des films de P(GMA) préparés par *grafting onto* par le greffage de l'octylamine.

Les résultats montrés ci-dessus indiquent que la densité surfacique des chaînes polymères est moins importante lorsque la M_n du P(GMA) augmente. Pour la préparation d'immunocapteurs par la méthode du *grafting onto*, les fonctions époxyde ont un double rôle. Dans un premier temps elles doivent permettre le greffage du P(GMA) sur une surface aminée et dans un deuxième temps, elles doivent permettre le greffage de l'albumine. Il est donc important de vérifier que l'ensemble des fonctions époxyde initialement présentes dans les chaînes de P(GMA) n'ont pas réagi avec la surface d'or modifiée par la cystéamine et donc que les polymères greffés présentent toujours une réactivité vis-à-vis de molécules nucléophiles. Il est utile de préciser ici que la situation est différente dans le cas des méthodes de préparation par polymérisation in-situ. En effet, les fonctions époxyde restent intactes durant le processus de polymérisation par voie radicalaire et sont donc disponibles, si accessibles, pour le greffage post-polymérisation.

Afin donc de mettre en évidence mais également d'évaluer la réactivité des films de P(GMA) en fonction de la M_n du polymère utilisé, nous avons choisi de greffer de l'octylamine sur les différents films précédemment préparés à partir de P(GMA) de M_n comprise entre 60 000 et 300 000 g/mol et de suivre la réaction par des mesures optiques en mode de résonance de plasmon de surface. Pour cela, les lames fonctionnalisées par le P(GMA) sont mises en contact avec une solution d'octylamine à 1 M dans l'acétonitrile. Les lames sont ensuite retirées à intervalles réguliers, rincées à l'acétonitrile, puis à l'éthanol.

Dans un premier temps, le greffage efficace de l'octylamine a été mis en évidence par une analyse qualitative des spectres PM-IRRAS obtenus pour les différents films. A titre d'exemple représentatif, le spectre enregistré pour un film de P(GMA) modifié et préparé avec le polymère de $M_n = 100\ 000$ g/mol est donné dans la **Figure 3.7** Nous observons clairement les modes de vibration suivants : la bande d'élongation du groupe carbonyle C=O autour de 1730 cm^{-1} , la bande d'élongation de l'amine secondaire à 3260 cm^{-1} , les vibrations d'élongation de la liaison C-H entre 2960 cm^{-1} et 2850 cm^{-1} , la vibration de déformation de l'amine à 1620 cm^{-1} .

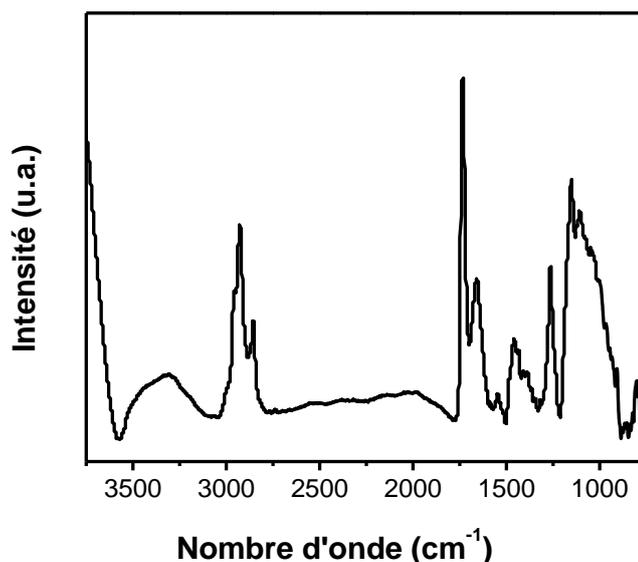


Figure 3.7 : Spectre PM-IRRAS réalisé dans la zone 3750 à 750 cm^{-1} sur un film de P(GMA) préparé par grafting onto ($M_n = 100\,000$ g/mol) et fonctionnalisé par de l'octylamine (1M dans l'acétonitrile).

Des mesures SPR sont également réalisées afin d'estimer le déplacement de la courbe plasmon en fonction du temps de réaction. Lorsque la position de l'angle plasmon de résonance ne varie plus, nous admettons que la fonctionnalisation du film de P(GMA) par l'octylamine est maximale. L'octylamine a été choisie car elle a une masse molaire ($M = 129\text{g/mol}$) équivalente à celle du GMA ($M = 142\text{g/mol}$) et de plus, elle est disponible commercialement. Le mécanisme de greffage de l'octylamine sur les films de P(GMA) repose sur la réaction entre la fonction amine primaire terminale portée par l'amine aliphatique et les fonctions époxyde portées par les groupes latéraux des chaînes de P(GMA). Selon le schéma réactionnel présenté dans la **Figure 3.8**, il apparaît que si l'on considère une fonction époxyde, c'est-à-dire une unité monomère de GMA, le greffage d'une molécule d'octylamine conduit à un adduit de masse molaire égale à 271 g/mol. Dans le cas d'un film de P(GMA) l'augmentation de l'épaisseur optique doit être proportionnelle à la variation de la masse. C'est-à-dire que pour un film de P(GMA) d'épaisseur optique donnée et supposée égale à e_1 , et dans l'hypothèse que toutes les fonctions époxyde présentes dans le film de P(GMA) sont disponibles pour réagir avec l'octylamine, l'épaisseur optique calculée dans le cas d'une réaction totale sera égale à e_2 avec $e_2 = e_1 + 0,91 \times e_1$.

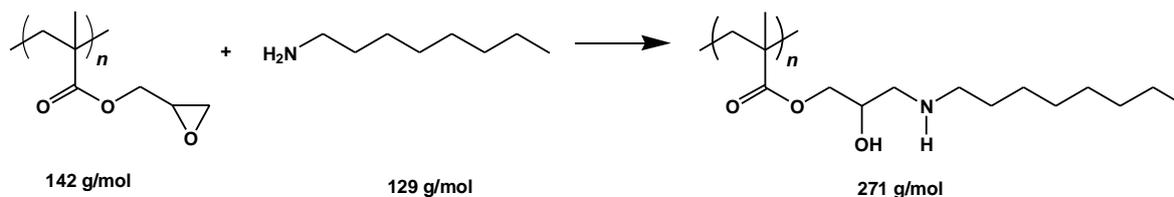


Figure 3.8 : Schéma de la réaction entre les fonctions époxyde pendantes du P(GMA) et l'octylamine. L'addition d'une molécule d'octylamine par unité époxyde conduit à une augmentation de la masse molaire de l'unité monomère de 91%.

Par la suite une analyse quantitative du greffage a été réalisée par des mesures optiques en mode de résonance des plasmons de surface (**Tableau 3.2**).

Mn (g/mol)	épaisseur optique d'octylamine (nm)	$\Delta\epsilon_p$ (%)
60 000	1,6	41
100 000	1,9	60
300 000	3,8	70

Tableau 3.2 : Influence de la masse molaire moyenne en nombre du polymère utilisé pour préparer des films minces de P(GMA) par la méthode du grafting onto sur la variation de l'épaisseur du film après greffage de l'octylamine. L'épaisseur de la couche d'octylamine est également indiquée. Les valeurs indiquées correspondent à un temps réaction de 60 minutes.

Il apparaît d'après les tracés présentés dans la **Figure 3.9** pour trois films de P(GMA) que l'épaisseur maximale est déjà atteinte après 30 minutes de greffage de l'octylamine. En effet, au-delà de ce temps de réaction on n'observe plus de variation de la position de l'angle de résonance dans la courbe plasmon ce qui signifie que l'épaisseur ne varie plus. Par ailleurs, la variation d'épaisseur calculée après plus de 30 minutes de réaction est différente pour les trois films mais dans tous les cas elle est inférieure à la valeur théorique de 91% considérée comme maximale dans l'hypothèse que tous les cycles oxirane ont réagi.

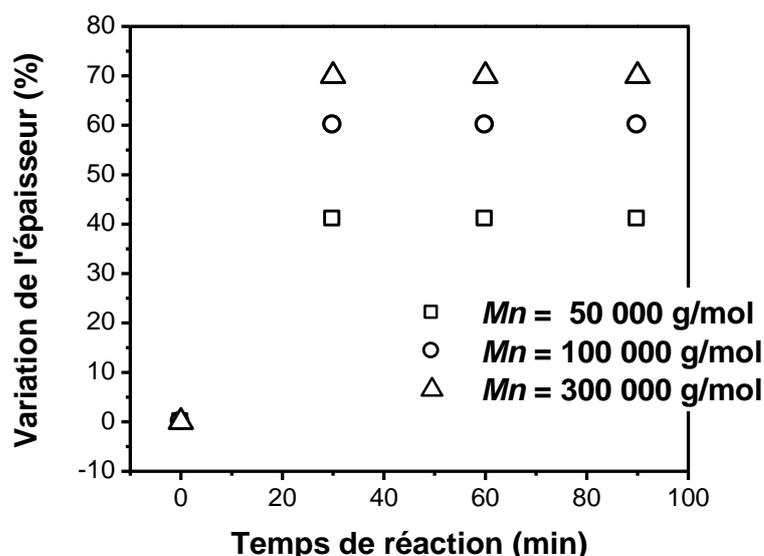


Figure 3.9 : Effet du temps de réaction entre un film de P(GMA) greffé sur une surface d'or par la méthode du grafting onto et l'octylamine sur la variation de l'épaisseur du film de P(GMA) exprimée en pourcentage.

Le maximum de greffage mesuré pour le film de P(GMA) préparé avec le polymère de $M_n = 300\,000\text{ g/mol}$ correspond à une augmentation de l'épaisseur du film de 70 %. Comme l'indiquent les valeurs reportées dans le **Tableau 3.2**, l'augmentation de l'épaisseur du film est plus faible lorsque la masse molaire du P(GMA) greffé diminue. En effet, on observe des augmentations d'épaisseur de 60 et 41% pour des films élaborés à partir de P(GMA) de M_n égales 100 000 et 60 000 g/mol. Il semble donc que la capacité de greffage de films minces de P(GMA) vis-à-vis de l'octylamine en milieu organique augmente lorsque la densité surfacique des chaînes greffées à la surface diminue (**Tableau 3.1**). On peut expliquer ces résultats par la contribution des fonctions époxyde du P(GMA) pour l'ancrage covalent du polymère sur la surface d'or mais aussi par l'inaccessibilité éventuelle de certaines fonctions époxyde du fait des repliements des chaînes polymères à la surface (**Figure 3.10**). Seules les fonctions époxyde présentes dans les boucles sont disponibles pour la réaction avec l'octylamine¹⁴². La différence de taux de greffage entre le P(GMA) de $M_n = 60\,000\text{ g/mol}$ et ceux de 100 000 g/mol et de 300 000 g/mol respectivement suggère un étalement plus important du polymère de faible masse molaire sur la surface générant de ce fait plus de points d'ancrage. A la différence, les polymères de M_n élevées seraient plus sous forme de larges boucles apportant ainsi plus de fonctions époxyde disponibles.

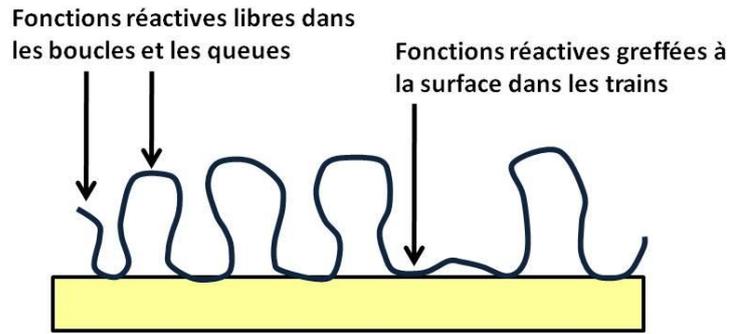


Figure 3.10 : Représentation schématique de la conformation d'une chaîne polymère réactive greffée sur une surface par « *grafting onto* ». ¹⁴¹

Il est bien évident que l'accessibilité des fonctions époxyde, notamment de celles présentes à l'intérieur du film de P(GMA) est également un paramètre influençant la capacité de greffage.

3.A.2 Immobilisation de films minces de poly(GMA) sur des surfaces d'or par la méthode du « *grafting from* » : polymérisation in-situ

3.A.2.1 Synthèse in situ de films minces de P(GMA) à partir d'une monocouche vinylique

Pour cette méthode, la préparation de la monocouche vinylique se fait en deux étapes. Dans un premier temps, une surface d'or est fonctionnalisée par des fonctions amine par chimisorption de la cystéamine selon le protocole décrit précédemment (**Figure 3.1**). Ensuite, le greffage d'unités vinyliques est effectué par mise en contact avec une solution de chlorure d'acryloyle dans le dioxane (50/50 en volume) pendant 45 minutes. Comme le montre schématiquement la **Figure 3.11**, le greffage covalent des groupements polymérisables s'effectue *via* la création d'une fonction amide. Après réaction, la lame d'or est minutieusement rincée au dioxane puis à l'éthanol. Une fois, la couche vinylique réalisée, des doubles liaisons sont disponibles sur les surfaces et la polymérisation peut être amorcée en présence du GMA et d'un amorceur de polymérisation radicalaire dissous dans le monomère.

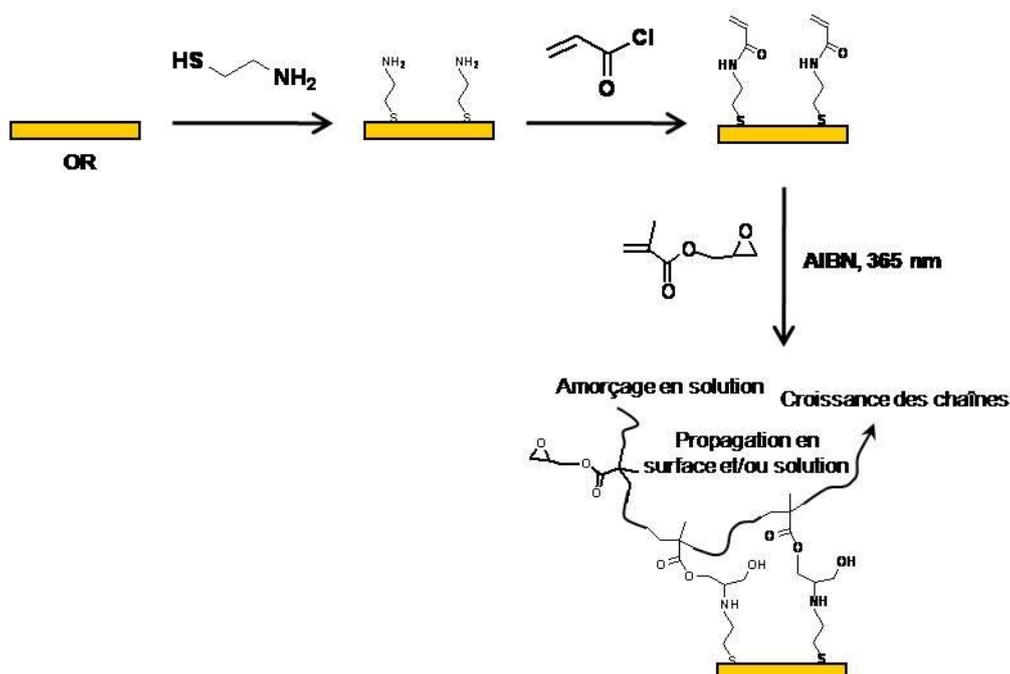


Figure 3.11 : Représentation schématique de la fixation par grafting from de films minces de P(GMA) via la photopolymérisation in situ du GMA à partir d'une lame d'or fonctionnalisée par une couche vinylique. Dans la figure seul l'amorçage en solution est indiqué car la quantité de monomère greffé en surface est inférieure à la quantité de monomère présent dans le milieu réactionnel ce qui, selon nous, favorise fortement l'amorçage en solution. Toutefois l'amorçage en surface est également possible.

Les lames, une fois fonctionnalisées par la monocouche vinylique, sont mises dans du GMA contenant de l'AIBN (1% en masse par rapport au monomère). La photopolymérisation est ensuite amorcée en solution et/ou en surface par irradiation à une longueur d'onde de 365 nm. En effet, il peut y avoir création de radicaux à partir de monomères en solution ou greffés sur la surface d'or vinylisée, de telle sorte que l'amorçage en solution et en surface soient concomitants¹⁴³. Toutefois, la quantité plus importante de monomère dans le milieu réactionnel doit favoriser l'amorçage en solution. Après polymérisation, les lames sont lavées au soxhlet pour enlever toutes les chaînes polymères immobilisées sur la surface de façon non covalente et enchevêtrées au sein du film polymère greffé. La cinétique de polymérisation a été suivie jusqu'à un temps de polymérisation de 900 secondes (**Figure 3.12**).

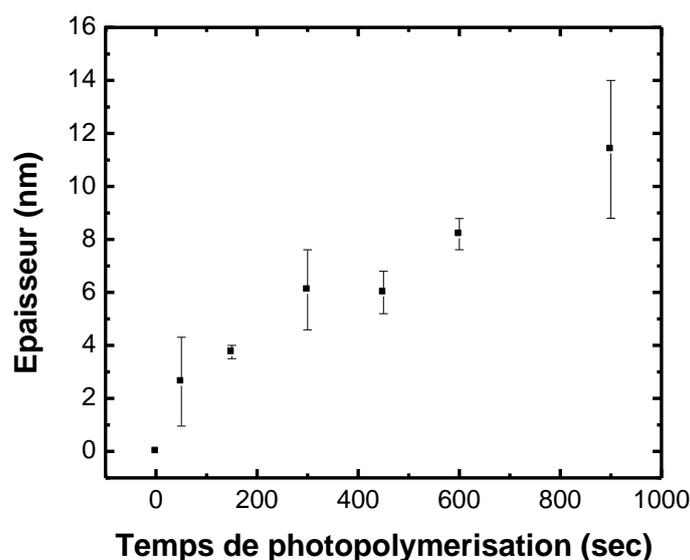


Figure 3.12 : Cinétique de photopolymérisation du GMA en masse par « grafting from » à partir d'une surface d'or fonctionnalisée par une couche vinylique.

Globalement, on remarque une augmentation de l'épaisseur optique du film polymère en fonction du temps de polymérisation. L'épaisseur varie en moyenne de 2,6 nm pour un temps d'irradiation de 50 secondes à 11 nm pour un temps de polymérisation de 900 secondes. Les polymères obtenus en solution ont été caractérisés par chromatographie d'exclusion stérique afin de déterminer leur masse molaire. Il apparaît que les M_n des polymères varient peu et qu'elles sont comprises dans une gamme entre 50 000 et 80 000 g/mol (**Tableau 3.3**). Un indice de polymolécularité voisin de 2, typique d'une polymérisation radicalaire classique a été déterminé pour les différents temps de polymérisation. En faisant l'hypothèse que la M_n du polymère formé en solution est similaire à celle du polymère greffé à la surface¹⁴³, il est possible de calculer la densité de chaînes de P(GMA) sur la surface (**Tableau 3.3**).

Temps de polymérisation (sec)	Mn (g/mol)	ep (nm)	$\Gamma_{(PGMA)}$ (ng/mm ²)	$\Sigma_{(PGMA)}$ (chaînes/nm ²)
150	59 000	3,7	4,05	0,04
300	83 100	6,2	6,7	0,05
600	71 900	8,2	8,9	0,07
900	86 000	11,4	12,3	0,08

Tableau 3.3 : Effet du temps de photopolymérisation sur les caractéristiques des films de P(GMA) immobilisés sur une surface d'or fonctionnalisée par une couche vinylique par la méthode « grafting from ».

Cette étude a montré qu'il était possible d'obtenir des films polymères d'épaisseur de l'ordre de 10 nm au bout d'un temps court de photo-irradiation. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Bialik et al.¹⁴³. Dans leur étude, les films polymères sont formés par une activation thermique de la polymérisation avec comme amorceur l'AIBN et ils ont obtenu une épaisseur maximale de 15 nm.

3.A.2.2 Synthèse in situ de films minces de P(GMA) par grafting from à partir d'une surface d'or fonctionnalisée par un amorceur de type AIBN

3.A.2.2.1 Synthèse et caractérisation spectroscopique de l'amorceur

Des études précédentes ont démontré qu'il était possible d'amorcer la polymérisation du polystyrène par voie photochimique à partir d'une monocouche auto-assemblée de type alcane-thiol^{66, 144-146}. Pour cela, il est très important de retirer l'oxygène du milieu réactionnel. Dans cette partie, nous présenterons la synthèse du 4,4'-azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle) qui est un amorceur de type AIBN capable de s'adsorber à la surface de l'or. Cette synthèse a été décrite dans le travail de Schmidt et al.⁶⁶, leur protocole a été donc suivi pour l'élaboration de celui-ci (**Figure 3.13**). Le rendement de la synthèse est de 41 %.

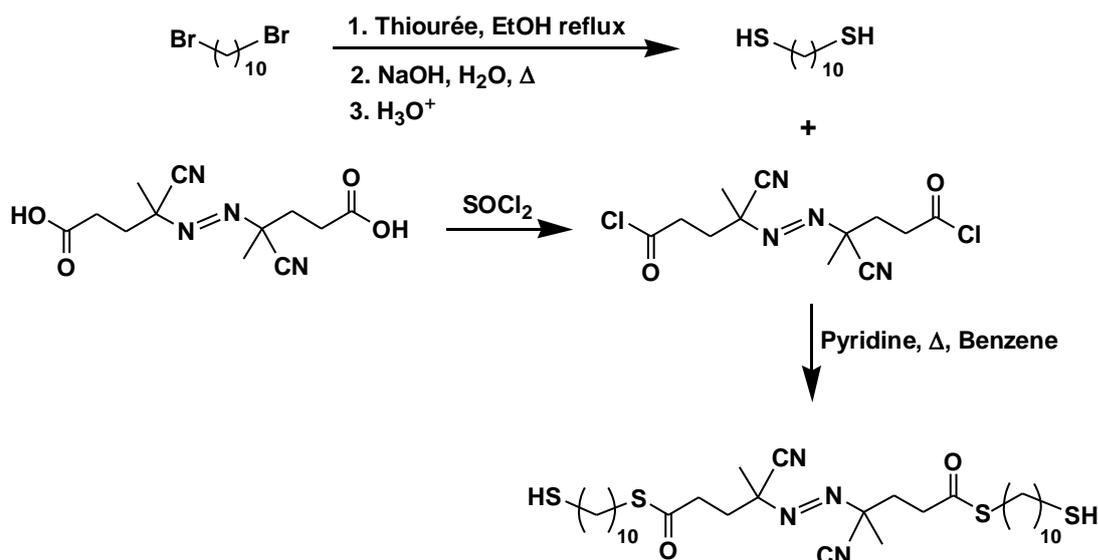


Figure 3.13 : Schéma de synthèse du 4,4'azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle).

Le produit synthétisé a été caractérisé par RMN ^{13}C (Figure 3.14). Le déplacement chimique de la fonction thioester S-C=O est de 196,8 ppm. On peut retrouver le déplacement chimique de la fonction nitrile à 117,4 ppm. Le signal des CH₂ liés à la fonction thiol se situe à 33 ppm.

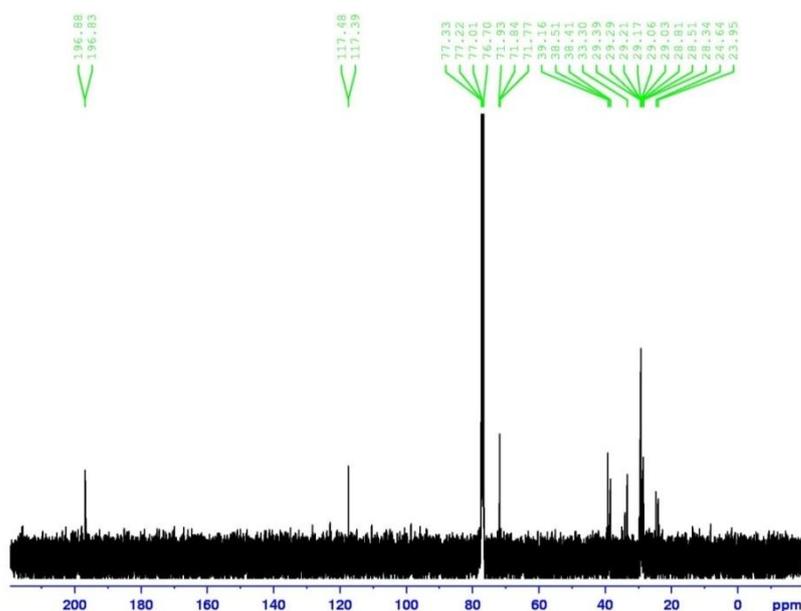


Figure 3.14 : Spectre RMN ^{13}C du 4,4'azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle)

L'amorceur a aussi été caractérisé par ATR-FTIR (Figure 3.15), technique qui sera utilisée, après fonctionnalisation des lames d'or pour vérifier que l'amorceur est bien fixé à

la surface. Les bandes situées à 2924 et 2852 cm^{-1} sont attribuées aux bandes de valence des fonctions méthylène de la chaîne thioalkylée, celle de la fonction CN est visible dans la zone 2250-2240 cm^{-1} . On retrouve la bande de valence de la fonction C=O à 1690 cm^{-1} .

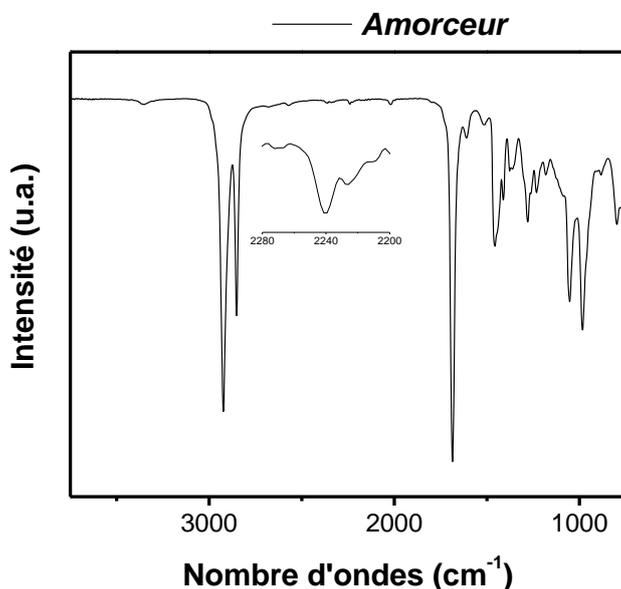


Figure 3.15 : Spectre ATR-FTIR du 4,4'azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle). Le zoom de la zone 2280-2200 cm^{-1} permet de mettre en évidence la bande caractéristique de la fonction CN.

3.A.2.2.2 Fonctionnalisation d'une surface d'or par l'amorceur 4,4'azobis-4 cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle).

Les lames d'or sont fonctionnalisées par immersion dans une solution d'amorceur dans l'éthanol absolu afin que l'auto-assemblage de la monocouche soit établi. Les lames sont ensuite caractérisées par ATR-FTIR afin de vérifier la fixation de l'amorceur sur la surface (**Figure 3.16**).

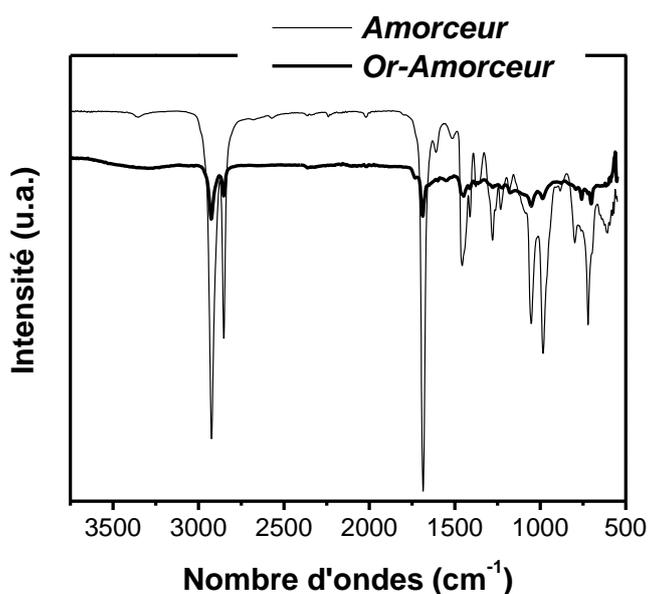


Figure 3.16 : Spectres ATR-FTIR (trait fin) du 4,4'azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle) et (trait épais) d'une lame d'or fonctionnalisée par l'amorceur. Le spectre du 4,4'azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle) correspond à celui de la Figure 3.15 et il est donné pour simplifier la comparaison.

Le spectre ATR-FTIR mesuré pour la surface d'or fonctionnalisée par le 4,4'azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle) présente les bandes de vibration caractéristiques des fonctions méthylène à 2924 et 2852 cm^{-1} de la chaîne thioalkylée, ainsi que la bande de vibration de la fonction C=O à 1690 cm^{-1} démontrant ainsi la présence d'amorceur sur la surface. La présence de bandes entre 950 et 500 cm^{-1} prouve l'existence de liens covalents entre les molécules de 4,4'azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle) et la surface d'or.¹⁴⁷ Cependant l'obtention de bandes de vibration des fonctions méthylène à 2924 et 2852 cm^{-1} indiquent que l'état de notre monocouche n'est pas parfaitement ordonné. En effet, lorsque la monocouche est fortement ordonnée, les bandes de vibration des fonctions méthylène sont de l'ordre de 2918 et 2850 cm^{-1} .¹⁴⁸

Il est aussi important de noter que le 4,4'azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle) comporte deux fonctions thiol terminales. Il peut donc présenter deux structures en surface, soit une forme étendue, soit une forme repliée. La forme étendue aura un thiol terminal à l'interface air surface ce qui n'est pas le cas de la forme repliée pour laquelle les deux thiols sont liés à la surface d'or.

Les mesures d'angle de contact effectuées avec de l'eau ont révélé une valeur de 64° (**Figure 3.17**). Cette valeur est identique à celle mesurée avec une lame d'or nu. Même si elle ne permet pas de confirmer directement la fixation par chimisorption de l'amorceur elle est d'une part en accord avec les valeurs d'angle de contact statique généralement mesurées pour des monocouches portant une fonction thiol terminale^{149, 150} et correspond également parfaitement à la valeur mesurée par Schmidt et al.⁶⁶



Figure 3.17 : Photographie d'une goutte d'eau déposée sur une surface d'or fonctionnalisée par une monocouche de 4,4'-azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle).

Pour quelques lames d'or fonctionnalisées pourtant dans les mêmes conditions, nous avons obtenu une valeur d'angle de contact plus élevée de 84° suggérant une surface plus hydrophobe et donc une conformation différente des molécules d'amorceur à la surface d'or. Dans tous les cas les valeurs mesurées sont similaires sur toute la surface d'or fonctionnalisée.

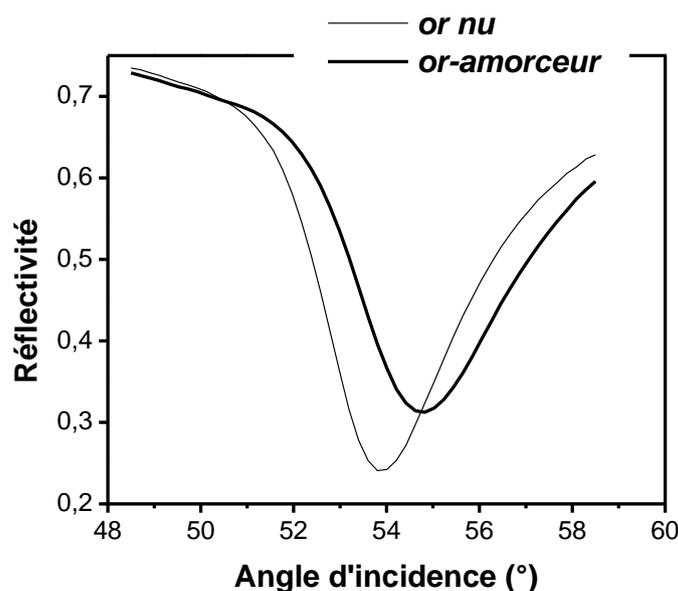


Figure 3.18 : Comparaison des courbes plasmon mesurées avant (trait fin) et après (trait épais) chimisorption de l'amorceur. La variation de la position de l'angle de résonance de plasmon confirme la formation d'une couche de 4,4'azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle).

En outre, les mesures plasmon de la surface avant et après fonctionnalisation par l'amorceur montrent bien un décalage du minimum de l'angle plasmon qui passe de 53,80° à 54,8° (Figure 3.18). En prenant les mêmes paramètres de modélisation que ceux utilisés pour la couche de cystéamine, l'épaisseur optique de la couche de 4,4'azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle) est estimé à 3,6 nm. Cette valeur est proche de la longueur de 4 nm déterminée pour la molécule en conformation étendue⁶⁶.

3.A.2.2.3 Photopolymérisation du GMA à partir de la surface de lames d'or fonctionnalisées par le 4,4'azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle).

L'étude cinétique de la polymérisation, la caractérisation des surfaces obtenues ainsi que l'influence de la concentration en GMA dans le milieu réactionnel sont abordées dans cette partie. Les lames après fonctionnalisation par l'amorceur sont mises en contact avec le monomère pur ou en solution et sont irradiées à 312 nm, durant le temps choisi, sous atmosphère d'azote.

Procédé en solution

Les lames fonctionnalisées par l'amorçeur sont mises en contact avec la solution de monomère et ensuite irradiées à une longueur d'onde de 312 nm durant 30 minutes. La polymérisation a été effectuée dans le dioxane et nous avons fait varier la masse du monomère GMA de 0,75 g à 4,5 g dissous dans un volume constant (10 mL) de dioxane (**Figure 3.19**).

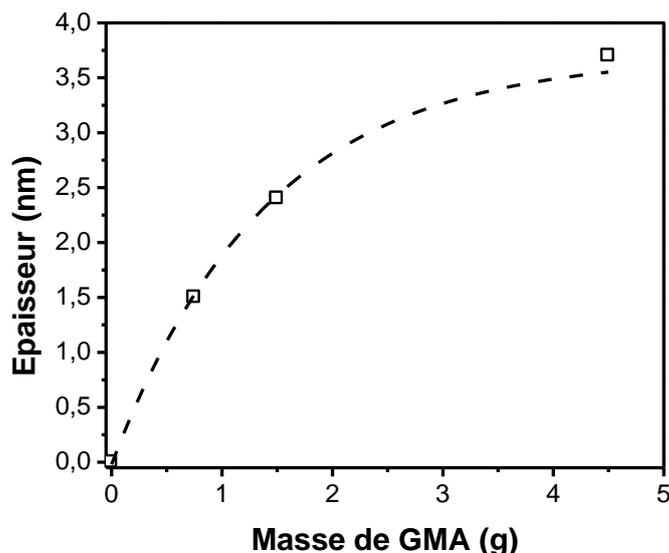


Figure 3.19 : Variation de l'épaisseur de films de P(GMA) préparés par grafting from à partir d'une lame d'or fonctionnalisée par le 4,4'azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle) en fonction de la masse de GMA dans le mélange initial. La photopolymérisation est réalisée en solution dans le dioxane avec un temps de photo-irradiation de 1800 s.

L'épaisseur optique des films a été déterminée par une modélisation des courbes plasmon en suivant la variation du minimum du plasmon. Les épaisseurs optiques égales à 1,5 nm et 3,7 nm sont calculées pour des concentrations de 0,5 mol/L et 3 mol/L en GMA. Les masses moyennes en nombre du polymère formé en solution varient respectivement de 140 000 g/mol à 240 000 g/mol.

Procédé en masse

Les résultats obtenus pour l'étude de la cinétique de polymérisation du GMA en masse à partir de lames fonctionnalisées par l'amorçeur sont présentés dans la **Figure 3.20**. Les résultats sont comparés avec ceux obtenus en solution.

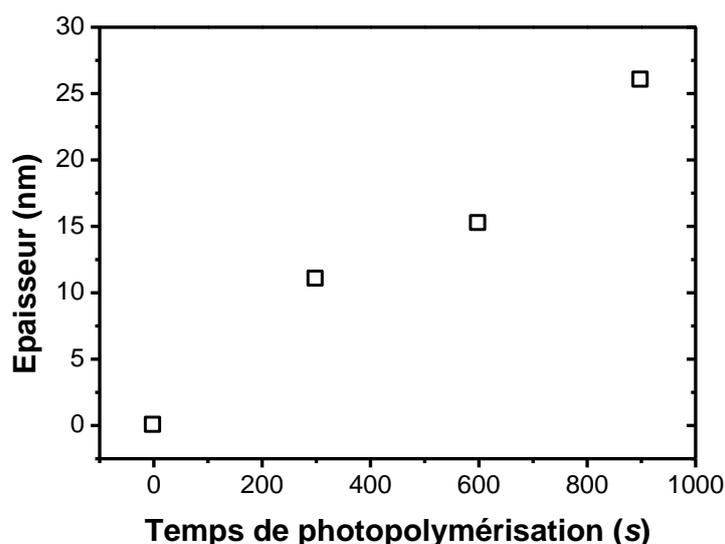


Figure 3.20 : Variation de l'épaisseur de films minces de P(GMA) préparés par grafting from à partir d'une lame d'or fonctionnalisée par le 4,4'azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle) en fonction du temps de photopolymérisation. La photopolymérisation est réalisée dans le monomère pur.

On constate une augmentation de l'épaisseur du film de P(GMA) avec le temps de polymérisation avec une épaisseur de 26 nm au bout de 15 minutes d'irradiation. Les caractérisations par ATR-FTIR des lames d'or avant et après photopolymérisation ont également confirmé la croissance du P(GMA) à partir de la surface fonctionnalisée par le 4,4'azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle). Sur la **Figure 3.21**, on peut noter l'apparition d'un signal à 1735 cm^{-1} , bande de valence de la fonction ester C=O du P(GMA), ainsi que les signaux caractéristiques de la fonction époxyde aux alentours de $950\text{-}900\text{ cm}^{-1}$.

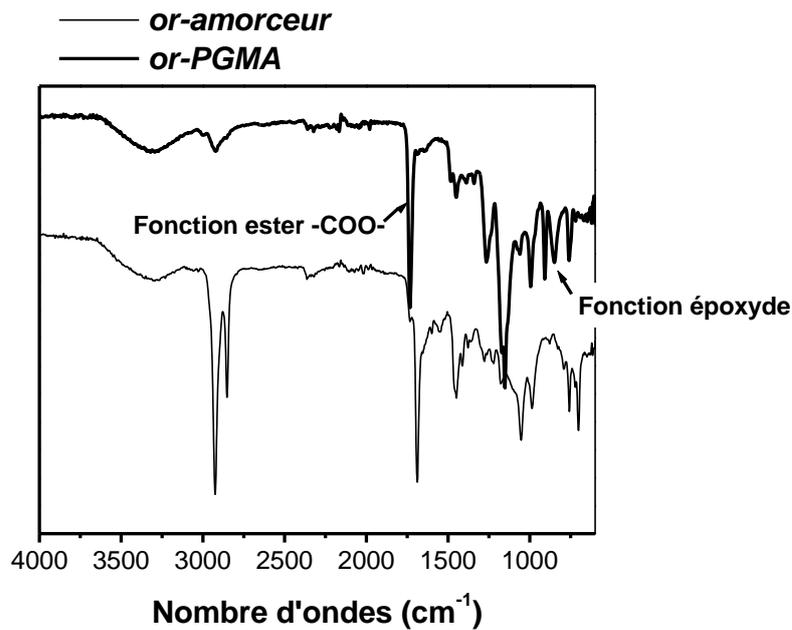


Figure 3.21 : Spectres ATR-FTIR d'une lame d'or fonctionnalisée par le 4,4'azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle) (trait fin) avant et (trait épais) après photopolymérisation du GMA.

La masse molaire moyenne du polymère formé en solution varie entre 240 000 g/mol pour le temps de polymérisation de 5 minutes à 300 000 g/mol après 15 minutes d'irradiation, c'est-à-dire qu'elles sont très comparables.

Si on prend toujours comme hypothèse que la M_n du polymère formé en solution est similaire à celle du polymère greffé à la surface, la densité des chaînes à la surface peut-être calculée. D'après les résultats reportés dans le **Tableau 3.4** on peut noter que de façon similaire à ce que nous avons observé pour les résultats obtenus précédemment pour le *grafting from* à partir d'une couche vinylique la densité de chaînes augmente avec le temps de photopolymérisation. Toutefois, il semble que la densité des chaînes greffées obtenue par photopolymérisation à partir d'une couche d'amorceur soit légèrement plus faible que celle observée dans le cas où la photopolymérisation a été réalisée à partir d'une couche vinylique.

	Temps de polymérisation (sec)	M_n (g/mol)	ep (nm)	$\Gamma_{(PGMA)}$ (ng/mm ²)	$\Sigma_{(PGMA)}$ (chaînes/nm ²)
Solution	1800/0,75g GMA	140 000	1,5	1,6	0,007
	1800/4,5 g GMA	240 000	3,7	3,4	0,01
Masse	300	246 000	11	11,9	0,03
	600	229 000	15,2	16,4	0,043
	900	300 000	26 ^a	28,1	0,056

Tableau 3.4 : Effet du temps de photopolymérisation sur les caractéristiques des films de P(GMA) immobilisés sur une surface d'or par la méthode « grafting from » amorcée à partir d'une couche de 4,4'azobis-4-cyanopentanoate de (1,10-dimercaptodécyle).

^a la valeur d'épaisseur obtenue pour la photopolymérisation en masse pour un temps d'irradiation de 900 s est donnée à titre d'indication car dans ces conditions de préparation, l'épaisseur du film de PGMA est trop importante et le minimum de réflectivité des courbes plasmon correspondantes se situe en dehors de la fenêtre de mesure accessible avec l'appareillage utilisé. Cette valeur correspond donc à une valeur minimale estimée à partir de la pente descendante initiale des courbes plasmon.

3.A.3 Discussion

L'élaboration de films organiques minces et fonctionnels constitue un des enjeux majeurs de nombreux domaines d'applications industrielles et technologiques à haute valeur ajoutée. Nous pouvons, à titre d'exemples, citer les domaines de l'électronique, de la microfluidique, de la nanofabrication, des techniques séparatives de purification et/ou d'analyse, du diagnostic médical... La stratégie envisagée pour l'élaboration de ces films minces dépend d'une part, de l'application visée mais aussi de la nature du substrat à la surface duquel ces films sont synthétisés. Les substrats les plus classiquement employés sont le verre, la silice et l'or. Les films d'or sont largement utilisés dans le domaine du diagnostic biomédical où ils servent d'interface fonctionnalisable entre le système de transduction et la couche bioréceptrice.

Dans la littérature, un grand nombre^{1, 7, 14, 148, 151-155} de publications traite de la modification chimique de surfaces d'or par des procédés d'auto-assemblage moléculaire en mono-couche. Par une méthode souple et une sélection appropriée du milieu réactionnel et des molécules réactives vis-à-vis de la surface d'or, ces molécules s'adsorbent et s'auto-organisent sur la surface formant une monocouche. Celle-ci a la particularité d'induire des

modifications des propriétés de surface telle que la mouillabilité, la résistance à la corrosion, la lubrification, le transfert d'électron ou encore la réactivité. Dans ce dernier cas, le choix judicieux de la fonction terminale de la molécule de thiol chimisorbée, permet de greffer, généralement après une étape d'activation, une entité biologique qui agit alors comme une espèce nucléophile¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Ainsi des monocouches auto-assemblées portant des fonctionnalités amine ou acide carboxylique ont largement été utilisées pour le greffage covalent de sondes biomoléculaires sur des surfaces d'or permettant le design de biocapteurs optiques efficaces¹⁵⁹⁻¹⁶¹.

Dans notre étude nous avons mis à profit la polyvalence de la stratégie de chimie de surface employant des thiols bifonctionnels pour réaliser l'immobilisation de films minces polymères sur des substrats d'or *via* des liaisons stables Au-S. Pour réaliser de telles interfaces hybrides ou/polymère organique, nous avons choisi de fonctionnaliser les surfaces d'or par des fonctions amine primaire afin de préparer des surfaces présentant des propriétés nucléophiles marquées. Le dérivé thiol sélectionné est la cystéamine ($\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$). La formation de monocouches denses repose généralement sur l'auto-assemblage des ces thiols *via* des interactions intermoléculaires faibles, de type van der Waals, entre les segments aliphatiques hydrophobes localisés entre la fonction thiol, permettant l'ancrage stable du thiol sur la surface d'or, et l'extrémité réactive, qui gouverne les propriétés interfaciales des ces nanofilms organiques. Ces interactions intermoléculaires conduisent à un empilement des chaînes aliphatiques de façon assez semblable à ce qui se produit au cours de la cristallisation des alcanes. Dans le cas de la cystéamine, la longueur limitée du segment aliphatique (2 groupements méthylène) ne permet pas d'obtenir des monocouches hautement organisées. Ceci peut expliquer le fait que l'épaisseur optique déterminée par SPR après chimisorption de la cystéamine (1,4 nm) est plus importante que celle attendue. En effet l'épaisseur d'une couche de cystéamine peut être estimée à environ 0,5 nm.¹³⁹ Cette différence de valeurs peut provenir soit d'une erreur sur la valeur d'indice de réfraction choisie lors de la modélisation ou encore par une quantité de cystéamine immobilisée sur la surface trop importante. En effet Wang et al¹⁶² ont montré dans leur étude qu'il était possible qu'une couche partielle supplémentaire vienne s'ajouter à la première couche de cystéamine. Par le biais d'analyses XPS de surfaces modifiées par une monocouche de cystéamine, les auteurs ont mis en évidence la présence de thiols non fixés et des espèces oxydées ont été révélées. Toutefois dans notre cas, il est à noter que les valeurs initiales d'angle de contact mesurées avec une goutte d'eau révèlent d'une part la nature relativement hydrophobe de

l'or ainsi que l'immobilisation de molécules de cystéamine qui rend plus hydrophile la surface d'or traduisant la présence notamment de fonctions amine primaires accessibles. Les propriétés physico-chimiques de films macromoléculaires minces greffés sur des substrats solides dépendent fortement de la conformation interfaciale des chaînes polymères. En effet, des chaînes étendues sont flexibles et perméables vis-à-vis d'espèces moléculaires de taille réduite alors que des chaînes polymères étalées sur une surface solide permettent de modifier les propriétés chimiques de surface de façon efficace sans toutefois engendrer de modifications significatives des propriétés mécaniques et hydrodynamiques interfaciales. D'une manière générale, la conformation interfaciale des chaînes dépend fortement du nombre de sites d'ancrage des macromolécules sur la surface ainsi que de la densité de greffage et/ou la qualité du solvant. Ces deux premiers paramètres sont étroitement liés aux conditions de préparation des films polymères. Il est généralement admis que des films macromoléculaires greffés à une surface peuvent suivre deux modes de croissance soit par densification des chaînes soit par augmentation de la longueur des chaînes polymères greffées (**Figure 3.22**).

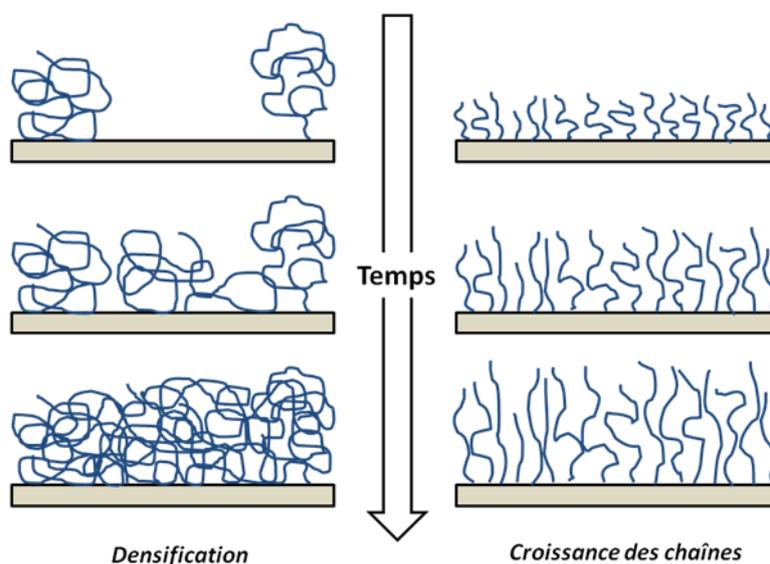


Figure 3.22 : Illustration schématique des cas-limites considérés comme représentatifs des mécanismes par densification (gauche) et croissance (droite) des chaînes conduisant à l'augmentation de l'épaisseur de films minces polymères préparés par la méthode du grafting from.

L'augmentation de l'épaisseur des films polymères par croissance des chaînes est généralement observée pour les méthodes de *grafting from* lorsque la densité de greffage des chaînes est élevée. A l'inverse, le mode par densification est souvent obtenu pour la

technique du *grafting onto* qui peut en première approximation être comparée à l'adsorption de polymères. En effet, les premières chaînes greffées constituent une gêne stérique pour l'approche d'autres chaînes et leur greffage à la surface. Ce phénomène étant d'autant plus significatif que la taille, c'est-à-dire la masse molaire des chaînes est élevée. On doit donc dans ce cas s'attendre à obtenir une valeur maximale de l'épaisseur des films polymères soit en fonction du temps de greffage soit en fonction de la masse molaire du polymère. Ceci est largement confirmé par le tracé de la **Figure 3.6** (Paragraphe 3.A.1.2). Une évolution de l'épaisseur des films greffés par densification est également possible pour la technique du *grafting from* soit dans le cas où l'amorçage à partir de la surface s'effectue avec une efficacité limitée et de façon continue soit dans le cas où le greffage à la surface s'effectue via une étape de propagation entre un (macro)radical en solution et un monomère greffé à la surface.

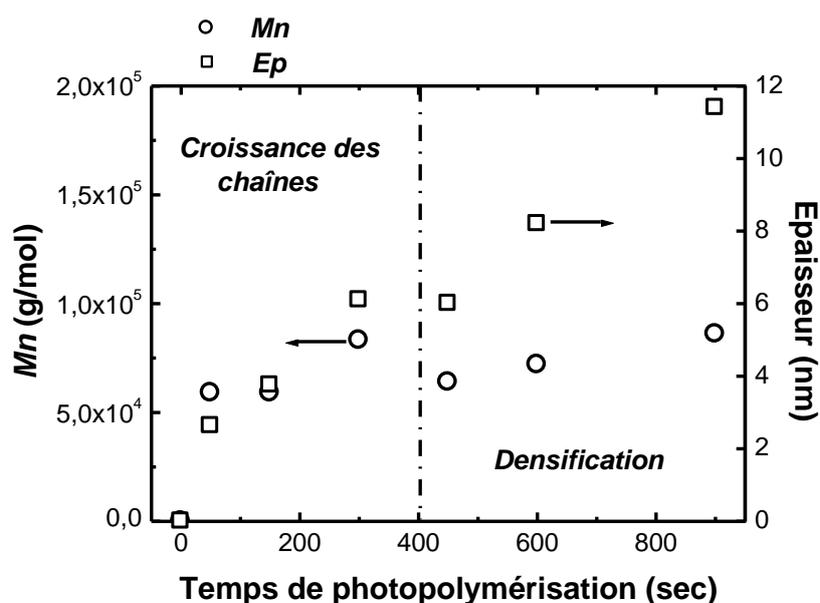


Figure 3.23: Evolutions de la masse molaire moyenne en nombre (rond) des P(GMA) formés dans le milieu réactionnel et de l'épaisseur (carré) des films de P(GMA) correspondant en fonction du temps de photopolymérisation. Les résultats correspondent à la méthode de *grafting from* réalisée par photopolymérisation du GMA en masse à partir d'une couche vinylique.

Il est intéressant de noter que pour les films préparés à partir d'une couche vinylique et pour lesquels l'amorceur est présent seulement en solution, nous observons des évolutions différentes pour la masse molaire moyenne en nombre des polymères formés dans le milieu

réactionnel et pour l'épaisseur des films greffés sur la surface d'or (**Figure 3.23**). En effet pour des temps d'irradiation inférieurs à 300 secondes, nous trouvons une bonne adéquation entre la variation de l'épaisseur et celle de la masse molaire du polymère formé en solution. Au-delà de cette valeur, l'augmentation de l'épaisseur du film est indépendante de la longueur des chaînes polymères, en effet la masse molaire ne varie plus alors que l'épaisseur optique du film de P(GMA) double. D'une manière générale nous pouvons considérer que pour des temps de photopolymérisation inférieurs ou supérieurs à 400 secondes, l'épaisseur des films augmente respectivement *via* la croissance des chaînes puis l'augmentation de la densité des chaînes. Il semble donc que dans ce cas la formation du film de PGMA s'effectue selon un mode mixte. Une représentation très schématique du mécanisme conduisant à l'augmentation de l'épaisseur des films de P(GMA) préparés à partir d'une couche de monomères greffés à la surface d'or est donnée dans la **Figure 3.24**.

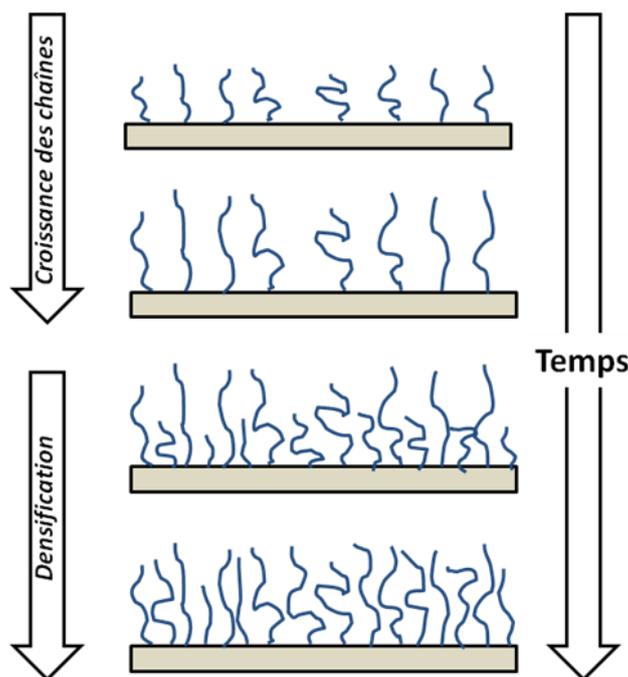


Figure 3.24 : Illustration schématique du mécanisme mixte par croissance des chaînes et densification conduisant à l'augmentation de l'épaisseur de films minces de P(GMA) préparés par la méthode du grafting from à partir d'une couche vinylique.

Une analyse plus fine de ces résultats suggère en fait trois étapes distinctes dans le mécanisme de croissance de l'épaisseur des films de P(GMA). Dans la **Figure 3.25** on remarque ; (i) l'augmentation la plus rapide de l'épaisseur du P(GMA) est observée dans la phase initiale de la photopolymérisation puisqu'un quart de l'épaisseur finale du film

(environ 3 nm) est déjà obtenue après 50 secondes de photoirradiation, (ii) entre 50 et 450 secondes, la cinétique d'augmentation de l'épaisseur du film de P(GMA) est ralentie, (iii) au-delà de 450 secondes nous voyons clairement une autoaccélération se traduisant par une augmentation rapide de l'épaisseur du film de P(GMA) caractéristique de l'effet Trommsdorf.

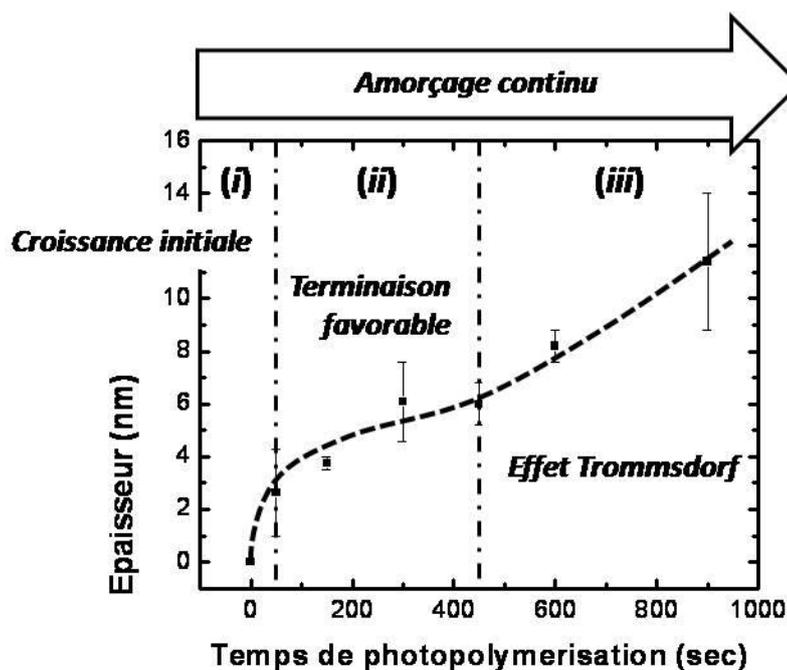


Figure 3.25: Variation de l'épaisseur des films P(GMA) en fonction du temps de photopolymérisation du GMA en masse par « grafting from » à partir d'une surface d'or fonctionnalisée par une couche vinylique. Les trois étapes relatives à l'augmentation de l'épaisseur du film de P(GMA) sont indiquées dans la figure.

Ces différentes observations sont en parfait accord avec les mécanismes connus de la photopolymérisation radicalaire classique utilisant des amorceurs dérivés de l'AIBN. En effet, l'efficacité photochimique de l'AIBN étant considérablement limitée celui-ci a un temps de demi-vie assez long. L'amorçage se produit donc au cours des différentes étapes de la photopolymérisation ce qui peut expliquer la densification au cours du temps. (i) Les chaînes grandissent fortement dans les premiers instants de l'irradiation, puis (ii) leur croissance se ralentit assez rapidement du fait des réactions de terminaison favorisées par l'augmentation du nombre de chaînes en surface et donc de leur proximité spatiale accrue notamment dans le cas d'un processus sans solvant et (iii) finalement, l'effet des réactions de terminaison est inhibé du fait de l'effet Trommsdorf. La nature exothermique des

polymérisations radicalaires entraîne un échauffement du milieu réactionnel pouvant amplifier ce phénomène.

De la même façon, nous pouvons à partir des résultats obtenus par la méthode du grafting from photo-amorcée à partir d'une couche d'amorceur dérivé de l'AIBN envisager un mécanisme mixte faisant intervenir dans un premier temps, l'augmentation de l'épaisseur du film de P(GMA) *via* la croissance des chaînes polymères greffées puis *via* la densification du nombre de chaînes greffées (**Figure 3.26**). En effet au-delà d'un temps de photo-irradiation de 300 secondes, nous remarquons que la masse molaire moyenne en nombre des polymères formés dans le milieu de réaction ne varie plus et reste constante avec une valeur de l'ordre de 250 000 g/mol alors que l'épaisseur des films P(GMA) croît de façon significative avec le temps de photo-irradiation.

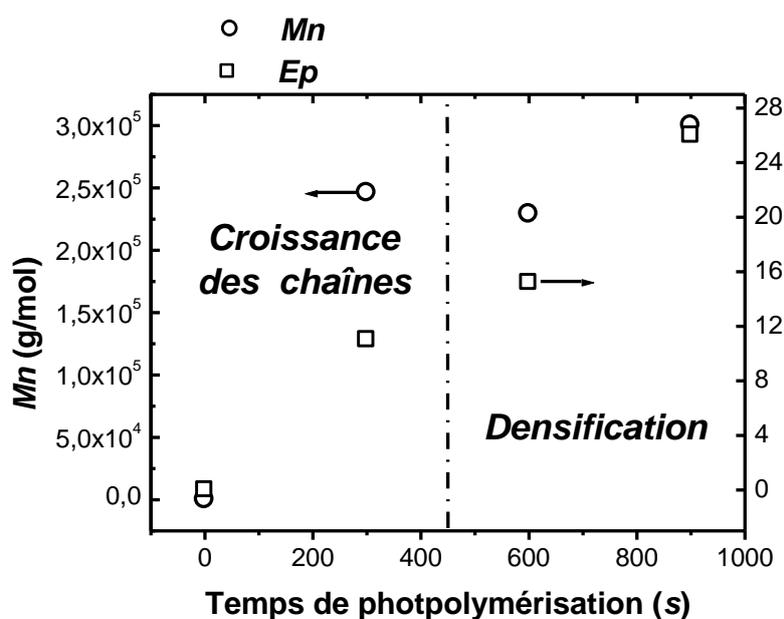


Figure 3.26 : Evolutions de la masse molaire moyenne en nombre (rond) des P(GMA) formés dans le milieu réactionnel et de l'épaisseur (carré) des films de P(GMA) correspondants en fonction du temps de photopolymérisation. Les résultats correspondent à la méthode de grafting from à partir d'une couche d'amorceur.

Malgré le nombre de points expérimentaux beaucoup plus limité que dans le cas de la **Figure 3.25** nous pouvons remarquer que l'épaisseur du film de P(GMA) augmente plus rapidement au cours des premiers instants de l'irradiation UV (**Figure 3.27**). En effet, pour les 3 périodes d'irradiation de 300 secondes, l'épaisseur du film de PGMA augmente de 11

nm, puis de seulement 4,2 nm et finalement d'environ également 11 nm. Nous distinguons donc encore trois phases distinctes qui peuvent correspondre aux trois phases (i, ii et iii) définies dans la **Figure 3.25**.

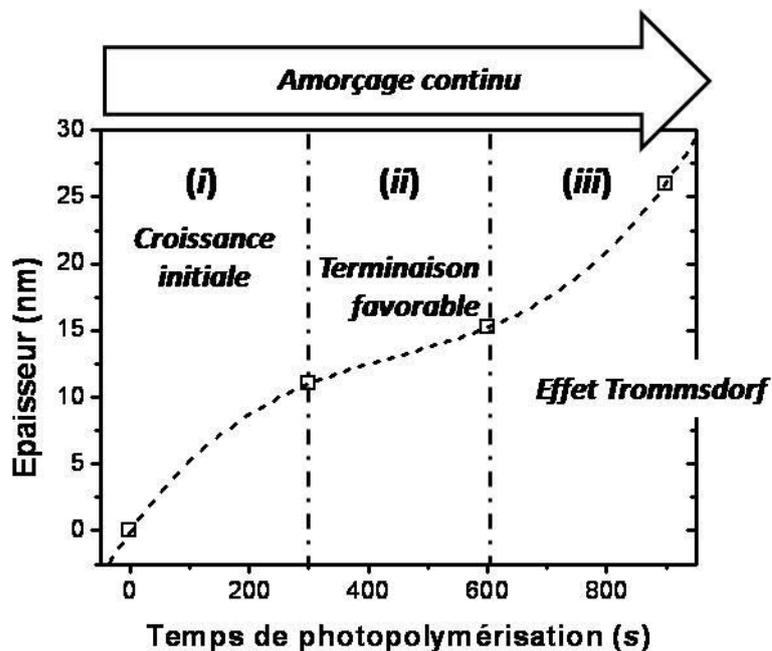


Figure 3.27 : Variation de l'épaisseur des films P(GMA) en fonction du temps de photopolymérisation du GMA en masse par « grafting from » à partir d'une surface d'or fonctionnalisée par une couche d'amorceur. Les trois étapes relatives à l'augmentation de l'épaisseur du film de P(GMA) sont indiquées dans la figure.

Si nous comparons dans le **Tableau 3.4** (page 86) les résultats des épaisseurs de P(GMA) obtenues par photo-irradiations de 1800 secondes en solution et 300 secondes en masse, c'est-à-dire des conditions pour lesquelles les masses molaires moyennes en nombre des polymères formés dans le milieu de réaction et non greffés à la surface sont sensiblement comparables ($M_n = 240\ 000\text{-}246\ 000\text{g/mol}$) nous observons que l'épaisseur du film obtenu à partir de GMA pur est environ 3 fois plus importante (épaisseur de 11 nm) que celle déterminée pour le film préparé en solution (épaisseur de 3,7 nm). Le solvant utilisé pour le procédé en solution est le dioxane, solvant polaire aprotique, il est donc peu probable que la plus faible épaisseur observée dans ce cas soit due à des réactions de transfert avec le solvant.

Par ailleurs, le tracé de la **Figure 3.19** (page 83) suggère l'obtention d'une valeur seuil de l'épaisseur des films de P(GMA) avec l'augmentation de la concentration en GMA dans le milieu réactionnel (valeur limite que nous estimons à environ 4 nm) qui demeure bien

inférieure à l'épaisseur obtenue par le procédé en masse qui peut être considéré comme correspondant à une concentration infinie. Lorsque la photopolymérisation est réalisée en masse, l'augmentation à la fois de la viscosité et de la température du milieu réactionnel est beaucoup plus rapide et importante ce qui selon notre point de vue peut conduire notamment à une cinétique de croissance des chaînes initialement plus rapide. Si on considère que l'efficacité de décomposition de l'amorceur est similaire en présence et en absence de solvant, la présence uniquement de monomère dans le milieu de photopolymérisation doit fortement affecter la vitesse d'amorçage à partir de la surface. Il est également à noter que le rapport 1/3 observé entre les valeurs d'épaisseur est en bon adéquation avec les valeurs de densité de chaînes par unité de surface ($\Sigma_{\text{PGMA}}=0,01/0,03$, cf Tableau 3.4). Ceci peut s'expliquer par le fait que le contraste optique tel que mesuré par résonance des plasmons de surface est directement proportionnel à la fraction volumique de polymère immobilisé à la surface¹⁶³ (**Figure 3.28**).

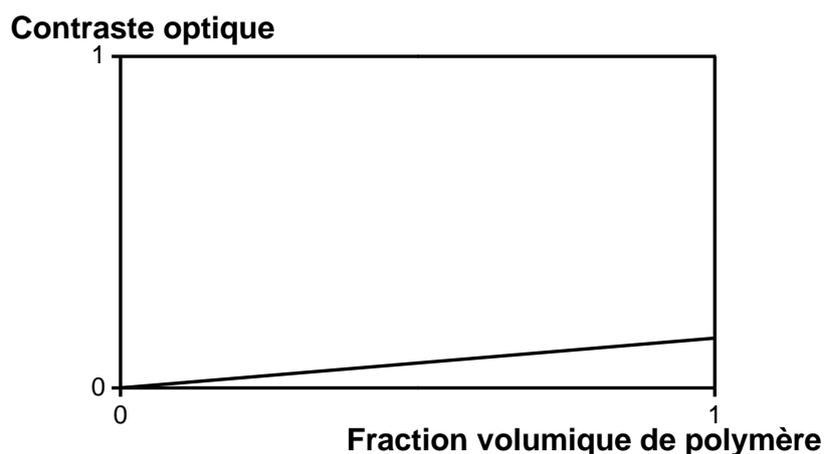


Figure 3.28 : Représentation schématique de la variation qualitative du contraste optique mesuré en SPR en fonction de la fraction volumique de polymère immobilisé à la surface. Pour un film polymère d'épaisseur donnée mais de densité variable, le contraste optique est directement proportionnel à la fraction volumique en polymère.

Comme nous l'avons vu, la grande différence entre les modes de préparation des films P(GMA) rend difficile une comparaison rigoureuse de l'ensemble des résultats obtenus. En effet, la méthode du *grafting from* réalisée à partir d'une couche d'amorceur immobilisée doit normalement conduire au greffage de macromolécules par une seule extrémité de la chaîne polymère et donc à la formation de brosses polymères dans le cas d'une densité de greffage élevée (**Figure 3.29**). A l'inverse, pour la méthode du *grafting*

from réalisée à partir d'une couche vinylique, du fait de la faible quantité de monomères greffés en surface il est fort probable que l'amorçage ait principalement lieu en solution et que le greffage des chaînes polymères à la surface s'effectue *via* l'étape de propagation de la photopolymérisation. Dans le cas du poly(méthacrylate de glycidyle) la présence de fonctions époxyde dans la chaîne latérale de chaque unité monomère ne permet pas de réaction de greffage sélective lors du *grafting onto* sur un substrat modifié par des fonctions amine, et donc des liaisons covalentes s'établissent tout au long de la chaîne polymère.

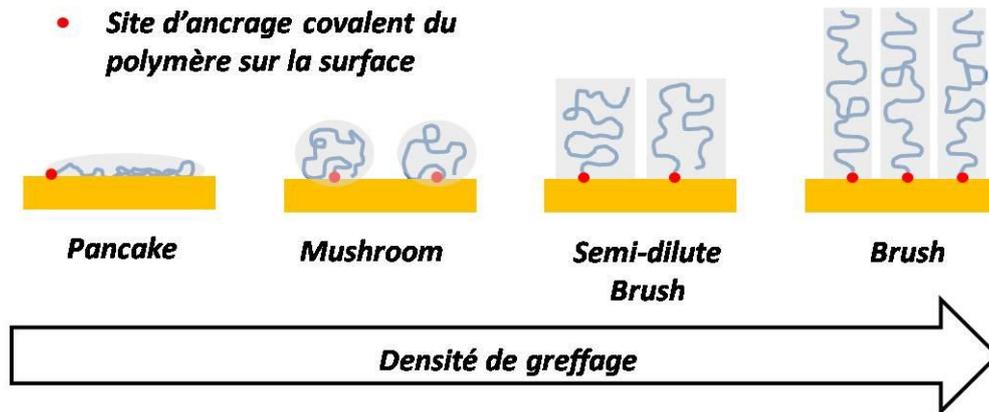


Figure 3.29 : Représentation schématique des différents régimes qui peuvent être observés pour les brosses polymères en fonction de la densité de greffage.

L'ensemble des résultats obtenus montre que pour une masse molaire moyenne en nombre donnée de P(GMA), l'épaisseur optique du film correspondant est largement inférieure à la longueur estimée pour une chaîne P(GMA) en conformation étendue. D'une manière générale, les valeurs d'épaisseur des films P(GMA) greffés par les méthodes de *grafting from* sont un ordre de grandeur inférieures à celles des longueurs théoriques des macromolécules en conformation étendue. Ceci peut évidemment s'expliquer par un écart éventuel entre les valeurs de masse molaire moyenne en nombre des polymères formés dans le milieu réactionnel et celles des polymères qui au cours du processus de photopolymérisation sont accrochés de façon covalente à la surface mais également, par le fait que les conditions opératoires mises en œuvre ne conduisent pas à la formation de films greffés dans lesquels les chaînes polymères adoptent une conformation fortement étirée loin de la surface correspondant au régime de type brosse. Ceci est évident pour les films préparés par *grafting onto* pour lesquels de multiples points d'ancrage covalent existent entre la surface et les chaînes polymères. Pour les méthodes par *grafting from*, la faible

densité de greffage obtenue qui est un ordre de grandeur inférieure à celle généralement donnée dans la littérature pour les brosses polymères (10^{-2} chaînes nm^{-2} à comparer à des valeurs de 10^{-1} chaînes nm^{-2} pour des brosses polymères préparées par des techniques contrôlées de polymérisation^{72, 164} peut conduire à des conformations intermédiaires telles que celles données dans la **Figure 3.29**. Il est également important de noter que les mesures d'épaisseur optique ont été réalisées dans des conditions de mauvais solvant. En effet, le PGMA est insoluble en phase aqueuse et donc il est fort probable qu'en présence d'une solution tampon, les chaînes collapsent et sont fortement concentrées à la surface. La **Figure 3.30** donne une représentation schématique et idéalisée de la conformation macromoléculaire interfaciale adoptée par les chaînes de P(GMA) en fonction de la voie de synthèse utilisée avec les gammes d'épaisseur correspondantes. Dans la partie a de la figure nous remarquons que pour une longueur donnée de chaîne polymère, l'épaisseur du film est la plus faible lorsque la méthode de synthèse est la technique par *grafting onto* et la plus importante lorsque voie de synthèse s'effectue par *grafting from* à partir d'une couche de l'amorceur. Une épaisseur intermédiaire est obtenue lorsque le film polymère est préparé *via grafting from* à partir d'une couche vinylique. Pour des densités de greffage équivalentes, cette augmentation de l'épaisseur est fonction du nombre de sites d'ancrage covalent entre les chaînes polymères et la surface. Un grand nombre de sites conduira à une conformation des chaînes étalée à la surface. La partie b de la Figure montre quatre courbes plasmons obtenus pour une lame d'or native et pour des lames d'or fonctionnalisées par des films P(GMA) préparés selon les méthodes de *grafting onto* et de *grafting from*. Pour des masses molaires moyennes en nombre et/ou des temps de photo-irradiations identiques, l'importance du déplacement du minimum de réflectivité des courbes plasmon vers des plus grandes valeurs d'angle d'incidence est en accord avec la représentation schématique discutée précédemment.

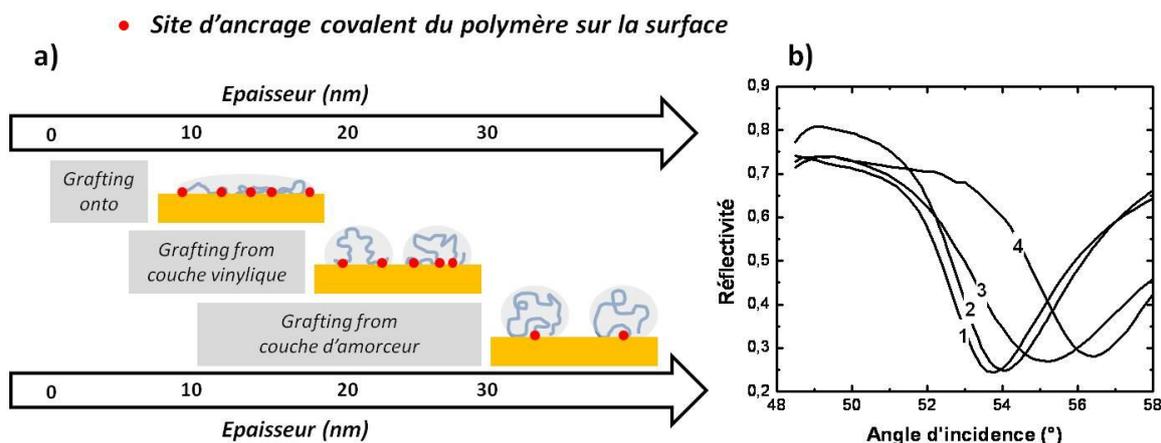


Figure 3.30 a) Représentation schématique de la conformation interfaciale supposée des chaînes de P(GMA) en fonction du mode de préparation. Les gammes d'épaisseur sont également indiquées pour chaque méthode. b) Courbes plasmons mesurées pour (1) une surface d'or nue, et des surfaces d'or greffées par des films de P(GMA) préparés par les méthodes de (2) grafting onto et grafting from à partir d'une couche de (3) monomère et (4) amorceur. Pour les méthodes par grafting from les conditions opératoires sont comparables ; les photopolymérisations sont réalisées en masse avec un temps de photo-irradiation de 600 secondes. Le P(GMA) formé en solution lors de la méthode grafting from à partir d'une couche de monomère a été utilisé pour préparer le film P(GMA) par grafting onto.

Dans l'hypothèse que toutes les fonctions époxyde présentes dans le film de P(GMA) greffé soient accessibles et disponibles pour le greffage, les résultats présentés dans le **Tableau 3.2** (page 72) relatifs au greffage de l'octylamine sur des films d'épaisseur variable préparés par la méthode *grafting onto* suggèrent qu'une partie des fonctions époxyde portées initialement par les chaînes polymères ont réagi avec les fonctions amine présentes à la surface de l'or et ne sont donc plus disponibles pour le greffage d'octylamine. D'autre part, ces résultats indiquent que le nombre de fonctions époxydes disponibles est fonction de la masse molaire moyenne en nombre du polymère. Ceci peut provenir soit d'une meilleure accessibilité des fonctions époxyde soit d'une diminution du nombre de sites interfaciaux de fixation covalente quand la M_n du polymère est grande. Les pourcentages de fonctions époxyde disponibles reportés dans ce travail sont en bon accord avec celles décrits par Luzinov et coll.²⁷ Les auteurs ont estimé que pour un PGMA de $M_n = 84\,000$ g/mol immobilisé sur une surface portant des fonctions silanol, 40% des fonctions époxyde sont disponibles pour le greffage de la dodécylamine.

3.B Biofonctionnalisation de films minces de P(GMA) greffés sur des surfaces d'or par l'albumine de sérum bovin et évaluation des propriétés immunoréceptrices.

Dans cette partie, nous présenterons tout d'abord les résultats relatifs au greffage de BSA sur les films minces de PGMA préparés par les différentes méthodes présentées ci-dessus puis nous discuterons les propriétés de reconnaissance de ces immunocapteurs. Pour le greffage de la BSA, les films PGMA ont été mis en contact avec une solution de BSA à 4 mg/mL dans du tampon phosphate (0,01M, pH = 7,4) durant 3 jours.¹³⁰

Afin de vérifier l'absence d'interactions non spécifiques lors de la fixation de la BSA sur le film polymère, nous avons tenté de fixer la BSA sur un film de poly (méthacrylate de méthyle) dans les mêmes conditions que celles utilisées pour fixer la BSA sur le film de poly(GMA). Au bout de trois jours de contact, une fois les mesures de SPR enregistrées et les courbes modélisées, nous notons que l'angle plasmon minimum ne s'est pas déplacé (Figure 3.31). La fixation de la BSA sur les interfaces poly(GMA) peut être ainsi attribuée à sa réaction de couplage avec les fonctions époxydes.

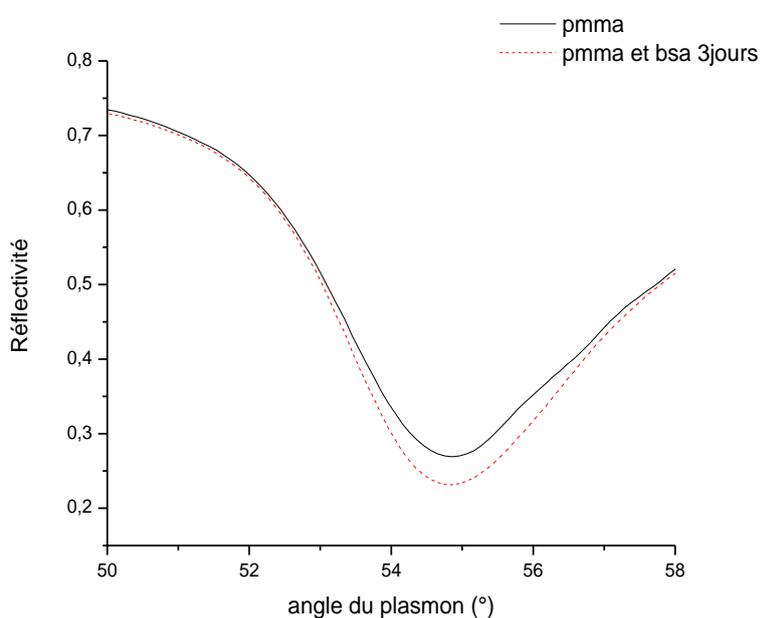


Figure 3.31 : Comparaison des courbes plasmons de la lame fonctionnalisée par le poly(MMA) avant et après mise en contact avec la solution de BSA (4mg/mL, PBS, pH = 7,4) durant trois jours.

3.B.1 Greffage de la BSA sur des films minces de P(GMA)

3.B.1.1 Cas des films minces de P(GMA) préparés par grafting onto.

Les résultats concernant le greffage de l'albumine de sérum bovin sont montrés dans le **tableau 3.5** pour les films préparés à partir de PGMA de masse molaire moyenne en nombre égale à 60 000 et 300 000 g/mol. La réactivité de ces films avait précédemment été testée vis-à-vis de l'octylamine.

ep PGMA (nm)	Mn (g/mol)	$\Sigma_{\text{polymère}}$ (chaînes/nm ²)	ep BSA (nm)	$\Gamma_{\text{BSA, théo}}$ (ng/mm ²)	$\Gamma_{\text{exp,BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Sigma_{\text{BSA, exp}}$ (molécules/ nm ²)	$\Sigma_{\text{expBSA}}/\Sigma_{\text{polymère}}$
4,7	60 000	0,05	4,3	4,5	3,5	0,03	0,6
5,4	300 000	0,01	3	2,9	2,25	0,02	2

Tableau 3.5 : Influence de l'épaisseur des films minces de P(GMA) obtenus par « grafting onto » sur les caractéristiques de la couche de BSA.

Contrairement aux résultats obtenus lors du greffage de l'octylamine, on note que le film polymère le plus épais issu du polymère de M_n la plus élevée ($M_n = 300\,000$ g/mol) fixe le moins de BSA sur la surface. Ce phénomène peut s'expliquer par la différence de taille entre une molécule de BSA et celle d'octylamine, qui de ce fait entrave la diffusion de la BSA au sein du film de poly(GMA). Ceci est accentué par la structure du film de poly(GMA) greffé dans le milieu de travail qui est le PBS. En effet, la fixation de l'octylamine est réalisée en milieu organique ce qui assure un meilleur déploiement des chaînes de poly(GMA), d'où une meilleure diffusion des espèces au sein du film. Tandis qu'en milieu aqueux, le P(GMA) se trouve dans un mauvais solvant. Par ailleurs, d'après Fair et Jamieson¹⁶⁵, le taux de recouvrement d'une monocouche de BSA est de 2,5 ng/mm², ainsi pour le film PGMA issu du « grafting onto » du polymère de $M_n = 60\,000$ g/mol, nous avons l'équivalent d'un peu plus d'une monocouche de BSA à la surface, tandis que pour le film issu d'un polymère de M_n plus élevée nous observons que la quantité de de BSA est proche de celle correspondant à une monocouche.

3.B.1.2 Cas des films minces de P(GMA) synthétisés in situ par grafting from.

3.B.1.2.1 Cas des films minces de P(GMA) synthétisés à partir d'une couche vinylique.

A partir du tracé présenté dans le Figure 3.32 nous notons qu'il existe une relation croissante entre l'épaisseur du film de P(GMA) et la quantité de protéines fixée, cela jusqu'à une épaisseur du film de P(GMA) d'environ 9 nm ce qui correspond à un temps de polymérisation de 600sec. Au-delà de ce temps de polymérisation, on assiste au phénomène inverse, en effet pour un film de P(GMA) d'épaisseur de 14 nm obtenu pour un temps de polymérisation de 900 secondes, nous avons une épaisseur de film de BSA divisée par 2.

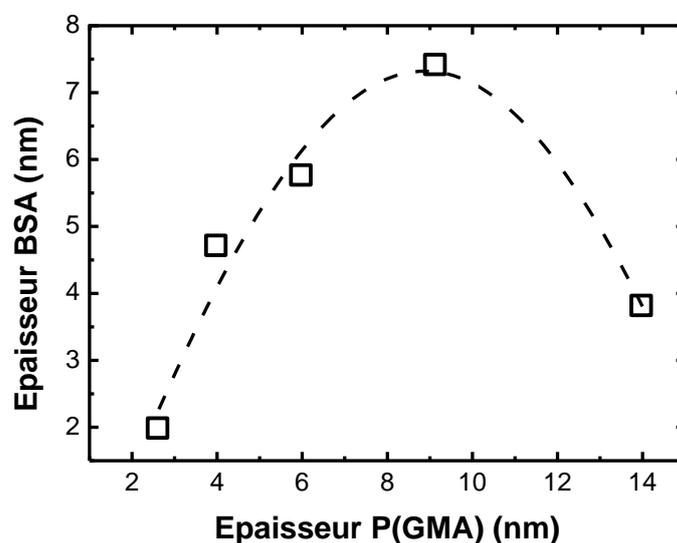


Figure 3.32 : Evolution de l'épaisseur de la couche de BSA en fonction de l'épaisseur de films minces de P(GMA) préparés par grafting from à partir d'une couche vinylique.

Les valeurs de taux de recouvrement et de densité de biomolécules ont été calculées à partir des valeurs d'épaisseur de BSA et sont présentées dans le **tableau 3.6**.

épaisseur du film de PGMA (nm)	$\Sigma_{P(GMA)}$ (chaînes/nm ²)	épaisseur du film de BSA (nm)	$\Gamma_{théo,BSA}$ (ng/mm ²)	$\Gamma_{exp,BSA}$ (ng/mm ²)	$\Sigma_{BSA,exp}$ (molécules/nm ²)	$\Sigma_{BSA,exp}/\Sigma_{P(GMA)}$
2,6	0,03	2	2,28	1,75	0,016	0,5
4	0,04	4,7	5,05	3,8	0,035	0,87
6	0,06	5,7	4	3	0,03	0,5
9,1	0,09	7,4	5,38	4,1	0,04	0,4
14	0,11	3,8	3,04	2,3	0,02	0,2

Tableau 3.6 : Effet de l'épaisseur des films de P(GMA) sur les caractéristiques des films de BSA greffée sur des films minces de P(GMA) préparés par grafting from à partir d'une couche vinylique.

3.B.1.2.2 Cas des films minces de P(GMA) synthétisés à partir d'une couche d'amorceur de type AIBN

Le **tableau 3.7** présente les caractéristiques des films de BSA greffée sur les films de P(GMA) préparés à partir d'une couche d'amorceur par polymérisation en solution dans le dioxane et par polymérisation en masse.

Procédé en solution	m_{GMA} (g)	$ep_{P(GMA)}$ (nm)	$\Sigma_{P(GMA)}$ (chaînes/nm ²)	ep_{BSA} (nm)	$\Gamma_{théo,(BSA)}$ (ng/mm ²)	$\Gamma_{exp,(BSA)}$ (ng/mm ²)	$\Sigma_{(BSA)}$ (molécules/nm ²)	$\Sigma_{BSA}/\Sigma_{P(GMA)}$
		0,75	1,5	-	5,9	7,4	5,7	0,05
	4,5	3,7	-	6,4	10,4	8	0,07	-
Procédé en masse	Temps de photopolymérisation (s)	$ep_{P(GMA)}$ (nm)	$\Sigma_{P(GMA)}$ (chaînes/nm ²)	ep_{BSA} (nm)	$\Gamma_{théo,(BSA)}$ (ng/mm ²)	$\Gamma_{exp,(BSA)}$ (ng/mm ²)	$\Sigma_{exp,(BSA)}$ (molécules/nm ²)	$\Sigma_{BSA}/\Sigma_{P(GMA)}$
	300	11	0,03	19	13,9	10,7	0,097	3,2
	600	15,2	0,043	4	4,3	3,2	0,03	7

Tableau 3.7 : Effet des conditions de préparation sur les caractéristiques des films de BSA greffée sur des films minces de P(GMA) préparés par grafting from à partir d'une couche d'amorceur.

Globalement, nous remarquons que la quantité de BSA immobilisée est plus importante pour les films de P(GMA) préparés par photo-amorçage à partir de la surface en comparaison des films de P(GMA) préparés par *grafting onto* et par *grafting from* à partir d'une couche vinylique. En effet, pour un film P(GMA) de 11 nm préparé par le procédé en masse la quantité de BSA immobilisée est équivalente à 4 monocouches alors que pour un film P(GMA) préparé par *grafting from* à partir d'une couche vinylique la quantité de BSA greffée est équivalente à celle d'une monocouche. De façon similaire, si on compare les résultats obtenus pour les méthodes de *grafting from* par photopolymérisation du GMA en solution, on peut noter que pour des films P(GMA) d'épaisseur identique (3,7 nm) la quantité de BSA immobilisée est plus importante lorsque le mode de préparation met en jeu le greffage à partir d'une couche d'amorceur (8 ng/mm²) en comparaison du greffage à partir d'une couche vinylique (3,8 ng/mm²).

Ceci nous prouve le lien existant entre la méthode de préparation du film sur sa structure et sa capacité de fixation en bio macromolécules. La tendance générale des résultats nous montre que la BSA se fixe moins sur des films épais. Pour une même technique de préparation, on observe un effet de saturation en fixation de BSA lorsque l'épaisseur du film augmente.

3.B.2 Evaluations des propriétés immunoréceptrices des interfaces à base de films minces de P(GMA) greffés par l'albumine de sérum bovin

L'efficacité et la spécificité de la réponse de surfaces polymères fonctionnalisées par un antigène repose sur l'absence d'interactions non spécifiques entre l'anticorps injecté dans la cellule SPR et le polymère, jouant le rôle de bras espaceur entre le substrat d'or et la sonde biologique. La nature relativement hydrophobe du P(GMA) peut en effet provoquer l'adsorption de protéines, via des interactions hydrophobes. Nous avons donc, dans un premier temps, cherché à évaluer le comportement de films minces de P(GMA) en présence d'a-BSA. Pour cela, une solution d'anti-BSA (0,2 mg/mL) dans du PBS a été mise en circulation sur la surface de P(GMA) et la variation de réflectivité a été enregistrée en temps réel. Dans la **Figure 3.33**, nous remarquons que l'injection de la solution d'anti-BSA conduit à une augmentation de la réflectivité et la différence de réflectivité observée en présence de PBS avant et après l'injection de la solution d'a-BSA traduit l'existence d'interactions non spécifiques entre l'a-BSA et la surface de P(GMA). Afin d'éliminer les interactions non spécifiques protéine/surface, un tensioactif neutre, le Tween 20, souvent

employé dans les tests immunologiques de type ELISA pour saturer la surface d'interaction et minimiser les interactions non spécifiques, a été utilisé. Pour ce faire, il a été ajouté à une concentration de 1% (v/v) au tampon PBS servant à la préparation de la solution d'a-BSA. Il apparaît nettement que la présence du Tween 20 permet d'éliminer les interactions non-spécifiques entre l'anti-BSA et la surface de poly(GMA) ceci se traduit sur la **figure 3.33** par le fait que le niveau de réflectivité reste inchangé lorsque que l'aBSA est injectée en présence de Tween. Dans la suite de cette étude, la reconnaissance moléculaire entre la BSA greffée sur les différents films de P(GMA) et l'anti-BSA en solution dans le PBS (10 mM, pH =7,4) sera toujours effectuée en présence de Tween 20 à 1% afin d'éviter l'adsorption non spécifique de l'a-BSA et ainsi de garantir la spécificité de l'interaction antigène/anticorps.

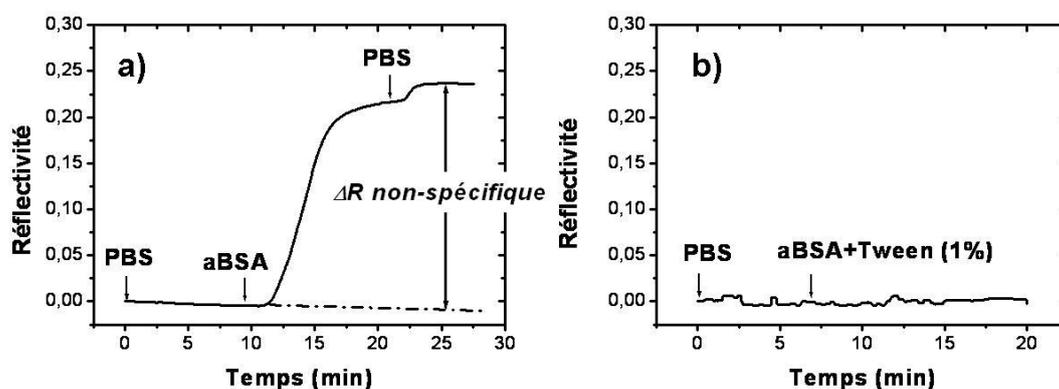


Figure 3.33 : Courbes de réflectivité en fonction du temps correspondant à l'injection d'une solution d'aBSA (0,2 g/L) sur un film mince de P(GMA) a) en absence et b) en présence de Tween 20 (1% v/v) dans la solution tampon.

3.B.2.1 Cas des interfaces immunoréceptrices à base de films minces de P(GMA) préparés par *grafting onto*

La reconnaissance moléculaire entre l'a-BSA et la BSA immobilisée des films minces de P(GMA) préparés avec des polymères de $M_n = 60\ 000$ g/mol et $300\ 000$ g/mol a été étudiée. Pour cela, une solution d'anti-BSA à 0,2 mg/mL dans un tampon PBS pH =7,4 contenant 1% (v/v) de Tween 20 est mise en circulation durant 20 minutes sur la surface de P(GMA) sur laquelle a été préalablement immobilisée de la BSA, et la variation de réflectivité est étudiée en fonction du temps. L'augmentation de la réflectivité après passage de l'anti-BSA sur le film de P(GMA) fonctionnalisé par la BSA indique la fixation de celui-ci sur la surface du biocapteur (**Figure 3.34**).

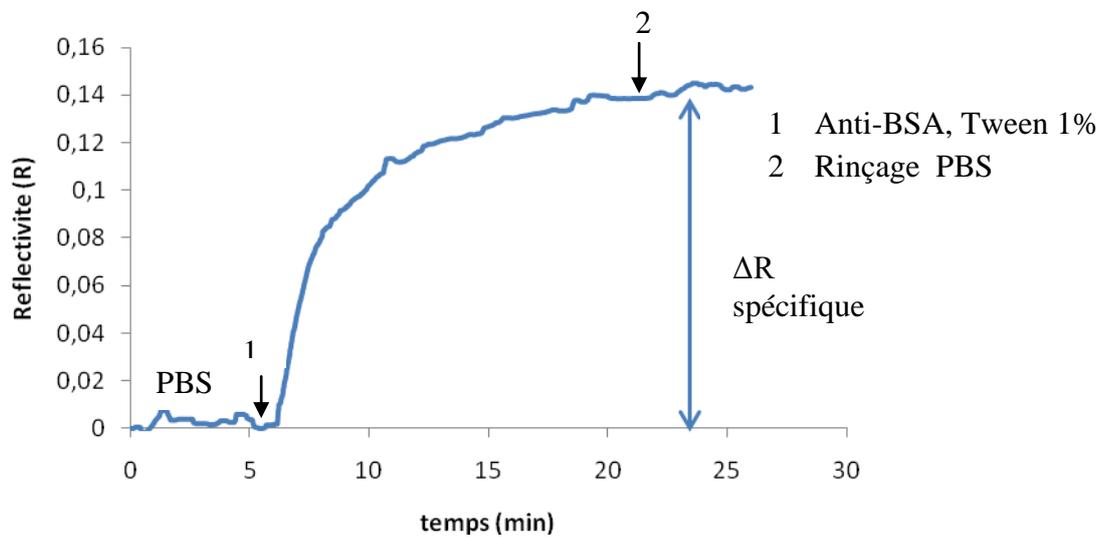


Figure 3.34: Courbe de réflectivité en fonction du temps relative à l'adsorption de l'anticorps α -BSA (0,2 mg/mL, PBS pH=7,4, Tween 20 1% (v/v)) sur un film mince de P(GMA) préparé par *grafting onto* et biofonctionnalisé par la BSA.

Le **tableau 3.8** compare la réponse des immunorécepteurs préparés par *grafting onto* avec les P(GMA) de $M_n = 60\,000$ g/mol et 300 000 g/mol.

Mn (g/mol)	$\Gamma_{\text{théo,BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Gamma_{\text{exp,BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Sigma_{\text{exp,BSA}}$ (molécules/nm ²)	$\Gamma_{\text{anti-BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Sigma_{\text{anti-BSA}}$ (molécules/nm ²)	$\Sigma_{\text{anti-BSA}}/\Sigma_{\text{exp,BSA}}$
60 000	4,5	3,5	0,03	2,7	0,01	0,33
300 000	2,9	2,25	0,02	2,1	0,008	0,4

Tableau 3.8 : Récapitulatif des taux de recouvrement en BSA et en α -BSA en fonction de la masse molaire du polymère utilisé pour préparés des films minces de P(GMA) par *grafting onto*.

La reconnaissance BSA/ α -BSA étant vérifiée, la réversibilité des interactions établies entre la BSA et l' α -BSA a été testée. Pour cela, après fixation de l' α -BSA, on a fait circuler une solution de glycine à 0,1M à pH=2,1. Le niveau de réflectivité à la suite de cette étape et après le rinçage au PBS est quasiment identique à celui mesuré avant le passage de l' α -BSA (**figure 3.35**). Afin de confirmer la stabilité et la robustesse du film de P(GMA) fonctionnalisé par la BSA, nous avons, à nouveau, fait circuler de la solution d' α -BSA/Tween 20, et il apparaît que la BSA est toujours efficace. Cela se traduit sur la courbe

de réflectivité de la **Figure 3.35** par une nouvelle augmentation de réflectivité lors de l'injection répétée d'a-BSA.

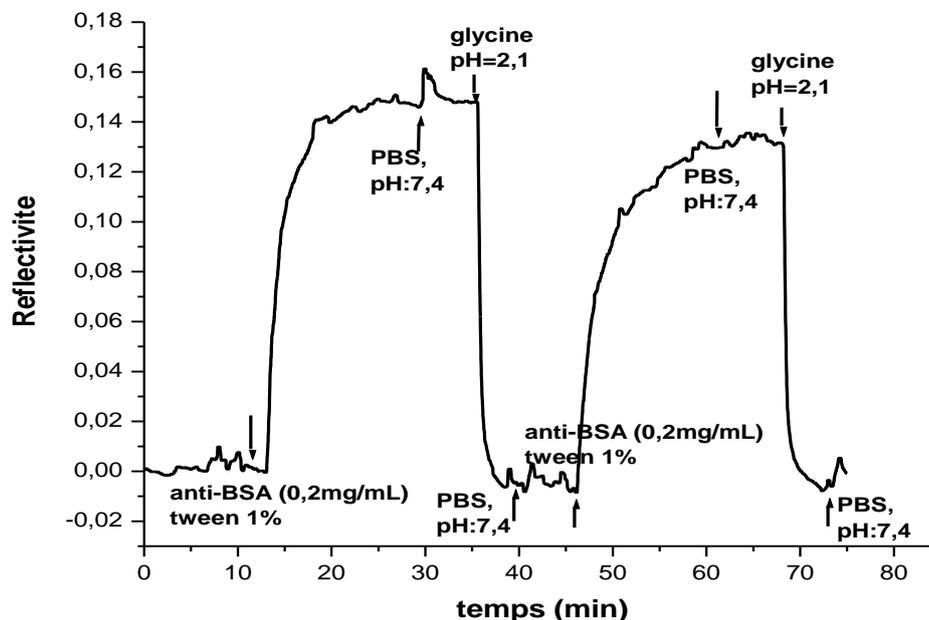


Figure 3.35: Courbe de réflectivité en fonction du temps relative à deux cycles adsorption/désorption successifs de l'anticorps a-BSA (0,2 mg/mL, PBS pH=7,4, Tween 20 1% (v/v)) sur un film mince de P(GMA) préparé par grafting onto et biofonctionnalisé par la BSA. La régénération de l'immunorécepteur au niveau de la couche d'antigène s'effectue par la circulation d'une solution de glycine à 0,1M à pH = 2,1.

Cependant, nous observons souvent une perte d'efficacité d'environ 10% de la reconnaissance entre le premier et le deuxième passage d'a-BSA. Au-delà de la deuxième injection d'a-BSA la réponse de l'immunorécepteur est stable. Cette perte d'efficacité peut être due à une légère dénaturation et/ou réorganisation de la BSA à pH =2,1.

3.B.2.2 Cas des interfaces immunoréceptrices à base de films minces de P(GMA) préparés par grafting from à partir d'une couche vinylique

Après avoir étudié la capacité de fixation des films en BSA, nous avons évalué la reconnaissance moléculaire de la BSA envers son anticorps l'a-BSA. Pour cela nous faisons passer l'anti-BSA en temps réel sur les films de P(GMA) fonctionnalisés par la BSA. Les résultats sont montrés dans le **tableau 3.9**.

$\Gamma_{\text{théo,BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Gamma_{\text{exp,BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Sigma_{\text{exp,BSA}}$ (molécules/nm ²)	$\Gamma_{\text{anti-BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Sigma_{\text{anti-BSA}}$ (molécules/nm ²)	$\Sigma_{\text{anti-BSA}}/\Sigma_{\text{exp,BSA}}$
5,84	4,48	0,04	2,5	0,01	0,25
8,93	6,85	0,06	1,56	0,0062	0,1
1,49	1,14	0,01	0,817	0,0033	0,33
8,5	6,5	0,06	1,4	0,0056	0,09
1,49	1,14	0,01	0,72	0,0029	0,29

Tableau 3.9 : Valeurs des taux de recouvrement en BSA et anti-BSA pour des films préparés par la voie *grafting from* à partir d'une couche vinylique.

On constate comme on l'a noté plus haut, que l'augmentation de la quantité de BSA fixée suit l'augmentation de l'épaisseur du film de poly(GMA) jusqu'à une valeur seuil d'épaisseur de film ici 12 nm, au-delà de laquelle la quantité de BSA fixée diminue. La technique du *grafting from* à partir de la monocouche vinylique fixe le même nombre maximal de monocouches de BSA, soit 2 que les films de poly(GMA) préparés par la technique du « *grafting onto* ». Cependant, plus la quantité de BSA immobilisée est élevée, moins elle reconnaît l'anti-BSA. Au vu de nos valeurs, il existe une valeur intermédiaire d'épaisseur de film (6,8 nm) pour laquelle nous fixons raisonnablement de la BSA sans altérer ses propriétés de reconnaissance.

3.B.2.3 Cas des interfaces immunoréceptrices à base de films minces de P(GMA) préparés par *grafting from* à partir d'une couche d'amorceur de type AIBN

Dans cette partie, les résultats des tests de reconnaissance moléculaire réalisés sur les films synthétisés à partir d'un amorceur de type AIBN en solution et en masse, biofonctionnalisés seront présentés (Tableau 3.10). Nous remarquons que comme dans le cas des films minces de P(GMA) préparés à partir d'une couche vinylique l'efficacité de la reconnaissance diminue lorsque la quantité de P(GMA) immobilisé par photopolymérisation augmente.

Procédé	Epaisseur	$\Gamma_{\text{exp,BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Sigma_{\text{exp,BSA}}$ (molécules/nm ²)	$\Gamma_{\text{exp,anti-BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Sigma_{\text{anti-BSA}}$ (molécules/nm ²)	$\Sigma_{\text{antiBSA}} / \Sigma_{\text{exp,BSA}}$
	PGMA (nm)					
Solution	1,5	5,7	0,05	2	0,008	0,16
Solution	3,7	8	0,07	1,4	0,0058	0,08
Masse	11	10,7	0,097	0,4	0,0015	0,015

Tableau 3.10 : Valeurs des taux de recouvrement en BSA et anti-BSA pour des films préparés par la voie grafting from à partir d'une couche d'amorceur de type AIBN.

3.B.3 Discussion

Afin d'évaluer l'influence des caractéristiques des films minces de P(GMA) sur leur capacité de greffage en albumine de sérum bovin nous avons choisi de corréler les densités de greffage, exprimées en nombre de chaînes par nm², en termes de greffage de P(GMA) et d'albumine de sérum bovin. La **Figure 3.36** montre la variation du rapport des densités de biomolécules greffées d'albumine de sérum bovin et de chaînes greffées de P(GMA) en fonction de la densité de chaînes greffées de P(GMA) pour des films minces de P(GMA) préparés par « grafting from » à partir d'une surface d'or fonctionnalisée par une couche vinylique. D'une manière générale nous remarquons que lorsque les valeurs de $\Sigma_{\text{P(GMA)}}$ augmentent le rapport $\Sigma_{\text{BSA}} / \Sigma_{\text{P(GMA)}}$ diminue. Le même comportement a été observé pour les films minces de P(GMA) préparés par les méthodes de grafting onto (**Tableau 3.5**) et de grafting from à partir d'une couche d'amorceur (**Tableau 3.7**).

Nous pouvons cependant remarquer que la diminution du rapport $\Sigma_{\text{BSA}} / \Sigma_{\text{P(GMA)}}$ est plus importante pour des valeurs de $\Sigma_{\text{P(GMA)}}$ supérieures à 0,08. Cette valeur de densité de chaînes de P(GMA) par unité de surface correspondent au temps de photopolymérisation d'environ 400 s qui marque, comme indiquée dans la **Figure 3.23**, la transition entre les deux modes d'augmentation de l'épaisseur optique des films de P(GMA) par croissance des chaînes polymères (temps de photopolymérisation inférieurs à 400 s) et par densification (temps de photopolymérisation supérieurs à 400 s). Il semble donc à partir des résultats que nous avons obtenu, qu'un des facteurs déterminant la capacité de greffage en biomolécule est la densité de greffage en chaîne de P(GMA). L'augmentation de la densité surfacique de chaînes est une contrainte au greffage de biomolécules volumineuses telles que l'albumine de sérum bovin.

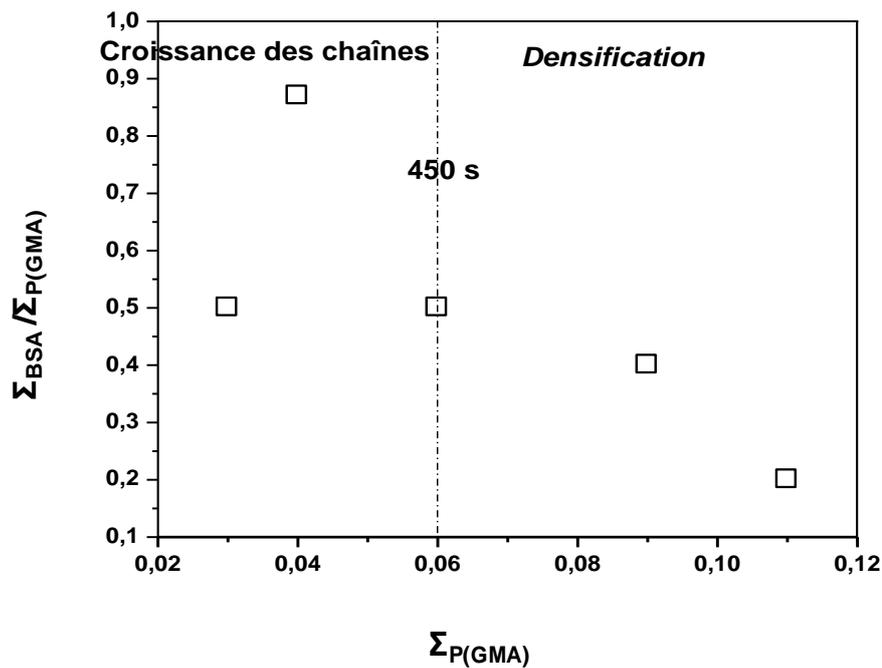


Figure 3.36 : Variation du rapport des densités de greffage de biomolécules d'albumine de sérum bovin et de chaînes de P(GMA) en fonction de la densité de chaînes greffées de P(GMA) pour des films minces de P(GMA) préparés par « grafting from » à partir d'une surface d'or fonctionnalisée par une couche vinylique. La tracé pointillé verticale délimite les deux zones relatives au modes d'augmentation de l'épaisseur optique des films minces de P(GMA) par croissance des chaînes et densification tels que déterminés à partir du tracé de la Figure 3.23.

Nous avons également choisi, pour évaluer l'efficacité de l'étape de reconnaissance entre l'albumine de sérum bovin greffée et l'anti-albumine de sérum bovin en solution, d'utiliser comme paramètres caractéristiques les densités de biomolécules. Le tracé de la **Figure 3.37** nous montre que la quantité d'anti-albumine de sérum bovin qui peut reconnaître l'albumine de sérum bovin greffée à la surface du film mince de P(GMA) dépend de la quantité de BSA, c'est-à-dire de son accessibilité. En effet le rapport $\Sigma_{anti-BSA} / \Sigma_{BSA}$ diminue lorsque Σ_{BSA} augmente et comme pour le cas de la Figure 3.36 l'effet s'accroît pour des valeurs plus importantes de Σ_{BSA} .

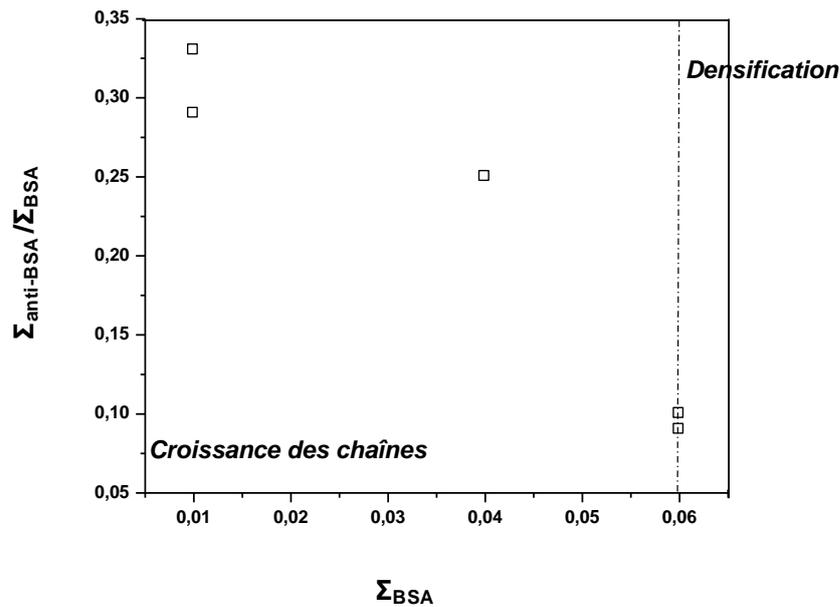


Figure 3.37 : Variation du rapport des densités de biomolécules d'anti-BSA et de biomolécules de BSA en fonction de la densité de greffage de BSA pour des films minces de P(GMA) préparés par « grafting from » à partir d'une surface d'or fonctionnalisée par une couche vinylique. La tracé pointillé verticale délimite les deux zones relatives au modes d'augmentation de l'épaisseur optique des films minces de P(GMA) par croissance des chaînes et densification tels que déterminés à partir du tracé de la Figure 3.23.

Les résultats discutés précédemment révèlent peu de différences majeures entre les capacités de greffage en albumine de sérum bovin (Σ_{BSA}) et l'efficacité de la reconnaissance d'antigène greffé par l'anticorps ($\Sigma_{anti-BSA}$) en solution qui est injecté au contact de l'interface de P(GMA) biofonctionnalisé par l'albumine de sérum bovin. La **Figure 3.38** montre une comparaison des courbes de réflectivité en fonction du temps correspondant à l'injection d'une solution d'anti-BSA (0,2 g/L) sur des films minces de P(GMA) préparés par la méthode du (trait fin) grafting onto et (trait épais) grafting from à partir d'une couche vinylique. Nous pouvons noter que malgré la différence de méthodes de préparation des films de P(GMA), la variation de la réflectivité (ΔR) qui exprime la quantité d'anti-BSA reconnue par la BSA est similaire pour les deux cas. Cependant, il semble que la préparation et donc la conformation des chaînes de P(GMA) greffées sur la surface influe sur le processus de reconnaissance moléculaire. En effet, lorsque nous comparons les courbes de réflectivité, nous pouvons noter que pour le capteur préparé avec la méthode du grafting onto, le temps nécessaire pour atteindre 90% de variation de la réflectivité observée dans le régime plateau est deux fois plus grande par rapport au cas où le capteur a été préparé par la

méthode du grafting from, dans laquelle le monomère est greffé à la surface avant la polymérisation. Cela peut indiquer une meilleure accessibilité des molécules de BSA fixées, comme si la couche de polymère se comportait comme un espaceur entre le capteur et les sondes (cibles), présentant ainsi une conformation plus souple.

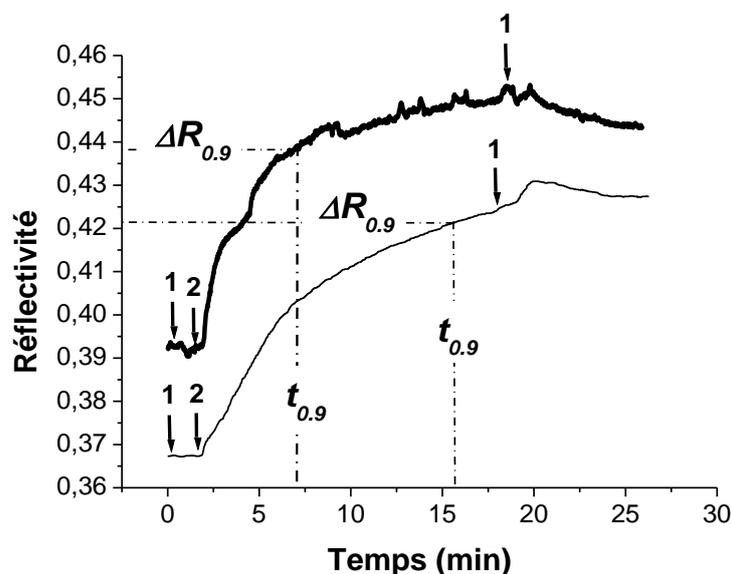


Figure 3.38 : Comparaison des courbes de réflectivité en fonction du temps correspondant à l'injection d'une solution d'anti-BSA (0,2 g/L) sur des films minces de P(GMA) préparés par la méthode du (trait fin) grafting onto et (trait épais) grafting from à partir d'une couche vinylique. Les flèches indiquent l'injection (1) de la solution d'anti-albumine de sérum bovin et (2)

Conclusions

Cette étude a permis de montrer l'influence de la méthode de synthèse utilisée pour fonctionnaliser la surface d'or par un film de poly(GMA). La méthode du « grafting from » s'avère être la plus adaptée si l'on désire obtenir un film polymère homogène et plus particulièrement l'utilisation d'une couche d'amorceur directement liée à la surface pour amorcer la polymérisation. En effet, les résultats ont montré que les films polymères préparés à partir de la couche d'amorceur sont plus denses et plus épais. Avec un choix judicieux des conditions de travail, toutes les techniques de greffage peuvent mener à l'obtention d'un film polymère épais de plus de 10 nm. La fonctionnalisation des films polymères obtenus par les différentes techniques par de l'octylamine ont révélé la réactivité persistante des fonctions époxydes. Dans un second temps, la biofonctionnalisation de ces films polymères a été réalisée par de l'albumine de sérum bovin (BSA), il a été montré que

les films préparés *via le grafting from* permettaient l'immobilisation d'une plus grande quantité de molécules de BSA. Cependant, il s'est avéré que la fixation en grand nombre de la BSA sur le film de poly(GMA) n'entraînait pas une meilleure efficacité de la reconnaissance moléculaire mais plutôt une perte de celle-ci. Les films poly(GMA) quelque soit la méthode de synthèse utilisée sont régénérables et ont une durée de vie d'au moins trois années sans aucune altération de notre film.

CHAPITRE 4

EFFET DE L'HYDROPHILIE DES FILMS POLYMERES SUR L'EFFICACITE DE LA RECONNAISSANCE MOLECULAIRE

4.1 Adsorption d'anti-albumine de sérum bovin sur des films minces à base de méthacrylate de glycidyle d'hydrophilie variable.....	115
4.1.1 Fonctionnalisation post-polymérisation d'un film mince de P(GMA) par l'éthanolamine.....	115
4.1.2 Immobilisation de films copolymères minces à base de méthacrylate de glycidyle par la méthode du grafting from à partir d'une couche vinylique.....	118
4.2 Etude des films copolymères à base de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide.	125
4.2.1 Détermination du taux d'incorporation d'acrylamide dans les films minces copolymères.	125
4.2.2 Biofonctionnalisation des films minces à base de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide greffés par l'albumine de sérum bovin.	129
4.2.3 Evaluation des propriétés immunoréceptrices de films minces à base de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide biofonctionnalisés par l'albumine de sérum bovin.	134
4.3 Etude des films copolymères minces préparés par grafting from à partir d'une couche d'amorceur via le cogreffage successif de poly(méthacrylate de glycidyle) et de poly(acrylamide) par polymérisation radicalaire amorcée à partir de la surface.	136
4.4 Biofonctionnalisation de films minces de copolymères de méthacrylate de glycidyle et de méthacrylate de glycérol par l'albumine de sérum bovin et évaluation des propriétés immunoréceptrices	138
4.4.1 Stratégie biofonctionnalisation par greffage de l'albumine de sérum bovin par réaction avec les fonctions époxyde du méthacrylate de glycidyle.....	138
4.4.2 Stratégie biofonctionnalisation par greffage de l'albumine de sérum bovin par réaction avec les fonctions hydroxyle du méthacrylate de glycérol après activation....	140
Conclusions	144

L'introduction d'hydrophilie lors de la fonctionnalisation d'une surface a souvent été un moyen d'éviter ou de diminuer les interactions non-spécifiques entre les biomolécules et la surface. En effet, les protéines ou les cellules ont tendance à s'adsorber sur une surface sans la présence d'un récepteur spécifique et cette adsorption est d'autant plus importante que la surface présente un caractère hydrophobe marqué. L'objectif ici est de préparer des interfaces copolymères qui présentent un double caractère. D'une part ces films minces doivent présenter une réactivité vis-à-vis d'espèces nucléophiles faibles telles que les protéines tout en minimisant, ou mieux empêchant, les interactions non-spécifiques avec ces dernières. L'incorporation d'un comonomère hydrophile doit permettre de mimer le rôle du tween utilisé précédemment pour les tests d'immunocapture réalisés avec les films minces de P(GMA). L'un des moyens les plus usités est l'utilisation de dérivés d'éthylène glycol¹⁶⁶⁻¹⁷⁰ autant pour les SAM que pour les films polymères.

Dans cette partie, nous décrirons dans un premier temps les différentes stratégies que nous avons envisagées pour l'élaboration de films minces de copolymères de méthacrylate de glycidyle et nous montrerons l'effet du caractère hydrophile de ces films minces copolymères sur les interactions non-spécifiques qui existent entre l'anti-albumine de sérum bovin que nous avons sélectionné comme biomolécule cible modèle et les différents films copolymères. Les méthodes de préparation de ces films copolymères reposent (i) sur la fonctionnalisation post-polymérisation d'un film mince de P(GMA) préparé par la méthode du *grafting from* à partir d'une couche vinylique, (ii) sur la copolymérisation du méthacrylate de glycidyle avec un comonomère hydrophile tel que le méthacrylate de glycérol ou l'acrylamide par la technique du *grafting from* à partir d'une couche vinylique.

Dans un second temps nous évaluerons la capacité de greffage d'albumine de sérum bovin de chacun des films minces à base de copolymères de méthacrylate de glycidyle et nous évaluerons également les performances de reconnaissance spécifique de ces interfaces copolymères afin d'évaluer l'influence de l'hydrophilie des films sur les propriétés de reconnaissance de l'anti-albumine de sérum bovin en solution par l'albumine de sérum bovin greffée sur les surfaces copolymères.

4.1 Adsorption d'anti-albumine de sérum bovin sur des films minces à base de méthacrylate de glycidyle d'hydrophilie variable.

Deux méthodes distinctes ont été mises en œuvre pour élaborer des films minces hydrophiles à partir d'une surface d'or fonctionnalisée par une couche d'unités polymérisables vinyliques. Nous avons envisagé successivement la modification chimique post-polymérisation d'un film de P(GMA) par réaction avec une monoamine aliphatique hydroxylée ainsi que la copolymérisation du GMA avec différents comonomères hydrosolubles.

4.1.1 Fonctionnalisation post-polymérisation d'un film mince de P(GMA) par l'éthanolamine.

Une première méthode que nous avons envisagée afin d'apporter de l'hydrophilie au film mince de P(GMA) consiste à le modifier par aminolyse (**Figure 4.1**). L'ouverture du cycle époxyde par réaction avec une solution d'éthanolamine doit conduire à l'incorporation de deux fonctions hydroxyle par unité monomère. Le greffage direct de l'albumine de sérum bovin n'est pas envisageable et nécessitera donc l'activation préalable des hydroxyles par le 1,1'-carbonyl-diimidazole.

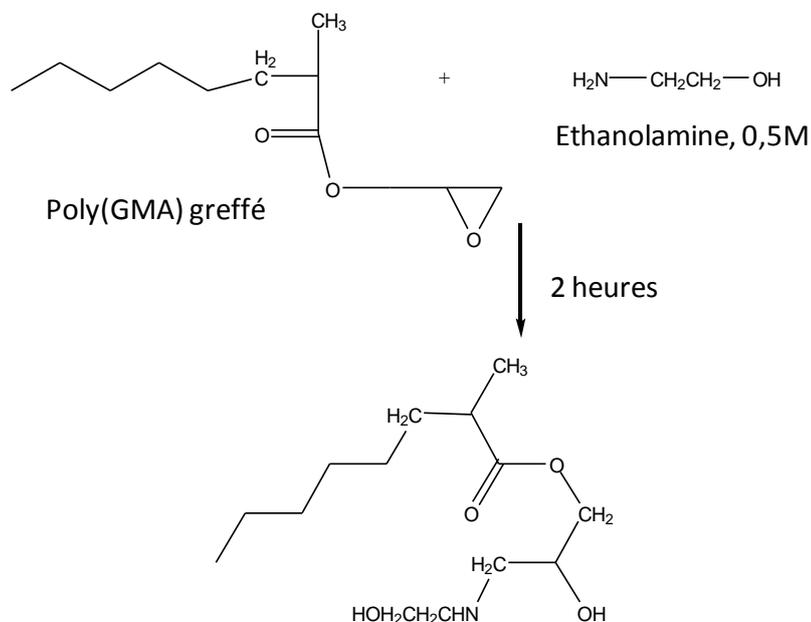


Figure 4.1: Schéma réactionnel de la modification du P(GMA) par l'éthanolamine.

Cette approche a été réalisée sur un film de P(GMA) préparé par la méthode du *grafting from* dont la polymérisation a été photo-amorçée à partir d'une couche vinylique. Un temps de photopolymérisation de 600 secondes a été sélectionné ce qui correspond à un film d'épaisseur optique de 9 nm.

Nous avons pu suivre la cinétique de la réaction d'ouverture de l'époxyde par l'éthanolamine de façon indirecte par des mesures dynamiques de résonance de plasmon de surface. En effet l'ouverture du cycle époxyde fournit des fonctions hydroxyle à la surface du film ce qui doit accroître fortement l'hydrophilie du film. Par ailleurs, il est bien connu que les protéines s'adsorbent fortement de façon non-spécifique sur des surfaces hydrophobes. Nous avons donc évalué l'adsorption non-spécifique de l'anti-albumine de sérum bovin en suivant par des mesures en temps réel l'adsorption in situ de l'anti-albumine de sérum de bovin sur des films minces de P(GMA) fonctionnalisés par l'éthanolamine pour des temps différents de réaction. Le choix de l'anti-albumine de sérum bovin pour évaluer les propriétés anti-fouling des films des P(GMA) après fonctionnalisation par réaction d'ouverture de cycle est motivé par le fait qu'il s'agit de la molécule cible utilisée au cours de cette étude pour évaluer les propriétés de reconnaissance des interfaces immunoréceptrices. D'autre part cette biomolécule a une masse molaire élevée bien supérieure à celle de l'albumine de sérum bovin (150 000 g/mol) ce qui laisse envisager une détection aisée par des mesures optiques par résonance de plasmon de surface de l'adsorption, même limitée, de l'anti-l'albumine de sérum bovin sur des films polymères. La fonctionnalisation des films minces de P(GMA) a été réalisée par mise en contact des lames d'or greffées avec une solution aqueuse d'éthanolamine (0,5 M pH 8,5). Des temps de réaction de 30, 60 et 120 minutes ont été utilisés pour varier le taux de fonctionnalisation des films de P(GMA) et donc leur hydrophilie, c'est-à-dire leur résistance potentielle à l'adsorption de biomolécules. Cette propriété a été évaluée par des mesures en temps réel par résonance de plasmon de surface sous un flux d'une solution d'anti-albumine de sérum bovin de concentration égale à 0.2 mg/mL dans du tampon phosphate (10mM) de pH 7,4. L'observation de la diminution des interactions non spécifiques sur le film de P(GMA) modifié par l'éthanolamine est un bon indicateur d'une part de l'ouverture des fonctions époxyde, et donc du succès de la réaction de fonctionnalisation par aminolyse post-polymérisation et d'autre part de la modification des propriétés interfaciales du film de P(GMA). Les courbes de réflectivité enregistrées pour les trois films de P(GMA) fonctionnalisés par l'éthanolamine sont montrées dans la **figure 4.2**. Nous remarquons qu'avant traitement par l'éthanolamine, l'anti-albumine de sérum bovin présente une forte

affinité pour le film de P(GMA) ce qui se traduit par une forte augmentation du niveau de réflectivité qui reste constant après rinçage par la solution tampon. Nous remarquons également que le traitement du film mince de P(GMA) par l'éthanolamine s'accompagne d'une atténuation de l'augmentation du signal de RPS lors du passage de la solution d'anti-albumine de sérum bovin. Nous pouvons également noter que cette atténuation du signal de RPS, et donc de l'adsorption non-spécifique de l'anti-albumine de sérum bovin dépend fortement du temps utilisé pour la fonctionnalisation du film mince de P(GMA) par l'éthanolamine. En effet, le niveau net de réflectivité mesuré après fonctionnalisation est d'autant plus faible que la durée de greffage de l'éthanolamine est importante. Après deux heures de réaction entre l'éthanolamine et les fonctions époxyde du film, on n'observe plus d'interactions non spécifiques entre l'anti-albumine de sérum bovin et le film de P(GMA) modifié par l'éthanolamine. Ceci se traduit sur la **Figure 4.2** par une variation nulle de la réflectivité. Une analyse plus fine des tracés de résonance de plasmon de surface de la **Figure 4.2** permet d'évaluer la cinétique d'adsorption initiale qui est représentative de la cinétique d'adsorption de l'anti-albumine de sérum bovin sur une interface. Les expériences d'adsorption l'anti-albumine de sérum bovin sur des interfaces d'homopolymère de méthacrylate de glycidyle et de copolymères de méthacrylate de glycidyle modifiés chimiquement par l'éthanolamine ont été réalisées avec la même solution d'anticorps. De ce fait, la forte et brutale augmentation du signal de résonance de plasmon de surface observée initialement avec la lame d'or greffée par un film de P(GMA) montre que dans les conditions de concentration choisies, la cinétique d'adsorption de l'anti-albumine de sérum bovin n'est pas limitée par des phénomènes de transfert de masse. Ceci nous permet d'affirmer que le comportement d'adsorption observé avec les interfaces à base de méthacrylate de glycidyle greffé par l'éthanolamine résulte de la nature chimique du film mince. Nous remarquons que la cinétique d'adsorption initiale, c'est-à-dire la pente initiale de l'évolution de la réflectivité diminue lorsque le temps de réaction de l'éthanolamine augmente. Par ailleurs, pour le film obtenu après le temps de réaction le plus faible, c'est-à-dire 30 minutes, nous remarquons qu'après rinçage avec la solution de tampon phosphate ne contenant pas d'anti-albumine de sérum bovin, le niveau de réflectivité diminue et se stabilise après quelques minutes. Ce phénomène suggère une désorption des molécules d'anti-albumine de sérum bovin qui sont faiblement adsorbées à l'interface copolymère. La variation nette de réflectivité représente les molécules d'anti-albumine de sérum bovin qui sont fortement adsorbées à l'interface copolymère. Pour un temps de réaction de 60 minutes le rinçage avec la solution tampon après l'adsorption de l'anti-albumine de sérum bovin

n'engendre qu'une très faible diminution du signal de réflectivité. Cette dernière peut être attribuée comme précédemment soit à la désorption des biomolécules qui présentent des interactions faibles avec le film mince de copolymère, soit à un changement de l'épaisseur du dépôt d'anticorps du fait de la lente réorganisation interfaciale des molécules d'anticorps. Pour des rinçages dynamiques jusqu'à 60 minutes (résultats non montrés sur la **Figure 4.2**) nous n'avons pas observé de diminution supplémentaire du niveau de réflectivité ce qui suggère qu'il ne s'agit pas d'un processus de désorption continue. Des phénomènes similaires ont déjà été observés pour l'adsorption de protéines hydrophobes et ont été attribués à la dénaturation et à l'étalement de la protéine sur la surface¹⁷¹.

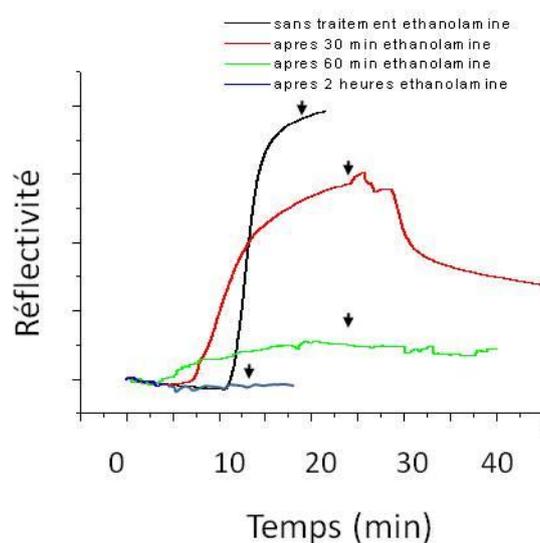


Figure 4.2: Mesures dynamiques par résonance des plasmons de surface montrant la cinétique d'adsorption de l'anti-albumine de sérum bovin ($[anti-BSA] = 0,2$ mg/mL, PBS, pH = 7,4) sur des films minces de P(GMA) fonctionnalisés par l'éthanolamine pendant des temps de réaction de 30, 60 et 120 minutes. Le tracé de RPS mesuré pour une interface sans traitement à l'éthanolamine montre l'adsorption non-spécifique de l'anti-albumine de sérum bovin sur un film mince de P(GMA).

4.1.2 Immobilisation de films copolymères minces à base de méthacrylate de glycidyle par la méthode du grafting from à partir d'une couche vinylique.

Comme alternative à la méthode de fonctionnalisation post-polymérisation d'un film mince de P(GMA) par aminolyse, nous avons également cherché à élaborer des films réactifs et hydrophiles par copolymérisation du méthacrylate de glycidyle avec le méthacrylate de glycérol ou l'acrylamide. Dans les deux cas, la polymérisation a été réalisée

à partir d'une couche polymérisable, de type vinylique immobilisée sur un substrat d'or *via* les réactions successives de chimisorption de la cystéamine et de greffage du chlorure d'acryloyle (voir paragraphe 3.A.2.1), en présence d'un mélange réactionnel contenant les deux monomères et l'amorceur de polymérisation radicalaire.

4.1.2.1 *Cas de films copolymères minces à base de méthacrylate de glycidyle et de méthacrylate de glycérol (GMAOH).*

La copolymérisation du méthacrylate de glycidyle et du méthacrylate de glycérol a été décrite dans la littérature pour la préparation de brosses polymères possédant une forte affinité avec des milieux environnants aqueux tout en permettant le greffage de biomolécules. En effet, les fonctions époxyde permettent d'envisager le greffage des biomolécules variées telles que des enzymes dans des conditions douces, tandis que la présence de diols au sein de la chaîne polymère permet un bon déploiement des chaînes en solution aqueuse. Ces systèmes ont été utilisés pour modifier chimiquement des microsphères magnétiques et permettre le greffage d'enzymes telles que la pénicilline acylase¹⁷². Les auteurs ont montré que l'apport de flexibilité et d'hydrophilie dans la structure polymère permettait d'améliorer la diffusion d'espèces biomoléculaires au sein des films.

Le méthacrylate de glycérol est issu de l'ouverture en milieu acide du cycle époxyde. Nous nous sommes inspirés du protocole de Refojo *et al.*¹⁷³ Pour cela le GMA et mis en contact avec une solution aqueuse acide et l'ensemble est mis à agiter durant six jours. Au cours de la réaction, on voit apparaître deux phases l'une contenant le méthacrylate de glycérol, la seconde le méthacrylate de glycidyle qui n'a pas réagi. Le rendement de la réaction est de 96 %.

Bien que le méthacrylate de glycérol soit hydrosoluble, l'homopolymérisation de celui-ci en phase aqueuse conduit à la formation d'un hydrogel de façon similaire à ce qui est classiquement observé avec le méthacrylate de 2-hydroxyéthyle. La copolymérisation du méthacrylate de glycidyle et du méthacrylate de glycérol a été réalisée en solution dans l'éthanol à partir de mélanges réactionnels contenant des proportions différentes en comonomères. Le greffage a été réalisé pour des temps de photopolymérisation compris entre 3 et 5 min. Dans ces conditions les films présentent une épaisseur optique comprise entre 4 et 6 nm. Ces temps de photo-irradiation ont été choisis sur la base d'expériences préliminaires qui ont montré que pour des temps de polymérisation supérieurs à 7 min, il y a

formation d'un gel qui emprisonne le substrat d'or ne permettant pas la préparation de films minces.

Pour valider la possibilité d'apporter de l'hydrophilie au sein des films copolymères de méthacrylate de glycidyle par copolymérisation avec le méthacrylate de glycérol, l'adsorption de l'anti-albumine de sérum bovin a été évaluée pour les copolymères préparés à partir de différents mélanges réactionnels. La plus forte réponse RPS obtenue pour des mélanges initiaux riches en méthacrylate de glycidyle indique que la résistance à l'adsorption non spécifique des films est directement reliée à la composition du film qui dans le cas de préparation de copolymères statistiques, doit être reliée à la teneur en chacun des comonomères dans le mélange de polymérisation. Selon l'hypothèse que la nature méthacrylate identique des deux comonomères leur confère une réactivité assez proche il est raisonnable de considérer que, même si la composition finale de l'interface copolymère est différente de celle du mélange initial de polymérisation, le taux d'incorporation en méthacrylate de glycérol et donc l'hydrophilie du film mince copolymère, augmente avec la quantité de méthacrylate de glycérol présente initialement. Dans ce contexte il semble que l'incorporation d'une entité moléculaire hydrophile au sein d'un film mince à base de méthacrylate de glycidyle *via* un processus de copolymérisation radicalaire à partir d'une couche vinylique permet de modifier efficacement la balance hydrophile/hydrophobe du revêtement.

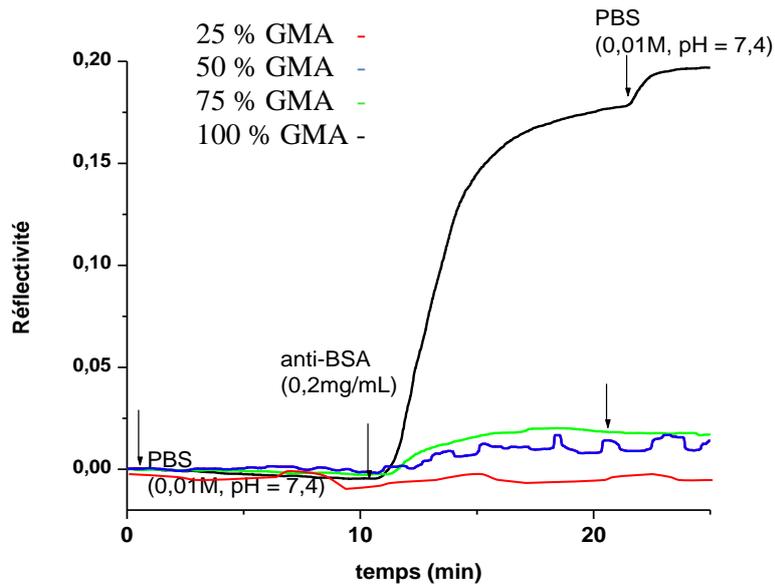


Figure 4.3: Mesures dynamiques par résonance des plasmons de surface montrant la cinétique d'adsorption de l'anti-albumine de sérum bovin ($[anti-BSA] = 0,2 \text{ mg/mL}$, PBS, $pH = 7,4$) sur des films minces de copolymères de méthacrylate de glycidyle et de méthacrylate de glycérol préparés par grafting from à partir d'une couche vinylique et à partir de mélanges de polymérisation de teneur variable en comonomères. Le tracé de RPS mesuré pour une teneur égale à zéro en méthacrylate de glycérol montre l'adsorption non-spécifique de l'anti-albumine de sérum bovin sur un film mince de P(GMA).

4.1.2.2 Cas de films copolymères minces à base de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide.

La copolymérisation radicalaire du méthacrylate de glycidyle avec l'acrylamide a généralement été utilisée pour préparer des hydrogels réticulés réactifs. Des structures monolithiques terpolymères de poly(méthacrylate de glycidyle-co-acrylamide-co-diméthacrylate d'éthylène glycol) ont ainsi été préparées par copolymérisation radicalaire en présence d'un agent porogène¹⁷⁴. Le greffage ultérieur de trypsine a permis la préparation de bioréacteurs performants. Le maintien de l'activité enzymatique de la trypsine après greffage a été prouvé par des expériences de digestion peptidique. La copolymérisation du méthacrylate de glycidyle et de l'acrylamide a été réalisée en solution dans l'éthanol à partir d'une couche vinylique pour des temps de photopolymérisation de 3 à 5min. Des

conclusions identiques à celles tirées à partir des tracés de résonance de plasmon de surface montrés dans les figures 4.2 et 4.3 peuvent être déduites de la **Figure 4.4**. En d'autres termes, la résistance à l'adsorption de l'anticorps est fortement dépendante de la nature chimique de l'interface copolymère c'est-à-dire de la composition initiale du mélange de polymérisation. Pour un film mince préparé à partir d'un mélange de polymérisation contenant 75% d'acrylamide, nous remarquons que le passage de la solution d'anti-albumine de sérum bovin ne s'accompagne d'aucun changement du niveau de réflectivité. De la même façon que pour les copolymères incorporant du méthacrylate de glycérol, la variation nette de réflectivité, qui correspond à la quantité d'anticorps adsorbée de façon stable sur le film copolymère diminue lorsque la teneur en acrylamide dans le mélange initial augmente.

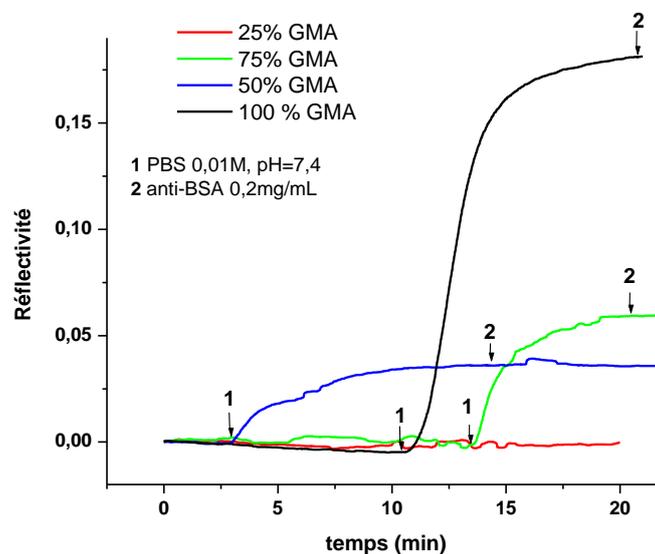


Figure 4.4: Mesures dynamiques par résonance des plasmons de surface montrant la cinétique d'adsorption de l'anti-albumine de sérum bovin ($[anti-BSA] = 0,2 \text{ mg/mL}$, PBS, $pH = 7,4$) sur des films minces de copolymères de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide préparés par grafting from à partir d'une couche vinylique et à partir de mélanges de polymérisation de teneur variable en comonomères. Le tracé de RPS mesuré pour une teneur égale à zéro en méthacrylate de glycérol montre l'adsorption non-spécifique de l'anti-albumine de sérum bovin sur un film mince de P(GMA).

A partir des résultats présentés ci-dessus, il apparaît que les trois stratégies employées permettent de modifier et contrôler la résistance de films minces à base de méthacrylate de glycidyle à l'adsorption de macromolécules biologiques telles que des anticorps. Les

résultats présentés dans les **Figures 4.2, 4.3 et 4.4** sont récapitulés dans la **Figure 4.5** sous la forme des évolutions de la variation de réflectivité nette.

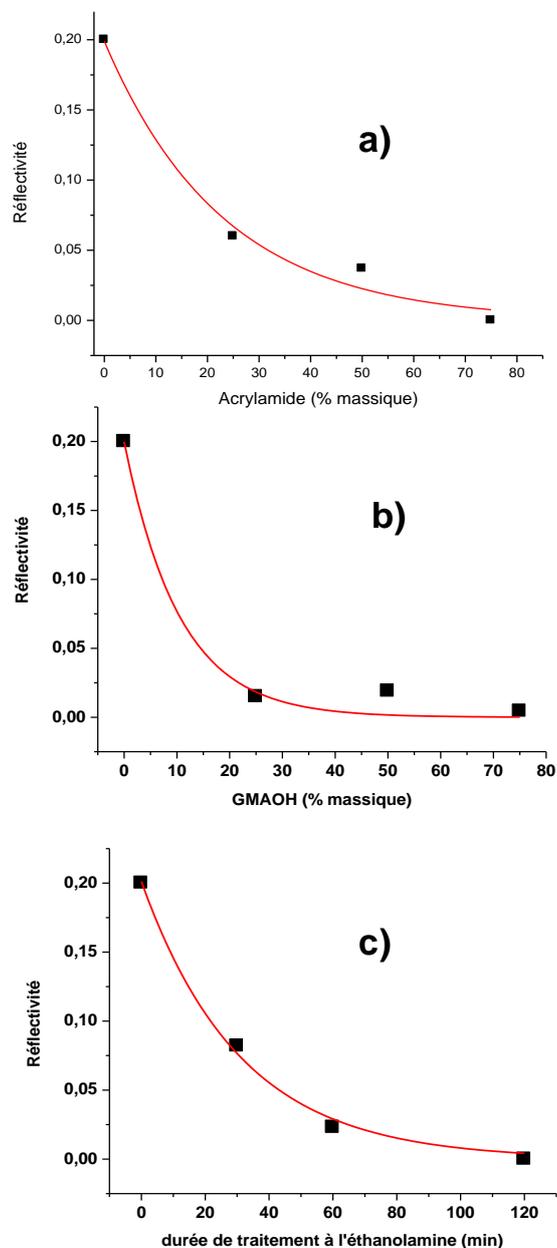


Figure 4.5: Evolution de la variation nette de réflectivité pour les différents films copolymères à base de méthacrylate de glycidyle. Dans les différents tracés, on considère que les conditions de préparation c'est-à-dire la composition initiale du mélange de polymérisation exprimée en pourcentage massique de comonomère (a-b) ou le temps de fonctionnalisation de films minces de P(GMA) par l'éthanolamine (c) contrôle la composition chimique des interfaces copolymères et donc leur balance hydrophile/hydrophobe.

Le phénomène de résistance à l'adsorption de l'anti-BSA est attribué au fait que le greffage post-polymérisation d'éthanolamine ainsi que la copolymérisation par grafting from du méthacrylate de glycidyle avec le méthacrylate de glycérol ou l'acrylamide comme comonomère, permet, par un choix judicieux du temps de réaction de greffage par aminolyse ou de la composition du mélange réactionnel de modifier et même contrôler efficacement et assez finement la balance hydrophile/hydrophobe des films copolymères résultants.

L'objectif du travail présenté dans ce quatrième chapitre étant de préparer des films minces réactifs et résistants à l'adsorption non spécifique de la molécule cible utilisée dans cette étude, il est important de vérifier que les copolymères préparés présentent toujours une réactivité marquée vis-à-vis d'espèces nucléophiles afin de pouvoir permettre le greffage des sondes biologiques d'albumine de sérum bovin. En effet, l'incorporation du comonomère conduit à une diminution du nombre de fonctions époxyde au sein du copolymère ce qui doit à priori affecter sa réactivité. A l'inverse, l'amélioration de la mouillabilité du film mince réactif doit, en favorisant l'interaction interfaciale entre les fonctions époxyde et les entités lysine terminale de l'albumine de sérum bovin, augmenter l'efficacité du greffage. L'étude de films minces organiques déposés sur des substrats métalliques nécessite la mise en œuvre de techniques expérimentales avancées. Dans la suite de cette étude, nous avons tiré profit de la présence d'atome d'azote dans la composition chimique de l'acrylamide et donc des films copolymères de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide pour étudier plus précisément la composition de ces films copolymères et établir des relations entre les conditions de synthèse des films minces, leurs caractéristiques physico-chimiques en termes de composition chimique, mouillabilité et capacité de greffage en albumine de sérum bovin. Les propriétés de ces interfaces immunoréceptrices ont ensuite été évaluées vis-à-vis de l'anti-albumine de sérum bovin afin d'essayer de mettre en évidence l'effet de la balance hydrophile/hydrophobe du film polymère jouant le rôle de bras espaceur entre la surface du transducteur et les sondes greffées. Il est important de signaler que les capacités de greffage en albumine de sérum bovin des films minces copolymères préparés par aminolyse et par copolymérisation du méthacrylate de glycérol ainsi que leurs propriétés de capture immunospécifique ont également été étudiées et seront présentés à la fin de ce chapitre.

4.2 Etude des films copolymères à base de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide.

4.2.1 Détermination du taux d'incorporation d'acrylamide dans les films minces copolymères.

Des films de poly (méthacrylate de glycidyle-*co*-acrylamide) ont été synthétisés sur la surface d'or à partir de la couche vinylique suivant le procédé décrit dans la partie précédente. Cette synthèse a été effectuée en solution dans l'éthanol avec une concentration massique totale en monomère constante. Trois différentes compositions de teneur en méthacrylate de glycidyle et acrylamide ont été testées pour préparer des films copolymères. Nous avons ainsi réalisé la copolymérisation de mélanges réactionnels contenant 75%, 50% ou 25% en masse d'acrylamide. L'épaisseur optique des différents films minces obtenus par copolymérisation photo-amorcée a été déterminée par modélisation des courbes plasmon. Comme indiqué dans le **Tableau 4.1**, les valeurs d'épaisseur varient entre 5 et 12 nm.

% massique d'acrylamide	épaisseur optique du film de P(GMA) (nm)	angle de contact (°)
0	7,6	72,5 ± 2
25	7,6	59,3 ± 2
50	7,5	58,2 ± 3
75	12	62,4 ± 5

Tableau 4.1 : Valeurs des épaisseurs optiques et des angles de contact mesurées avec une goutte d'eau en fonction du pourcentage massique d'acrylamide dans le mélange réactionnel (les valeurs d'angle de contact correspondent à la moyenne de cinq mesures).

Afin de corroborer les résultats présentés dans la **Figure 4.4** et de confirmer expérimentalement que le caractère résistant à l'adsorption non spécifique d'anti-albumine de sérum bovin est associé à la nature copolymère du film mince et donc à la modification des propriétés interfaciales, différentes techniques complémentaires de caractérisation ont été mises en œuvre. L'analyse des films par des mesures d'angle de contact peut donner des informations sur le caractère hydrophile/hydrophobe du film mince, en fonction de l'étalement de la goutte du fluide déposé et du caractère (a)polaire de ce dernier. Par ailleurs de telles mesures peuvent également donner des informations qualitatives sur le taux d'incorporation de l'acrylamide dans les films copolymères. En effet, l'hydrophile du film

doit croître avec la quantité d'acrylamide dans le film copolymère et a priori, plus les mélanges de polymérisation sont riches en acrylamide plus les films qui en résultent doivent être hydrophiles. Les résultats sont présentés dans la troisième colonne du **Tableau 4.1**. Nous constatons que les films copolymères de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide sont plus hydrophiles que les films de P(GMA). En effet, l'angle de contact mesuré pour une goutte d'eau passe de $72,5^\circ$ pour le film homopolymère de P(GMA) à une valeur de $62,4^\circ$ pour le film copolymère qui contient 75 % d'acrylamide. Cette diminution d'angle de contact traduit un meilleur étalement de la goutte d'eau lorsque le mélange de polymérisation contient de l'acrylamide. Ce résultat est une preuve indirecte de l'incorporation du comonomère d'acrylamide.

La composition chimique de films minces peut être étudiée plus précisément par différentes méthodes spectroscopiques. Par analyse par PM-IRRAS du film de poly(GMA-*co*-acrylamide) préparé à partir d'un mélange réactionnel de composition 50/50 en masse, nous observons les modes de vibration suivants : la bande d'élongation du groupe carbonyle C=O du méthacrylate de glycidyle (autour de 1730 cm^{-1}) ainsi que les bandes d'élongation de l'amide primaire à 3310 cm^{-1} et 3170 cm^{-1} et de la fonction carbonyle de l'acrylamide vers 1670 cm^{-1} , les vibrations d'élongation de la liaison C-H sont également visibles entre 2960 cm^{-1} et 2850 cm^{-1} (**Figure 4.6**). En comparant le pic de la fonction carbonyle du méthacrylate de glycidyle à celui de la fonction carbonyle de l'acrylamide, nous pouvons estimer la composition chimique en surface du copolymère. Nous en déduisons ainsi une composition en surface de 40 % en acrylamide et 60 % en méthacrylate de glycidyle. Ce résultat indique que le méthacrylate de glycidyle a une réactivité légèrement plus élevée que l'acrylamide et s'incorpore donc plus rapidement dans le copolymère que l'acrylamide.

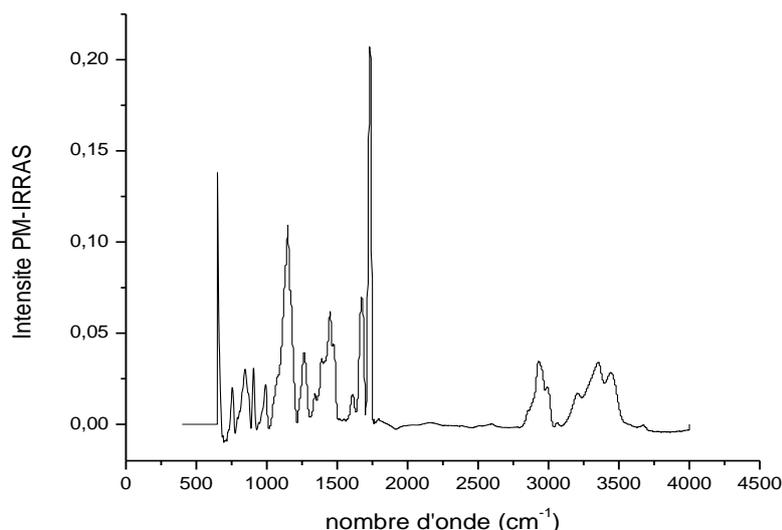


Figure 4.6 : Spectre PM-IRRAS réalisé dans la zone 4000 à 1000 cm^{-1} sur un film de poly (méthacrylate de glycidyle-co-acrylamide) préparé par grafting from à partir d'une composition en masse de 50/50 GMA/Acrylamide.

Afin d'évaluer quantitativement le taux d'incorporation de l'acrylamide dans les films de copolymère, la technique de spectrométrie de photoélectrons X a été utilisée comme méthode complémentaire de caractérisation. Grâce aux mesures XPS, nous pouvons confirmer la présence des deux monomères à la surface. La **Figure 4.7** montre les zones caractéristiques des éléments chimiques analysés. Nous retrouvons les deux pics de l'or entre 82 et 92 eV, les signaux de l'azote N_{1s} à 404 eV ainsi qu'une bande complexe entre 292 et 282 eV. Cette bande est composée notamment du signal de la fonction carbonyle $C=O$ à 289 eV.

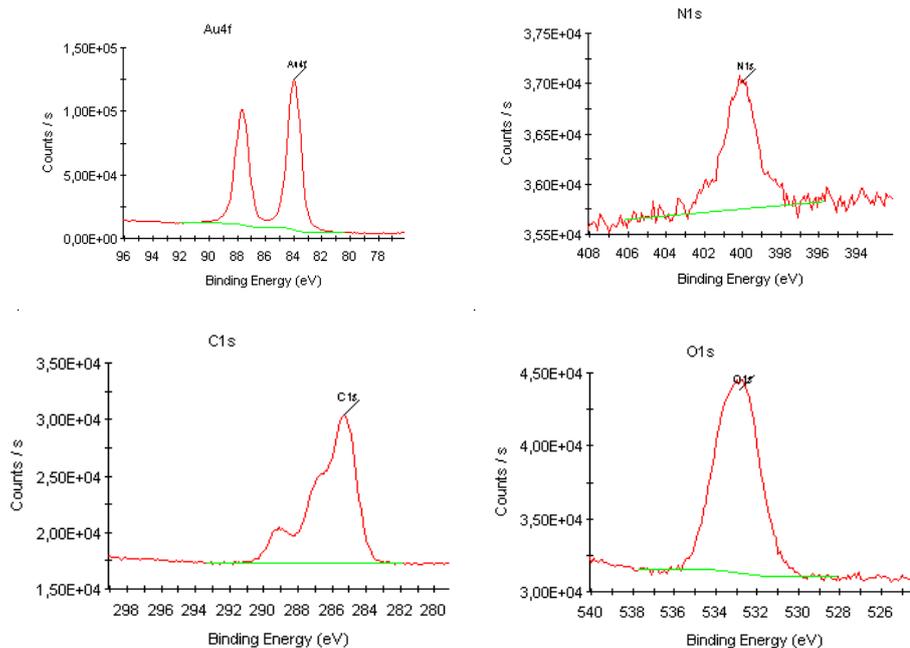


Figure 4.7 : Analyse par spectrométrie de photoélectrons X d'un film mince de copolymère méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide préparé par grafting from à partir d'une couche vinylique à partir d'un mélange réactionnel contenant 75 % de méthacrylate de glycidyle et 25 % d'acrylamide

En comparant les rapports du signal de l'azote et du signal de l'or, il est possible de déterminer une composition relative en azote pour chaque échantillon et donc d'établir une corrélation entre les propriétés de résistance à l'adsorption non spécifique des films copolymères et soit leur mouillabilité, évaluée par les mesures d'angle de contact, soit leur composition relative en acrylamide, évaluée par les mesures de spectrométrie de photoélectrons X.

% acrylamide en masse	% atténuation Au _{4f}	% atténuation N _{1s}	N _{1s} /Au _{4f}
25	22,6	2	0,11
50	9,6	4,1	0,43
75	2,38	1,9	1,25

Tableau 4.2 : Résultats de l'analyse quantitative par spectroscopie de photoélectrons X des films minces de copolymères de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide préparés par grafting from à partir d'une couche vinylique et à partir de mélanges réactionnels contenant différentes proportions massiques en comonomères.

Le **Tableau 4.2** montre que le taux d'incorporation en acrylamide augmente lorsque la teneur initiale en acrylamide dans le mélange réactionnel est plus importante. L'échantillon préparé à partir d'un mélange contenant 75 % d'acrylamide en masse est celui qui a le rapport N/Au le plus élevé de 1,25.

La **Figure 4.8** montre les variations de réflectivité et des rapports N/Au pour les différents films minces de copolymères à base de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide. On observe un comportement opposé pour ces deux grandeurs. En effet, lorsque la teneur en acrylamide du mélange de polymérisation augmente, nous notons que d'une part les valeurs de réflectivité diminuent alors que les valeurs des rapports N/Au augmentent. Ce comportement est bien la preuve que l'hydrophilie est apportée par l'incorporation de l'acrylamide dans le film copolymère.

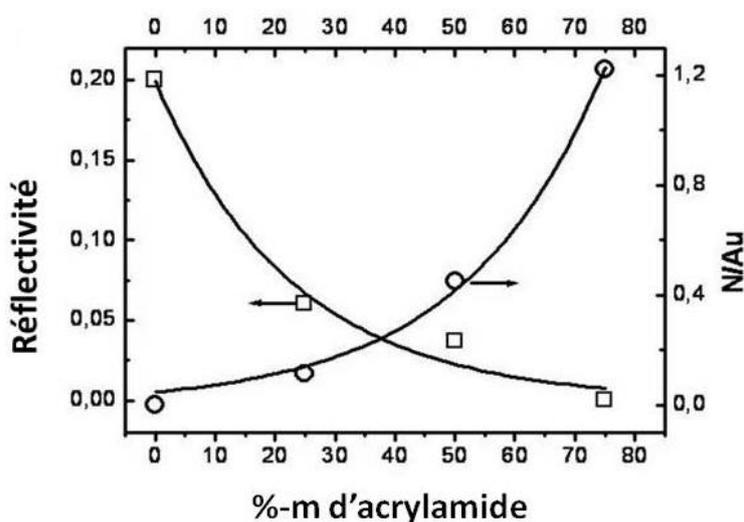


Figure 4.8 : Variation de la réflectivité nette mesurée pour l'adsorption non spécifique de l'anti-albumine de sérum bovin et du rapport N/Au déterminé par des mesures de spectroscopie de photoélectrons X pour les différents films minces à base de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide en fonction de la teneur en acrylamide du mélange de polymérisation.

4.2.2 Biofonctionnalisation des films minces à base de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide greffés par l'albumine de sérum bovin.

Les films polymères obtenus sont mis contact avec la solution de BSA à 4mg/mL durant trois jours. Pour des films de copolymères d'épaisseur similaire, l'influence de la composition en acrylamide sur la quantité de BSA greffée est étudiée. Les résultats sont répertoriés dans le **tableau 4.3**.

% acrylamide	épaisseur optique P(GMA) (nm)	épaisseur optique BSA (nm)	$\Gamma_{\text{théo,BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Gamma_{\text{exp,BSA}}$ (ng/mm ²)
75	12	7	7,5	5,7
50	7,5	9,9	10,4	7,9
25	7,6	3,1	3,2	2,5

Tableau 4.3 : Epaisseurs et quantité de BSA greffée en fonction de la composition en acrylamide du film copolymère, après mise en contact avec la solution de BSA (4mg/mL, PBS, pH =7,4) durant trois jours.

Au vu de ces valeurs, il apparaît que l'apport d'hydrophilie dans le film augmente sa capacité de fixation en BSA. En effet lorsque le film contient 75% d'acrylamide, son épaisseur optique est de 7 nm pour la couche de BSA et lorsque le film est uniquement constitué de P(GMA), l'épaisseur est de 1 nm pour la BSA. Il semble avoir une valeur maximum à la composition 50/50 en acrylamide et méthacrylate de glycidyle respectivement pour laquelle nous obtenons le plus grand déplacement du minimum de plasmon 1,418, (9,9 nm pour l'épaisseur de BSA) pour une même épaisseur de film polymère 7,6 nm (**Figure 4.9**). Ces observations sont en accord avec celles de Jeyachandran *et al.*¹²⁸ qui décrivent que l'adsorption de la BSA atteint une couverture de la surface de 50 % pour des surfaces hydrophobes, dans leur cas des surfaces de polystyrène, et celle-ci augmente jusqu'à une valeur de 95 % pour les surfaces hydrophiles de GeO₂. Malgré le fait que leur étude ait porté sur l'adsorption de la BSA, elle nous éclaire sur le comportement de la BSA sur nos films polymères. En effet, on peut supposer que dans un premier temps, il y ait une adsorption avec une orientation des molécules de BSA suivie dans un second temps du greffage de celles-ci.

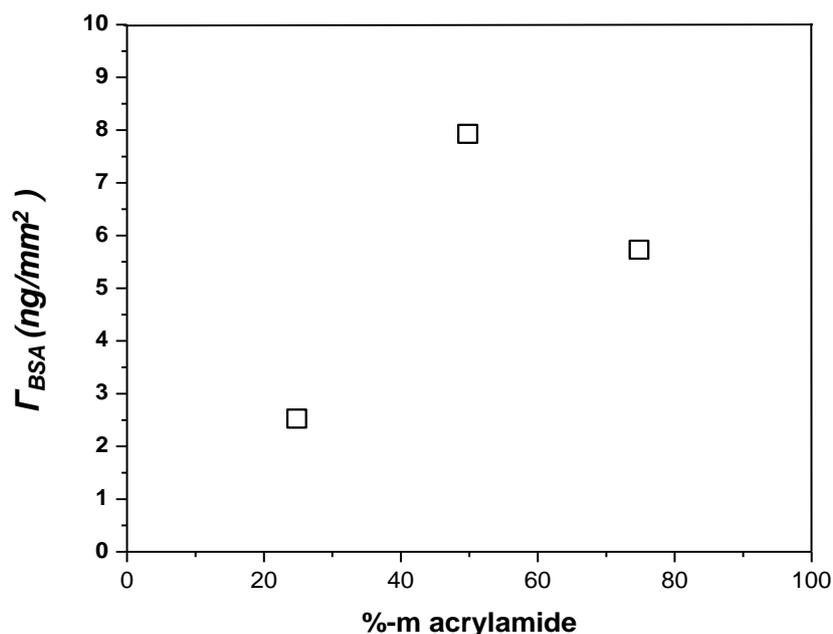


Figure 4.9 : Variation du taux de recouvrement surfacique (ng/mm²) en BSA en fonction du % massique d'acrylamide dans le mélange réactionnel.

La morphologie des films minces à base de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide a été analysée par microscopie à force atomique. Les résultats sont montrés dans les **Figures 4.10-13** pour les films copolymères préparés à partir de mélanges réactionnels contenant soit 75% en masse d'acrylamide (**Figures 4.10** et **4.11**) soit 25% en masse d'acrylamide (**Figures 4.12** et **4.13**). Les **Figures 4.11** et **4.13** correspondent à l'analyse de films minces greffés par l'albumine de sérum bovin.

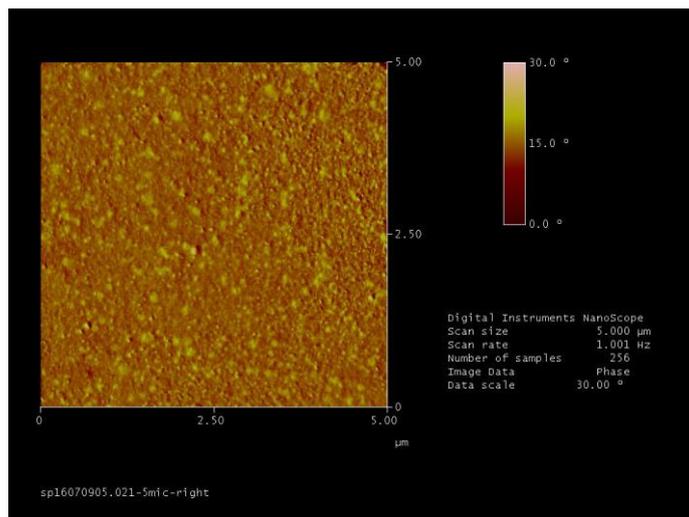


Figure 4.10 : Image de microscopie à force atomique d'un film mince de copolymère de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide préparé à partir d'un mélange de polymérisation contenant 75% en masse d'acrylamide.

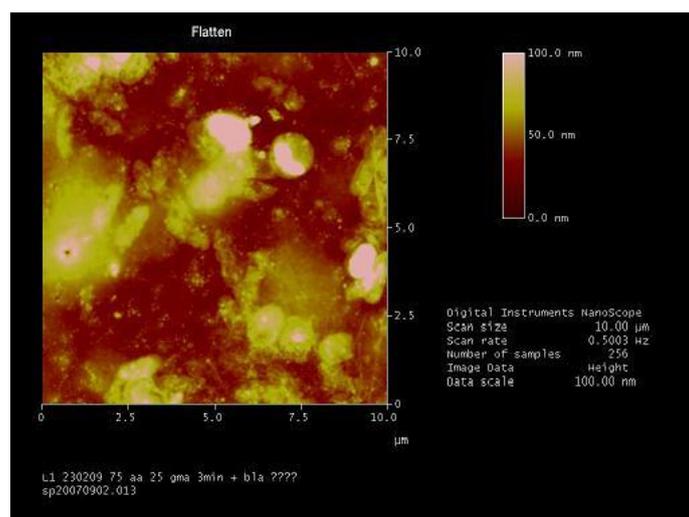


Figure 4.11 : Image de microscopie à force atomique d'un film mince de copolymère de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide préparé à partir d'un mélange de polymérisation contenant 75% en masse d'acrylamide et biofonctionnalisé par l'albumine de sérum bovin.

La morphologie des deux films minces copolymères est très comparable et suggère une morphologie assez uniforme ce qui est en accord avec la nature statistique des copolymères.

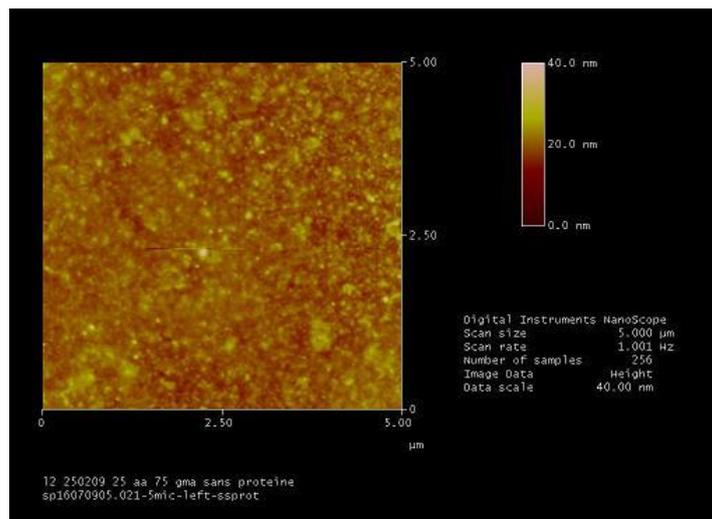


Figure 4.12 : Image de microscopie à force atomique d'un film mince de copolymère de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide préparé à partir d'un mélange de polymérisation contenant 25% en masse d'acrylamide.

Pour les images de microscopie à force atomique obtenues pour les films avec biofonctionnalisation avec l'albumine de sérum bovin, nous pouvons noter une importante modification de la morphologie. L'immobilisation de l'albumine de sérum bovin est indiquée par la présence de larges domaines. La comparaison des images présentées dans les **Figures 4.11** et **4.13** laisse supposer que la quantité d'albumine immobilisée par réaction avec les fonctions époxyde augmente avec le taux d'incorporation d'acrylamide dans le film mince. En effet, la **Figure 4.11** révèle la présence d'un plus grand nombre d'agrégats d'albumine de sérum bovin. De la même façon, il semble que la taille des agrégats soit d'autant plus grande que le film est riche en acrylamide.

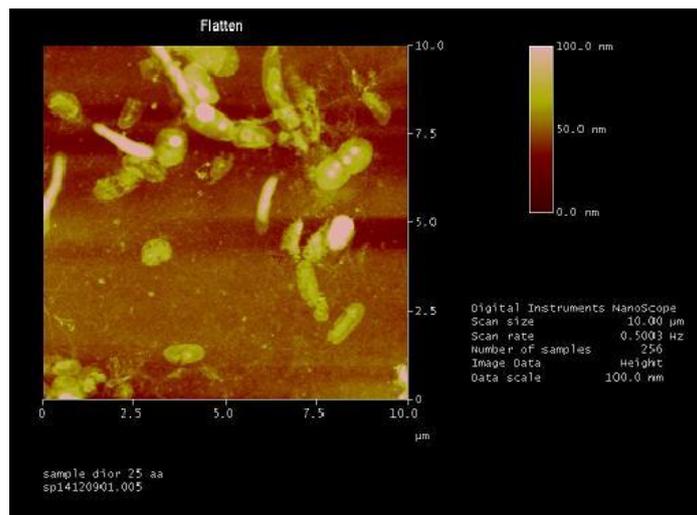


Figure 4.13 : Image de microscopie à force atomique d'un film mince de copolymère de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide préparé à partir d'un mélange de polymérisation contenant 25% en masse d'acrylamide et biofonctionnalisé par l'albumine de sérum bovin.

Cette analyse des images de microscopie à force atomique, bien que qualitative, est en bon accord avec les résultats de plasmon de surface présentés dans le **Tableau 4.3** et la **Figure 4.9**. En effet, par RPS nous avons déterminé un taux de recouvrement surfacique en albumine de sérum bovin plus important pour le film mince préparé avec un mélange de polymérisation contenant un pourcentage massique d'acrylamide de 75% soit $7,5 \text{ ng/mm}^2$ à comparer avec la valeur de $3,2 \text{ ng/mm}^2$ déterminée pour le film mince préparé avec un mélange de polymérisation contenant un pourcentage massique d'acrylamide de 25%.

4.2.3 Evaluation des propriétés immunoréceptrices de films minces à base de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide biofonctionnalisés par l'albumine de sérum bovin.

Une fois les lames fonctionnalisées par la BSA, nous avons procédé aux tests de reconnaissance moléculaire afin de vérifier l'activité de la BSA immobilisée sur la surface du film copolymère. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

% acrylamide	$\Gamma_{\text{théo,BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Gamma_{\text{exp,BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Gamma_{\text{anti-BSA}}$ (ng/mm ²)	$\frac{\Gamma_{\text{anti-BSA}}}{\Gamma_{\text{exp,BSA}}}$	$\frac{\Sigma_{\text{anti-BSA}}}{\Sigma_{\text{BSA}}}$
75	7,5	5,7	0,48	0,08	0,037
50	10,4	7,9	2,12	0,27	0,12
25	3,2	2,5	1,05	0,42	0,18

Tableau 4.4 : Valeurs des taux de recouvrement en BSA et anti-BSA pour des films minces à base de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide.

On note une diminution de l'activité de la BSA avec l'hydrophilie du film, malgré le fait que la quantité fixée soit importante. Ce comportement peut-être comparé à celui observé par Chen *et al.*¹³⁰ dans leur travail sur l'immobilisation de la lipase B *candida antarctica* (CALB) sur des films copolymères de poly(méthacrylate de glycidyle-co-méthacrylate de butyle-co-méthacrylate d'hydroxéthyle) où il montre que l'augmentation de l'hydrophilie de la surface du film de 42° à 55°, entraîne une diminution de l'activité de la CALB. Dans notre cas, nous observons le contraire, c'est la diminution de l'angle de contact de 72,5° à 62,4° qui entraîne la diminution de l'activité de la BSA. Par ailleurs, une augmentation supplémentaire de l'angle de contact de 55° à 63°, pousse la CALB à s'agréger dans leur cas, ceci pourrait expliquer le phénomène que nous observons. En effet l'introduction de 75 % d'acrylamide fait passer l'angle de contact passer de 58,2° à 62,4° cependant l'activité de la BSA décroît, son efficacité passe de 0,27 à 0,08, l'effet d'agréments de la BSA pourrait en être la cause.

La **Figure 4.14** montre une comparaison des mesures dynamiques par résonance de plasmon de surface correspondant la reconnaissance de la BSA par l'anti-BSA réalisées sur des films à base de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide (75%-m d'acrylamide dans le mélange réactionnel) biofonctionnalisés ou non par la BSA. Le tracé 1 correspond à un film copolymère mince qui n'a pas été fonctionnalisé par l'albumine de sérum bovin. L'absence de BSA à la surface du film combinée au caractère hydrophile de l'acrylamide n'entraîne pas d'adsorption d'anti-albumine de sérum bovin et donc de variation de la réflectivité. Dans le cas où le film mince a été fonctionnalisé par la BSA, l'injection d'anti-albumine de sérum bovin s'accompagne d'une variation de réflectivité c'est-à-dire d'une réaction d'immuno-reconnaissance.

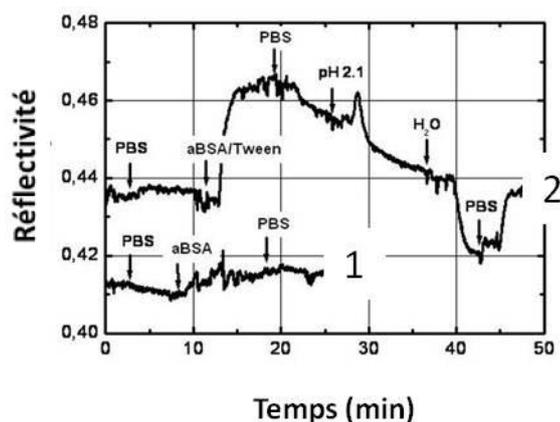


Figure 4.14 : Courbes de réflectivité en fonction du temps correspondant à l'injection d'une solution d'anti-BSA (0,2 g/L) sur des films minces à base de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide (75%-m d'acrylamide dans le mélange réactionnel) avant (tracé 1) et après (trait 2) greffage de l'albumine de sérum bovin.

4.3 Etude des films copolymères minces préparés par grafting from à partir d'une couche d'amorceur via le cogreffage successif de poly(méthacrylate de glycidyle) et de poly(acrylamide) par polymérisation radicalaire amorcée à partir de la surface.

Dans ce paragraphe, la synthèse de films minces poly (méthacrylate de glycidyle -*co*-acrylamide) à partir du 4-cyanopentanoate de 4,4'azobis (1,10-dimercaptodécyle) est présentée d'une manière peu étudiée dans la littérature. En fait, tout d'abord le méthacrylate de glycidyle est polymérisé en surface. Après un rinçage de la surface fonctionnalisée par le P(GMA), celle-ci est remise en contact avec une solution d'acrylamide puis l'on irradie à nouveau, on remarque la formation d'un précipité blanc en solution, preuve que la polymérisation de l'acrylamide est en route en solution. Le méthacrylate de glycidyle et l'acrylamide ont été polymérisés en solution dans l'éthanol. Ce procédé a été décrit par Hoffman et al.¹⁷⁵ dans lequel il montre qu'avec l'utilisation d'un amorceur de type AIBN sur une surface de silice, il arrive à créer un film copolymère. Il synthétise tout d'abord le film de polystyrène ensuite la polymérisation de l'acide méthacrylique est amorcée. En arrêtant la polymérisation du premier monomère, il reste de la place sur la surface afin que le second monomère puisse être accroché à la surface.

Nous avons tout d'abord obtenu un film de P(GMA) de 2,4 nm au bout d'une heure de polymérisation, sur lequel la polymérisation de l'acrylamide est ensuite amorcée. L'épaisseur optique obtenue après la seconde polymérisation est de 10,5 nm (**Figure 4.15**).

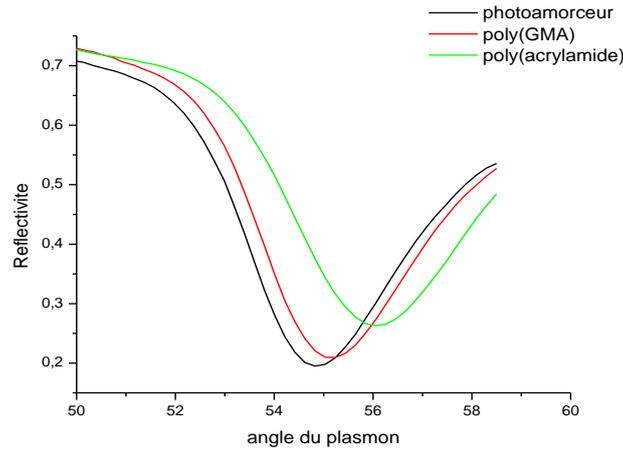


Figure 4.15: Comparaison des courbes plasmon mesurées après les différentes étapes du processus d'élaboration.

Cette polymérisation peut être comparée à celle réalisée également en solution dans l'éthanol mais cette fois en une étape à partir d'un mélange réactionnel contenant 50% en masse de méthacrylate de glycidyle et 50% en masse acrylamide. Dans ce cas une épaisseur optique de 6,5 nm a été déterminée pour le film mince.

Après mise en contact des films polymères avec la solution de BSA à 4mg/mL pendant 3 jours, nous obtenons pour le film avec polymérisations successives, une épaisseur de BSA de 1nm et pour le second film issu du mélange GMA et acrylamide, une épaisseur de 6 nm de BSA. Les films fonctionnalisés par la BSA sont ensuite soumis au test de reconnaissance moléculaire avec le passage de l'anticorps (anti-BSA) afin de mesurer l'activité de la BSA.

type de polymérisation	$\Gamma_{\text{théo,BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Gamma_{\text{exp,BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Gamma_{\text{anti-BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Gamma_{\text{anti-BSA}}/\Gamma_{\text{exp,BSA}}$	$\Sigma_{\text{anti-BSA}}/\Sigma_{\text{exp,BSA}}$
2 étapes	2,6	2	1,62	0,8	0,35
1 étape	6,5	5	1,52	0,3	0,13

Tableau 4.5 : Valeurs des taux de recouvrement en BSA et anti-BSA pour des films minces à base de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide préparés en 2 étapes (cogreffage d'homopolymères de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide) ou en 1 étape (copolymérisation de méthacrylate de glycidyle et d'acrylamide).

On remarque que le film copolymère synthétisé par les polymérisations successives a une meilleure efficacité de reconnaissance que celui obtenu avec la polymérisation en une seule étape. L'apport d'hydrophilie ne semble pas être le facteur limitant dans ce cas ci. En

effet lorsque nous comparons les valeurs d'angle de contact, la valeur de l'angle de contact d'un film synthétisé en « 1 étape » est de 65° tandis que celle du film issu de la polymérisation en 2 étapes est de 55° . La **Figure 4.16** montre la modification des propriétés interfaciales du film mince préparé par la méthode en étapes après le greffage de l'acrylamide. L'étalement plus important de la goutte après la deuxième étape polymérisation montre le greffage efficace de l'acrylamide d'une part et que d'autre part la présence de chaînes d'acrylamide permet d'accroître l'hydrophilie du film et donc que ces dernières sont effectivement à la surface du film en contact avec la goutte d'eau.

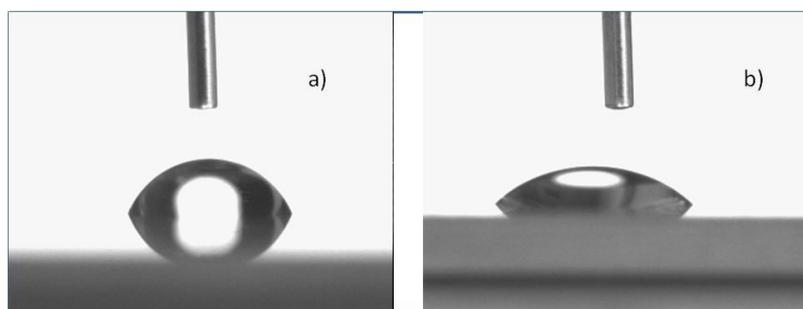


Figure 4.16 : Photographies de gouttes d'eau déposées après (a) la polymérisation du méthacrylate de glycidyle et (b) la polymérisation de l'acrylamide.

4.4 Biofonctionnalisation de films minces de copolymères de méthacrylate de glycidyle et de méthacrylate de glycérol par l'albumine de sérum bovin et évaluation des propriétés immunoréceptrices.

4.4.1 Stratégie biofonctionnalisation par greffage de l'albumine de sérum bovin par réaction avec les fonctions époxyde du méthacrylate de glycidyle.

Les films copolymères sont fonctionnalisés par de la BSA (4mg/mL dans du tampon phosphate pH 7,4) durant trois jours en nous appuyant sur la réactivité de la fonction époxyde du GMA.

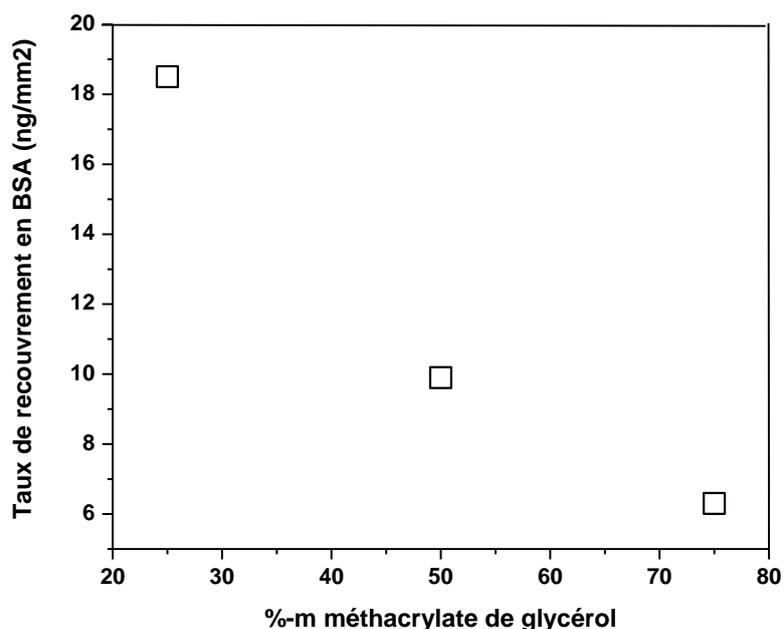


Figure 4.17 : Variation du taux de recouvrement surfacique (ng/mm^2) en BSA en fonction du % massique de méthacrylate de glycérol dans le mélange réactionnel.

On constate une diminution de la capacité de fixation en albumine de sérum bovin des films minces à base de méthacrylate de glycidyle et de méthacrylate de glycérol lorsque que la teneur en méthacrylate de glycérol du mélange de polymérisation augmente (**Figure 4.17**).

L'activité de la BSA sur ces films a ensuite été testée, en faisant des mesures dynamiques de RPS avec une solution d'anti-BSA (0,2 mg/mL) contenant du Tween. Les résultats sont présentés ci-dessous.

% GMAOH	$\Gamma_{\text{théo,BSA}}$ (ng/mm^2)	$\Gamma_{\text{exp,BSA}}$ (ng/mm^2)	$\Gamma_{\text{anti-BSA}}$ (ng/mm^2)	$\Gamma_{\text{anti-BSA}}/\Gamma_{\text{exp,BSA}}$	$\Sigma_{\text{anti-BSA}}/\Sigma_{\text{exp,BSA}}$
75	8,2	6,3	0,29	0,046	0,02
50	12,9	9,9	0,50	0,05	0,024
25	24,1	18,5	0,27	0,014	0,006

Tableau 4.6 : Valeurs des taux de recouvrement en BSA et anti-BSA pour des films minces à base de méthacrylate de glycidyle et de méthacrylate de glycérol.

A partir des tracés de la **Figure 4.18**, on remarque que plus il y a de BSA immobilisée sur la surface moins elle est active. Les propriétés de reconnaissance de la BSA semblent être altérées ce qui se traduit par une diminution de l'efficacité. Les conclusions

sont communes à celles observées lors de l'incorporation de l'acrylamide dans le film de P(GMA), notamment la formation d'agrégats de BSA à la surface du film. De plus l'altération de la BSA, au vu de nos résultats, paraît être plus importante et plus abrupte dans le cas du film contenant du GMAOH.

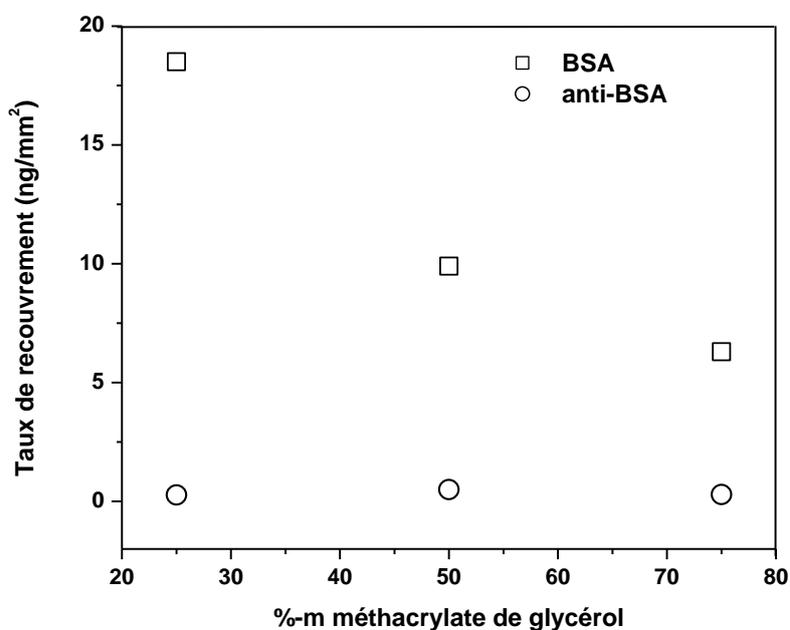


Figure 4.18 : Variation du taux de recouvrement en (carré) BSA et (rond) anti-BSA en fonction de la fraction massique de GMAOH.

4.4.2 Stratégie biofonctionnalisation par greffage de l'albumine de sérum bovin par réaction avec les fonctions hydroxyle du méthacrylate de glycérol après activation.

La deuxième stratégie que nous avons utilisée pour immobiliser la BSA de façon covalente sur le film de poly (GMA-co-GMAOH) consiste à activer la fonction hydroxyle du GMAOH par le 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) à 10g /L durant 6 heures (**Figure 4.19**). Les surfaces sont ensuite rincées au dioxane, à l'éthanol puis à l'eau avant d'être mises en contact avec la BSA à 4mg/mL toute la nuit.

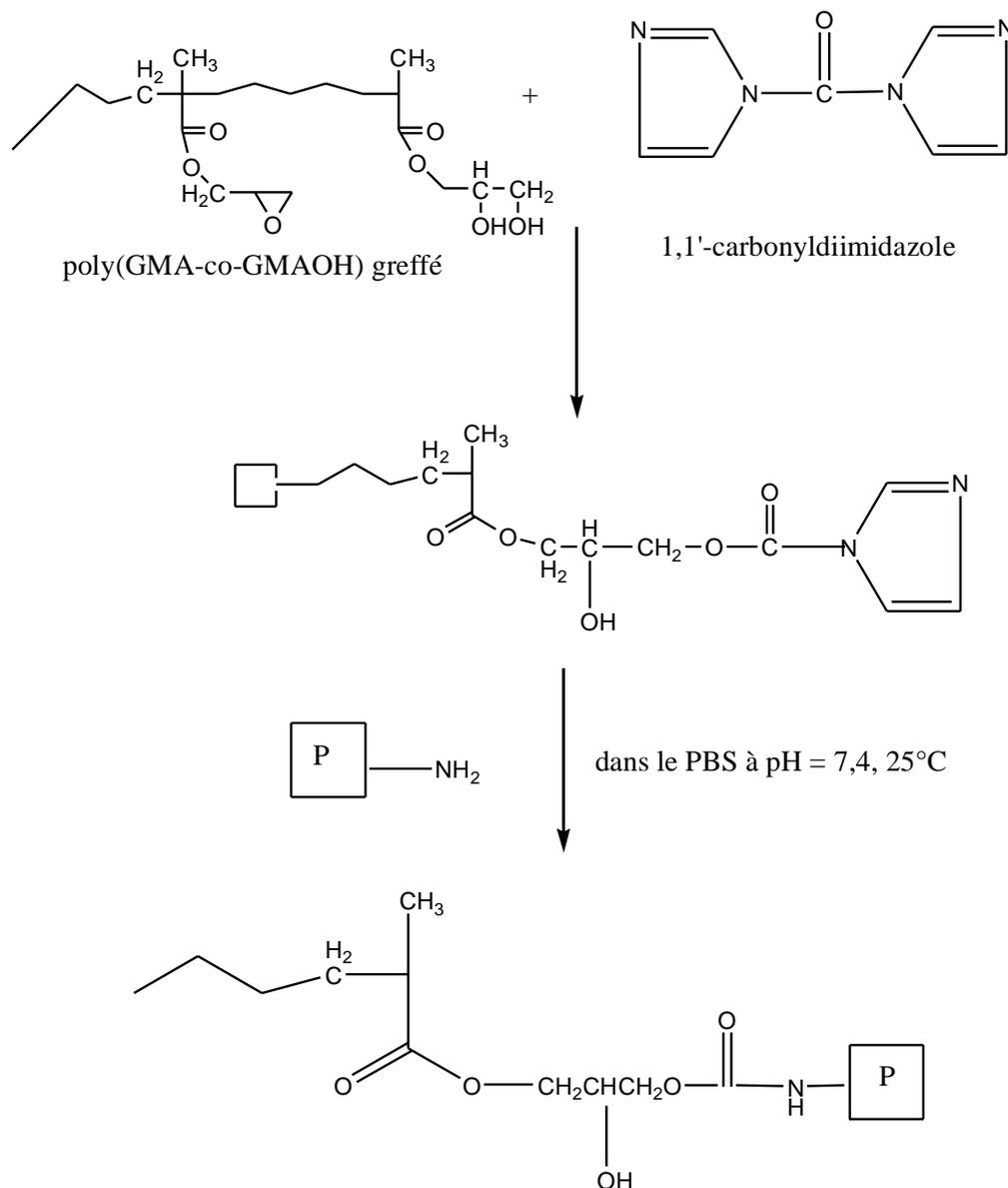


Figure 4.19 : Représentation schématique de l'immobilisation de l'albumine de sérum bovin sur des films minces à base de méthacrylate de glycidyle et de méthacrylate de glycérol après activation des fonctions hydroxyle du méthacrylate de glycérol par le 1,1'-carbonyldiimidazole.

La modification par le 1,1'-carbonyldiimidazole de la surface modifiée par de l'homopolymère de GMAOH pure entraîne une augmentation de la valeur de l'angle de contact de 44,9° à 64,9°. La valeur initiale de 44,9° montre bien la forte hydrophilie des film mince de P(GMAOH) alors que la valeur 64,9° indique d'une part le succès de l'activation des fonctions hydroxyle ainsi que le caractère plus hydrophobe du dérivé activé d'imidazole

Dans un premier temps, on remarque que les quantités de BSA fixées au bout d'une nuit sur les films minces à base de méthacrylate de glycidyle et de méthacrylate de glycérol selon la méthode impliquant le traitement avec le 1,1'-carbonyldiimidazole (voie 2) sont

moins importantes que celles obtenues par la stratégie de fixation sur le cycle époxyde (voie 1) pour toutes les compositions. (**Tableau 4.7**)

% GMAOH	$\Gamma_{1, \text{exp,BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Gamma_{2, \text{exp,BSA}}$ (ng/mm ²)
100	-	13,7
75	6,3	4
50	9,9	5,3
25	18,6	5

Tableau 4.7 : Récapitulatif des valeurs des taux de recouvrement en BSA pour des films minces à base de méthacrylate de glycidyle et de méthacrylate de glycérol suivant la voie choisie, voie 1 ; greffage sur les fonctions époxyde (BSA, 3jours), voie 2 greffage après traitement par le CDI (BSA, 1 nuit).

En comparant les films copolymères traités par le CDI, on constate que le film uniquement formé par le poly(GMAOH) immobilise le plus de BSA. Ceci est à l'inverse des résultats obtenus par la voie époxyde où le film pourvu de 25% de GMAOH avait la meilleure capacité de fixation de BSA. Par ailleurs, la variation de la capacité de fixation de BSA, pour les films de copolymères avec une teneur en GMAOH comprise entre 25% et 75%, est très faible.

Dans un second temps, nous avons testé les propriétés de reconnaissance de la BSA immobilisée sur ces films copolymères traités par le CDI afin de les comparer avec celles de la BSA fixée sur des films non traités par le CDI. Des cinétiques de reconnaissance moléculaire ont été réalisées par SPR, avec une solution d'anti-BSA à 0,2 mg/mL, tween 1%. Les valeurs sont regroupées dans le **Tableau 4.8**.

% GMAOH	$\Gamma_{1, \text{anti-BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Gamma_{1, \text{a-BSA}} / \Gamma_{\text{BSA}}$	$\Gamma_{2, \text{anti-BSA}}$ (ng/mm ²)	$\Gamma_{2, \text{anti-BSA}} / \Gamma_{\text{BSA}}$
75	0,29	0,046	1,2	0,3
50	0,5	0,05	2,24	0,42
25	0,27	0,014	2,85	0,57

Tableau 4.8 : Valeurs des taux de recouvrement en BSA et anti-BSA pour des films minces à base de méthacrylate de glycidyle et de méthacrylate de glycérol en fonction de la voie choisie pour le greffage de la BSA ; 1) voie époxyde (BSA, 3jours), 2) traitement CDI (BSA, 1 nuit).

Les résultats montrent clairement l'influence du traitement par le CDI des films minces à base de méthacrylate de glycidyle et de méthacrylate de glycérol en termes d'efficacité des propriétés de reconnaissance de la BSA envers son antigène. En effet les efficacités que nous obtenons entre 0,3 et 0,6 sont les meilleures de notre étude (**Figure 4.20**).

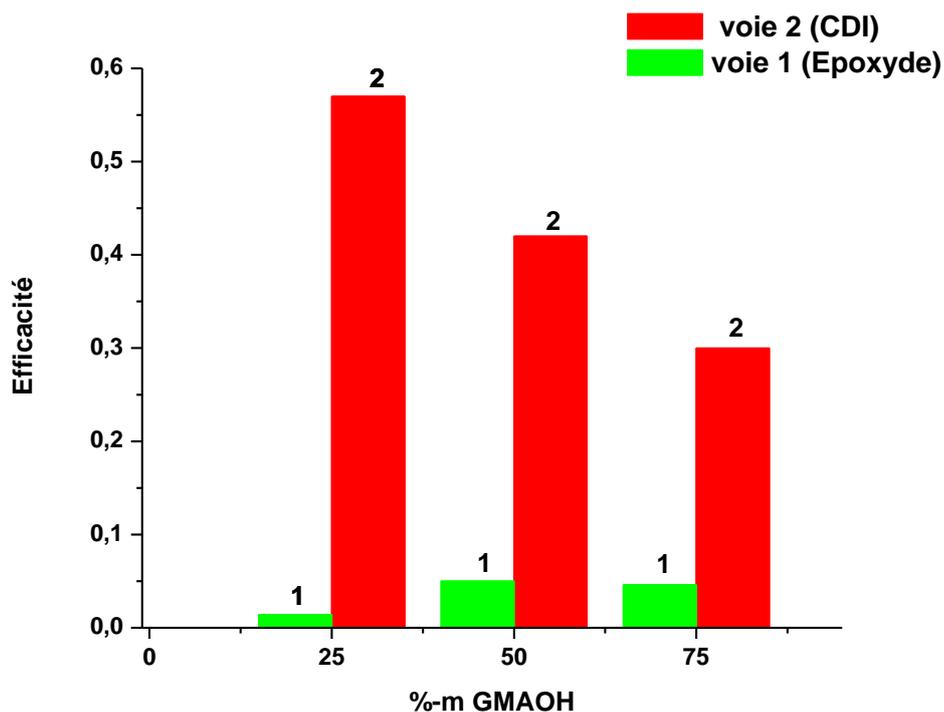


Figure 4.20 : Comparaison des efficacités de la reconnaissance entre la BSA et l'anti-BSA (exprimée par le rapport des taux de recouvrement surfacique en anti-albumine de sérum bovin et albumine de sérum bovin soit $\Gamma_{\text{anti-BSA}}/\Gamma_{\text{BSA}}$) pour des films minces à base de méthacrylate de glycidyle et de méthacrylate de glycérol suivant la voie choisie, voie 1 ; greffage sur les fonctions époxyde (BSA, 3jours), voie 2 greffage après traitement par le CDI (BSA, 1 nuit).

Conclusions

Cette étude sur l'influence de l'hydrophilie des films polymères sur leur biocompatibilité, dans notre cas avec la BSA, et la bioactivité de la protéine immobilisée a permis de mettre en lumière les différents moyens que nous avons pour incorporer l'hydrophilie dans le film polymère. De plus, il est apparu clairement dans nos résultats que la force hydrophile de chaque polymère est très différente. Nous avons pu voir qu'en incorporant de l'acrylamide à la place du GMAOH dans le film copolymère, la BSA conservait sa qualité de reconnaissance vis-à-vis de son anticorps, même si elle la perd avec l'augmentation du poly (acrylamide) dans le film. Tandis que dans le cas du GMAOH, la BSA perd toute son activité en s'immobilisant à la surface. Le recours à l'activation des fonctions hydroxyles pour immobiliser la BSA, permet d'en immobiliser moins tout en gardant une efficacité de reconnaissance de la BSA envers son anticorps. En modifiant l'hydrophilie « in situ » du film de poly(GMA), nous avons démontré que cela n'empêchait en rien l'immobilisation de la BSA en surface, même si la quantité immobilisée est moindre, son efficacité de reconnaissance n'en est que démultipliée. Nous avons pu mettre en évidence le lien qui existe entre cette perte d'efficacité de la BSA sur des films hydrophiles et la présence d'agrégats de BSA sur la surface fonctionnalisée par le film polymère.

CHAPITRE 5

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. J. Evall C. D. Bain, G. M. Whitesides, *Journal of American Chemical Society*, 111, 7155 (1989)
2. M. Madou, *Fundamentals of Microfabrication : The Science of Miniaturization*, 62 (2002)
3. S. Saliterman, *Self-assembled monolayers (SAMs). Fundamentals of BioMEMS and Medical MicroDevices*, 94 (2006)
4. L. Yan E. Ostuni, G. Whitesides, 3, 15 (1999)
5. S. Vanzuilen T. Wink, A. Bult, W. vanBennekom, *Analyst*, R43, 122 (1997)
6. G. A. Somorjai M. A. Chesters, *Surf. Sci.*, 52, 21 (1975)
7. G. M. Whitesides P.E. Laibinis, D. L. Allara, Y. T. Tao, A. N. Parikh, R. G. Nuzzo, *Journal of American Chemical Society*, 113, 7152 (1991)
8. C. Chung M. M. Walczak, S. M. Stole, C. A. Widrig, M. D. Porter, *Journal of American Chemical Society*, 113, 2370 (1991)
9. P. Eisenberger P. Fenter, J. Li, N. Camillone, S. Bernansek, G. Scoles, T. A. Ramanarayanan, K. S. Liang, *Langmuir*, 7, 2013 (1991)
10. D. B. Wolfe J. C. Love, R. Haasch, M. L. Chabinyk, K. E. Paul, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo, *Journal of American Chemical Society*, 125, 2597 (2003)
11. M. Geissler A. Carvalho, H. Schmid, B. Micel, E. Delamarche, 18, 2406 (2002)
12. S.-C. Chang Z. Li, R. S. Williams, *Langmuir*, 19, 6744 (2003)
13. F. Mearns J. J. Gooding, W. Yang, J. Liu, *Electroanal.*, 15, 81 (2003)
14. D. L. Allara R. G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 4481 (1983)
15. M. George G. Whitesides, *Chem. Rev*, 105, 1103 (2005)
16. G. Johannes Vos, R. J. Forster, T. E. Keyes, *Interfacial Supramolecular Assemblies*, 88 (2003)
17. Wysocki, *Self-Assembled Monolayers (SAMs) as Collision Surfaces for Ion Activation*,
18. O. Gershevitz Y. Barness, M. Sekar, C. N. Sukenik, *Langmuir*, 16, 247 (2000)
19. G. M. Whitesides Y. Xia, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, 550 (1998)
20. S. K. Kumar K. E. Strawhecker, J. F. Douglas, A. Karim, *Macromolecules*, 34, 4669 (2001)
21. A. G. Shard C. Thon-That, R. H. Bradley, *Langmuir*, 16, 2281 (2000)
22. C. W. Extrand, *Polymer Engineering and Science*, 34, 390 (1994)
23. H. B. Lee J. H. Lee, J. D. Andrade, *Prog. Polym. Sci.*, 20, 1043 (1995)
24. D. Julthongpiput I. Luzinov, H. Malz, J. Pionteck, V. Tsukruk, *Macromolecules*, 33, 1043 (2000)
25. E. W. Van der Vegte V. Koustos, P. C. M. Grim, G. Hadziioannou, *Macromolecules*, 31, 116 (1998)
26. T. F. Hunter L. S. Penn, Y. Lee, R. P. Quirk, *Macromolecules*, 33, 1105 (2000)
27. B. Zdyrko Y. Liu, V. Klep, I. Luzinov, *Langmuir*, 20, 6710 (2004)
28. M. Muller M. Kothe, F. Simon, H. Komber, H.-J. Jacobasch, H.-J. Adler, *Colloids and Surface A*, 154, 75 (1999)
29. I. Luzinov V. Klep, *Polymer Preprints*, 43, 706 (2002)
30. V. Klep K. S. Iyer, I. Luzinov, *Polymer Preprints*, 43, 455 (2002)
31. V. Klep Y. Liu, I. Luzinov, *Polymer Preprints*, 44, 564 (2003)
32. X. W. Zhai A. Sidorenko, F. Simon, D. Pleul, V. V. Tsukruk, *Macromolecules*, 35, 5131 (2002)
33. L. Wang J. Deng, L. Liu, W. Yang, *Progress in Polymer Science*, 34, 156 (2009)
34. M. L. Oosterling G. Boven, G. Challa, A. J. Schouten, *Polymer*, 31, 2377 (1990)
35. R. A. Shelden U. Velten, W. R. Caseri, U. W. Suter, Y. Li, *Macromolecules*, 32, 3590 (1999)
36. J. Ruhe O. Prucker, *Macromolecules*, 31, 602 (1998)

37. D. H. Solomon G. Moad, *The Chemistry of Free Radical Polymerization*, Pergamon, Oxford (1995)
38. C. H. Bamford, *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, 13, 708 (1985)
39. E. E. Malmstrom M. Husseman, M. Mcnamara, M. Mate, D. Mecerreyes, D. G. Benoit, J. L. Hedrick, P. Mansky, E. Huang, T. P. Russel, C. J. Hawker *Macromolecules*, 32, 1424 (1999)
40. S. Yamamoto M. Ejaz, K. Ohno, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Macromolecules*, 31, 5034 (1998)
41. M. J. Wirth X. Huang, *Macromolecules*, 32, 1694 (1999)
42. B. Mirous R. Sedjo, W. J. Brittain, *Macromolecules*, 33, 1492 (2000)
43. D. Mecerreyes M. Husemann, C. J. Hawker, J. L. Hedrick, R. Shah, N. L. Abbott, *Angewandte Chemie, International Edition*, 38, 647 (1999)
44. A. Ulman R. Jordan, J. F. Kang, M. H. Rafailovich, J. Sokolov, *Journal of American Chemical Society*, 121, 1016 (1999)
45. A. Ulman R. Jordan, *Journal of American Chemical Society*, 120, 243 (1998)
46. W. J. Brittain B. Zhao, *Journal of American Chemical Society*, 121, 3557 (1999)
47. C. H. Honeyman M. D. K. Ingall, J. V. Mercure, P. Bianconi, R. R. Kunz, *Journal of American Chemical Society*, 121, 3607 (1999)
48. W. Knoll J. Ruhe, *J. Macromol. Sci. Polym. Rev*, C42, 91 (2002)
49. Y. Shirai N. Tsubokawa, K. Hashimoto, *Coll. Polym. Sci*, 273, 1049 (1995)
50. J. Ruhe O. Prucker, *Macromolecules*, 31, 592 (1998)
51. S. Paul G. Tovar, W. Knoll, O. Prucker, J. Ruhe, *Supramol. Sci.*, 2, 89 (1995)
52. L. M. Tolbert X. Chen, C. L. Henderson, D. W. Hess, J. Ruhe, *J. Vac. Sci. Technol. B*, 19, 2013 (2003)
53. N. D. Ghatge S. P. Vernekar, P. P. Wadgaoknar, *J. polym. Sci. Part : Polym. Chem*, 26, 953 (1988)
54. G. Smets F. De Shrijver, *J. Polym. Sci. Part A : Polym. Chem.*, 4, 2201 (1966)
55. MCLM. Oosterling G. Boven, G. Challa, A. J. Schouten, *Polymer*, 31, 2377 (1991)
56. G. Gafijchuk S. Minko, A. Sidorenko, S. Voronov *Macromolecules*, 32, 4525 (1999)
57. S. Minko A. Sidorenko, G. Galfijchuk, S. Voronov, *Macromolecules*, 32, 4539 (1999)
58. G. Gafijchuk S. Minko, A. Sidorenko, A. Stamm, V. Senkovsky, *Macromolecules*, 32, 4532 (1999)
59. IA Luzinov SS. Minko, IY Evchuk, SA Voronov, *Polymer*, 37, 177 (1996)
60. IY. Evchuk IA. Luzinov, SS. Minko, SA. Voronov, , *J. Appl. Polym. Sci.*, 67, 299 (1998)
61. SS. Minko IA. Luzinov, A. Voronov, R. Kraus, W. Wilke, A. Zhuk, 61, 1101 (1996)
62. SS. Minko IA. Luzinov, A. Voronov, V. Senkovsky, S. Hild, O. Marti, W. Wilke,, *Macromolecules*, 31, 3945 (1998)
63. A. Kogure N. Tsubokawa, K. Maryuama, Y. Sone, M. Shimomura, *J. Polymer*, 22, 827 (1990)
64. H. Wang S. Bachmann, K. Albert, R. Partch *J. of Colloid and Interface Science*, 309, 169 (2007)
65. G. Skanth W. Huang, G. L. Baker, M. L. Bruening, *Langmuir*, 17, 1731 (2001)
66. T. Zhao R. Schmidt, J-B. Green, D. J. Dyer, *Langmuir*, 18, 1281 (2002)
67. M. L. Bruening J-B. Kim, G. L. Baker, *J. Am. Chem. Soc*, 122, 7616 (2000)
68. D. Merreceyes R. R. Shah, M. Husemann, I. Rees, N. Abbott, C. J. Hawker, J. L. Hedrick, *Macromolecules*, 33, 597 (2000)
69. S. Yamamoto M. Ejaz, K. Ohno, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Macromolecules*, 31, 5934 (1998)
70. Y. Tsujii M. Ejaz, T. Fukuda, *Polymer*, 42, 6811 (2001)
71. M. Ejaz T. Yoshinobu, S. Yamamoto, T. Fukuda, K. Shigeto, K. Mibu, T. Shinjo, *Polymer*, 43, 3837 (2002)
72. M. Ejaz S. Yamamoto, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Macromolecules*, 33, 5608 (2000)

73. F. Svec U. Meyer, J. M. Frechet, C. J. Hawker, K. Irgum, *Macromolecules*, 33, 7769 (2000)
74. K. Ohno M. Ejaz, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Macromolecules*, 33, 2870 (2000)
75. W. T. S. Huck D. M. Jones, *Advanced Materials*, 13, 1256 (2001)
76. M. J. Wirth D. Xiao, *Macromolecules*, 35, 2919 (2002)
77. A. Takacs-Cox K. N. Jayachandran, D. E. Brooks, *Macromolecules*, 35, 4247 (2002)
78. J. B. Hutchison N. Luo, K. S. Anseth, C. N. Bowman, *Macromolecules*, 35, 2487 (2002)
79. A. Boker H. Mori, G. Krausch, A. H. E. Muller, *Macromolecules*, 34, 6871 (2001)
80. A. A. Brown D. M. Jones, W. T. S. Huck, *Langmuir*, 18, 1265 (2002)
81. M. V. de Paz-Banez K. L. Robinson, X. S. Wang, S. P. Armes, *Macromolecules*, 34, 5799 (2001)
82. M. A. Khan C. Perruchot, A. Kamitsi, S. P. Armes, T. von Werne, T. E. Patten, *Langmuir*, 17, 4479 (2001)
83. A. Boker G. Cheng, M. Zhang, G. Krausch, A.H.E. Muller, *Macromolecules*, 34, 6883 (2001)
84. J-B. Kim W. Huang, G. L. Baker, M. L. Bruening, *Macromolecules*, 35, 1175 (2002)
85. T. Kawai X. Kong, J. Abe, T. Iyoda, *Macromolecules*, 34, 1837 (2001)
86. S. Diamanti G. Carrot, M. manuszak, B. Charleux, J-P. Vairon, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 39, 4294 (2001)
87. E. V. Jensen M. S. Kharasch, W. H. Urry, *Science*, 102, 128 (1945)
88. K. Matyjaszewski J-S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 5614 (1995)
89. K. Matyjaszewski J. Xia, *Macromolecules*, 30, (1997)
90. J. Tian Q. Yang, M.-X. Hu, Z.-K. Xu, *Langmuir*, 23, 6684 (2007)
91. M. Wirth X. Y. Huang, *J. Anal. Chem.*, 69, 4577 (1997)
92. S. Yamamoto M. Ejaz, K. Ohno, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Macromolecules*, 31, 5934 (1998)
93. D. A. Shipp K. Matyjaszewski, J. L. Wang, T. Grimaud, T. E. Patten, *Macromolecules*, 31, 6836 (1998)
94. S. G. Gaynor J. Xia, K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, 31, 5958 (1998)
95. P. J. Miller K. Matyjaszewski, N. Shukla, B. Immaraporn, A. Gelman, B. B. Luokala, T. M. Siclovan, G. Kickelbick, T. Vallant, H. Hoffmann, T. Pakula, *Macromolecules*, 32, 8716 (1999)
96. M. L. Bruening Z. Bao, G. L. Baker, *Macromolecules*, 39, 5251 (2006)
97. W. T. S. Huck S. Edmonson, *Adv. Mat.*, 14, 730 (2004)
98. H. Iwata T. Richey, H. Oowaki, E. Uchida, S. Matsuda, Y. Ikada, *Biomaterials*, 21, 1057 (2000)
99. X. Xu G. Sun, *Text Chem Color*, 31, 21 (1999)
100. X. Xu G. Sun, *Text Chem Color*, 31, 31 (1999)
101. X. J. Xu G. Sun, *Text Chem Color*, 30, 26 (1998)
102. E. L. Florin V. T. Moy, H. E. Gaub, *Science*, 266, 257 (1994)
103. J. M. Conolly I. S. Alferiev, S. J. Stachelek, A. Ottey, L. Rauova, R. J. Levy, *Biomacromolecules*, 7, 317 (2006)
104. J. M. Harris, *Poly(ethylene glycol) Chemistry; Plenum Press : New York and London*, (1992)
105. Anon., *Code of Federal Regulations*, Title 21, 170 (2005)
106. F. MARTIN M. C. MILLOT, D. BOUSQUET, B. SEBILLE, Y. LEVY, *Sens. Actuators B*, 29, 268 (1995)
107. F. Martin M. C. Millot, C. Mangin, Y. Lévy, B. Sébille, *Materials Science and Engineering*, 3, 10 (1999)
108. Y. S. Chi B. S. Lee, K.-B. Lee, Y.-G. Kim, I. S. Choi, , *Biomacromolecules*, 8, 3922 (2007)

109. Q. J. Cai F. J. Xu, Y. L. Li, E. T. Kang, K. G. Neoh,, *Biomacromolecules*, 6, 1012 (2005)
110. A. Baszkin, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 128, 111 (2006)
111. H. Thissen A. L. Hook, N. H. Voelcker, *Trends Biotechnol.*, 24, 471 (2006)
112. E. Sackmann M. Tanaka, *Nature*, 437, 656 (2005)
113. L. Lin x. Fan, J. L. Dalsin, P. B. Messersmith, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 15843 (2005)
114. T. Kaneko T. Akagi, T. Kida, M. J. Akashi, *J. Controlled Release*, 108, 226 (2005)
115. R. L. Reis S. a. costa, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 5, 335 (2004)
116. S. Rappoport O. Heichal-Seigal, S. Braun, *Nature Biotechnol.*, 13, 798 (1995)
117. K. Loos A. Dyal, M. Noto, S. W. Chang, C. Spagnoli, K.V.P.M. Shafi, A. Ukman, M. Cowman, R. A. Gross, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 1684 (2003)
118. E. Pastor I. Gill, A. Ballesteros, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 9487 (1999)
119. L. J. Bi Y. J. Li, X. E. Zhang, Y. F. Zhou, J. B. Zhang, Y. Y. Chen, W. Li, Z. P. Zhang, *, Anal. Bioanal. Chem.*, 386, 1321 (2006)
120. Y. Tian R. M. de Lorimier, H. W. Hellinga,, *Protein. Sci.*, 15, (2006)
121. J. A. Profitt J. Wang, M. J. Pugia, I. I. Suni, *Anal. Chem.*, 78, 1769 (2006)
122. W. Guo E. Ruckenstein, *W. Biotechnol. Prog.*, 20, 13 (2004)
123. Y. Zhan R. Wang, G. Ma, Z. Su, *Colloids Surf.*, 51, 93 (2006)
124. D. Muller H. Lakhari, *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 818, 53 (2005)
125. H. P. Merkle U. Wattendorf, *J. Pharm. Sci.*, 97, 4655 (2008)
126. S. P. Zhong F. J. Xu, L. Y. L. Yung, E. T. Kang, K. G. Neoh, J. Li, *Biomacromolecules*, 5, 2392 (2004)
127. N. Yamada T. Okano, M. Okuharam, H. Sakai, Y. Sakurai, *Biomaterials*, 16, 297 (1995)
128. E. Mielczarski Y. L. Jeyachandran, B. Rai, J. A. Mielczarski, *Langmuir*, (2009)
129. S. Thayumanavan Y. Chen, *Langmuir*, (2009)
130. N. Pernodet B. Chen, M. H. Rafailovich, A. Bakhtina, R. A. Gross, *Langmuir*, 24, 13457 (2008)
131. J. Tooze c. Branden, *Introduction to protein structure, second edition, Garland Publishing, New-York*, (1999)
132. J. D. Swalen J. G. Gordon, *Optics Commun*, 22, 374 (1977)
133. N. Bassil, *Thèse de l'Université Paris XI*, (2005)
134. E. Maillard, *These de l'Universite Paris XI*, (2004)
135. A. Otto, *Z. Physik*, 216, 398 (1968)
136. E. KRETSCHMANN, 6, 185 (1972)
137. B. Persson E. Stenberg, H. Roos, C. Urbaniczky, *J. Colloid Interface Sci.*, 143, (1991)
138. P. Guedon, *Thèse de l'Université Paris VI*, (2000)
139. B. P. Argo A. A. Levchenko, R. Vidu, R. V. Talroze, P. Strove, *Langmuir*, 18, 8464 (2002)
140. V. Klep Y.Liu, B. Zdyrko, I. Luzinov, *Langmuir*, 20, 6710 (2004)
141. V. Klep B. Zdyrko, I. Luzinov, *Langmuir*, 19, (2003)
142. C. M. A. Stuart G. J. Fleer, J. M. H. M. Scheutjens, T. Cosgrove, B. Vincent, *Polymers at Interfaces*, (1993)
143. O. Prucker M. Bialik, J. Ruhe, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 198, 543 (2002)
144. R. Schmidt R. Paul, J. Feng, D. J. Dyer, , *J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem.*, 40, 3284 (2002)
145. M. Schimmel O. Prucker, G. Tovar, W. Knoll, J. Ruhe, *Adv. Mat.*, 10, 1073 (1998)
146. R. Schmidt R. Paul, D. J. Dyer, , *Langmuir*, 18, 8719 (2002)

147. A. Abdelghani A. Tili, K. Aguir, M. Gillet, N. Jaffrezic-Renault, *Materials Science and Engineering C*, 27, 620 (2006)
148. T. B. Bright M. D. Porter, D. L. Allara, C.E.D. Chidsey *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 3559 (1987)
149. L. Yang W. Deng, D. Fujita, H. Nejoh, C. Bai, *App. Phys. A*, 71, 639 (2000)
150. T. Ederth, *J. Phys. Chem. B*, 104, 9704 (2000)
151. E. D. Pylant G. E. Poirier, *Science (Washington, D.C.)*, 272, 1145 (1996)
152. R. G. Nuzzo L. H. Dubois, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 43, 437 (1992)
153. G. M. Whitesides C. D. Bain, *Science (Washington. D. C.)*, 240, 62 (1988)
154. C. D. Bain H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides *Langmuir*, 10, 1825 (1994)
155. B. R. Zegarski L. H. Dubois, R. G. Nuzzo, *J. Chem. Phys.*, 98, 678 (1993)
156. M.C. Davies N. Patel, M. Harshorne, R. J. Heaton, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler, P. M. Williams, *Langmuir*, 13, 6485 (1997)
157. A. Bernard E. Delamarche, H. Schmid, B. Michel, H. Biebuyck, *Science*, 276, 779 (1997)
158. A. Bernard E. Delamarche, H. Schmid, A. Bietsch, B. Michel, H. Biebuyck, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 500 (1998)
159. A. G. Frutos C. E. Jordan, A. J. Thiel, R. M. Corn, , *Anal. Chem.*, 69, 4939 (1997)
160. A. G. Frutos A. J. Thiel, C. E. Jordan, R. M. Corn, L. M. Smith, *Anal. Chem.*, 69, 4948 (1997)
161. R. Georgiadis K. A. Peterlinz, *Optics Comm.*, 130, 260 (1996)
162. S. Chen H. Wang, L. Li, S. Jiang, *Langmuir*, 21, 2633 (2005)
163. Z. Wang M. A. Plunkett, M. W. Rutland, D. Johannsmann, *Langmuir*, 19, 6837 (2003)
164. M. Ejaz Y. Tsujii, S. Yamamoto, K. Ohno, K. Urayama, T. Fukuda, *Polymer Brushes*, Chapitre 14, 273 (2004)
165. A. M. Jamieson B. D. Fair, *J. Coll. Inter. Science*, 77, 525 (1980)
166. G. M. Whitesides K.L. Prime, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 10714 (1993)
167. J. D. Bryers E. E. Johnston, B. D. Ratner, *Langmuir*, 21, 870 (2005)
168. A. Kidane T. Mc Pherson, I. Szleifer, K. Park, *Langmuir*, 14, 176 (1998)
169. T. Eurell B. Zhu, R. Gunavan, D. Leckband, *J. Biomed. Mater. Res*, 56, 406 (2001)
170. J. A. Hubbell N. P. Desai, *Biomaterials*, 12, 144 (1991)
171. P. Harder R. R. Siegel, R. Dahint, M. Grunze, F. Josse, M. Mrksich, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 69, 3321 (1997)
172. X. Li J. Huang, Y. Zheng, Y. Zhang, R. Zhao, X. Gao, H. Yan, *Macromol. Biosci.*, 8, 508 (2008)
173. M. F. Refojo, *Journal of Applied Polymer Science*, 9, 3161 (1965)
174. A. Sinz J. Spross, *Anal. Chem.*, 82, 1434 (2010)
175. T. Wolff F. Hoffmann, *Journal of Colloid and Interface Science*, 322, 434 (2008)

PARTIE EXPERIMENTALE

1 Synthèses

1.1 Synthèse du méthacrylate de glycérol

Le méthacrylate de glycérol est issu de l'ouverture cycle époxyde. Nous nous sommes inspirés du protocole de Refojo et al.¹⁷³ Pour cela nous mettons 100g de GMA, avec 150 mL d'eau distillée et 0,25 mL d'acide sulfurique concentré dans un ballon, l'ensemble est mis à agiter durant six jours. Durant la réaction, le ballon est maintenu dans un bain aux alentours de 24-29°C. Au cours de la réaction, on voit apparaître deux phases l'une contenant le méthacrylate de glycérol, la seconde le méthacrylate de glycidyle qui n'a pas réagi. Le rendement de la réaction est de 96% Au terme de ces six jours, le mélange est homogène, il est neutralisé avec une solution de soude à 10%, puis extrait avec 5*100mL d'éther.

1.2 Synthèse du 4-cyanopentanoate de 4,4' azobis(1-10-dimercaptodécyle)

1.2.1 Synthèse du 1,10 dithiodécane.

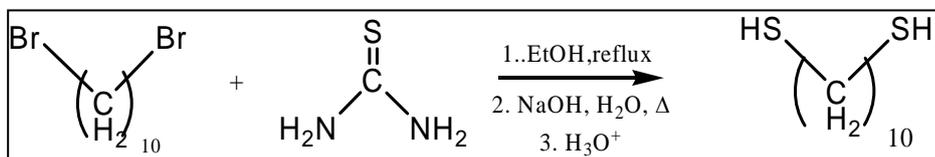


Figure : Schéma réactionnel de la synthèse du 1,10-dithiodécane.

6,83 g de thiourée et 10,8 g de 1-10dibromodécane sont introduits dans un ballon contenant 40 mL d'éthanol. Le mélange est porté à reflux durant 5 heures.

Au terme de ces 5 heures, on rajoute au mélange réactionnel une solution de soude préparée avec 4,32 g de NaOH dans 40 mL d'eau. Le mélange est à nouveau remis à reflux durant 5 heures.

Au bout de ces 5 heures, on laisse refroidir la solution à température ambiante. On acidifie le mélange réactionnel avec une solution d'acide sulfurique à 20% jusqu'à l'obtention d'un pH aux alentours de 7 ou 8.

Une extraction au cyclohexane est ensuite réalisée avec 3*70 mL.

Les phases organiques sont récupérées puis séchées avec du MgSO_4 anhydre. Le filtrat est récupéré puis le cyclohexane est retiré à l'aide de l'évaporateur rotatif. Le produit brut est purifié sur du gel de silice en éluant avec du dichlorométhane.

Après le passage sur le gel de silice, le produit est passé à l'évaporateur rotatif pour éliminer le dichlorométhane. On obtient enfin une huile incolore dont la masse finale est de 6,9 g. Le rendement de la réaction est de 93 %.

Caractérisations :

RMN1H : S-CH₂ à 2,48-2,53 ppm ; CH₂ de la chaîne carbonée, multiplets entre 1,21 et 1,57 ppm.

IRTF : CH₂ vers 2900 cm^{-1} , C-SH vers 2500 cm^{-1} , SH à 1180 cm^{-1} .

1.2.2 Synthèse du 4-cyanopentanoate de 4,4'-azobis (1-10-dimercaptodécyle)

1g d'acide 4,4'-azobis (4-cyanovalérique) est introduit dans 40 mL de chlorure de thionyle. Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 10 minutes dans un bain d'huile à 100°C.

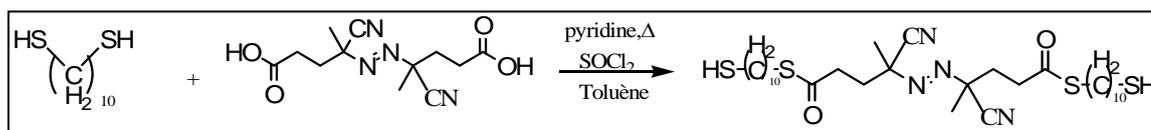


Figure : Schéma réactionnel de la synthèse du 4-cyanopentanoate de 4,4'-azobis (1-10-dimercaptodécyle)

Après les 10 minutes de reflux, le ballon est immergé dans un bain de glace puis refroidi à température ambiante.

L'excès de chlorure de thionyle est retiré par évaporateur rotatif à température ambiante. On récupère un solide jaune clair.

On introduit ensuite ce solide jaune clair, et 4,9 g de 1,10-dithiodécane dans 20 ml de toluène.

4mL de pyridine est lentement rajouté au goutte à goutte au milieu réactionnel à l'aide d'une ampoule à brome. Le mélange est ensuite chauffé à 35°C pendant 4 heures.

Au terme des 4 heures, le mélange est lavé consécutivement avec 2*25 mL de HCl 10%, puis avec 25 mL d'une solution de bicarbonate de sodium à 10% et enfin par 2*25 mL d'eau.

Les phases organiques sont recueillies puis mises à sécher avec du MgSO_4 anhydre.

Le solvant est retiré à l'aide de l'évaporateur rotatif, l'huile obtenue après passage à l'évaporateur rotatif est purifiée par son passage sur une colonne chromatographique au gel de silice. On élue avec un mélange 75/25 de dichlorométhane/hexane.

Après élution du solvant du produit recueilli suite au passage sur la colonne, il est passé à l'évaporateur rotatif. On obtient un solide blanc, avec une masse de 941 mg. Le rendement de la réaction est de 41%.

1.3 Synthèse du bromo-isobutyrate de ω -mercaptoundécyle

On introduit 0,41 mL de bromure de bromoisobutyryle au goutte à goutte dans le mélange constitué par 0,75 g de mercaptoundécanol et 0,27 mL de pyridine et 15 mL de dichlorométhane, à 0°C. Le mélange est agité à 0°C durant 1 heure et ensuite mis à agiter à température ambiante durant 16 heures.

De l'eau est ensuite rajouté, puis le produit est extrait au toluène, que l'on retirera par la suite à l'évaporateur rotatif.

Le produit est ensuite solubilisé dans l'éther, lavé avec une solution de chlorure d'ammonium saturé, puis séché sur du MgSO₄ anhydre. Une fois séché, il est purifié sur une colonne d'alumine avec comme éluant de l'hexane. Une fois l'hexane évaporé, nous obtenons une huile incolore de masse 0,46 g. Le rendement de la réaction est de 41%.

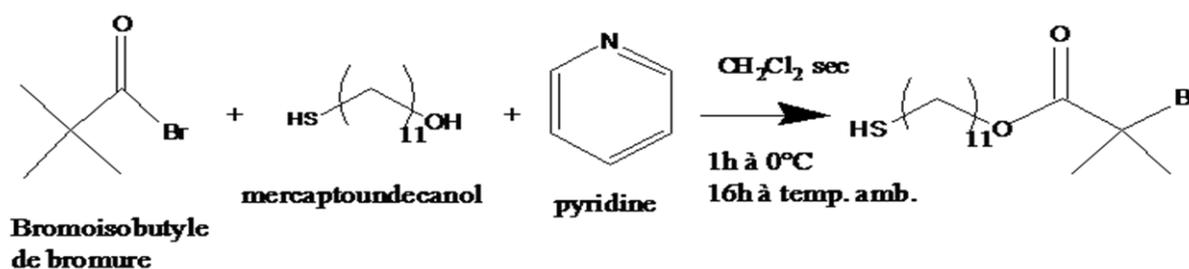


Figure : Schéma réactionnel de la synthèse du bromo-isobutyrate de ω -mercaptoundécyle.

Synthèse du P(GMA) en brosse par ATRP à partir de la surface.

Le méthanol, le GMA et le bromophénylacétate de méthyle (MBP) (dans le cas d'ajout d'amorceur sacrificiel) sont mis à buller durant 15 à 30 minutes. On introduit dans le ballon la lame fonctionnalisée par le bromo-isobutyrate de ω -mercaptoundécyle. Le ballon est ensuite mis sous N₂, puis soumis à 3 cycles de vide puis azote afin de remplacer l'air contenu dans le ballon par de l'azote. Ensuite, le mélange constitué par 114,6 mg de bipyridine, 52,8 mg de CuBr, 5mL de GMA et 2 mL déjà désaéré auparavant est introduit à l'aide d'une seringue purgée dans le ballon contenant la lame sous N₂. On refait le cycle de

vide puis azote encore deux fois, puis la réaction est amorcée en plaçant le ballon dans un bain d'huile à 30°C.

1.4 Photopolymérisation.

1.4.1 Photopolymérisation à partir de la monocouche vinylique.

Avant de procéder à la photo-polymérisation du monomère les sont d'abord lavées au piranha ($3/4 \text{ H}_2\text{SO}_4$ et $1/2 \text{ H}_2\text{O}_2$) durant 1 minute, puis rincées à l'eau puis à l'éthanol.

Les lames sont ensuite mises en contact avec une solution de cystéamine à 0,5 M dans l'éthanol, isolées de la lumière, durant 16 heures. Une fois, les 16 heures écoulées, elles sont rincées à l'éthanol, puis mises en contact avec une solution de chlorure d'acryloyle dans le dioxane (50/50 en volume) durant 45 minutes. Après les 45 minutes de contact avec la solution de chlorure d'acryloyle, les lames sont rincées au dioxane, à l'éthanol, ensuite elles sont séchées soigneusement sous flux d'azote.

Une fois, les lames fonctionnalisées par la monocouche vinylique, on peut procéder à la photo-polymérisation. Pour cela, on introduit un mélange de monomère avec de l'AIBN (1% en masse de monomère) dans le réacteur contenant la lame fonctionnalisée. Par la suite le mélange réactionnel est mis à buller durant 10 minutes sous flux d'azote. Enfin on place le ballon dans le four UV dans lequel il sera irradié à une longueur d'onde de 365 nm suivant le temps choisi.

Après la polymérisation, la lame est retirée puis rincée au chloroforme aux ultra-sons durant 2 à 5 min dans le cas du P(GMA). Pour l'acrylamide et le GMAOH, les lames seront rincées à l'éthanol, puis à l'eau, toujours aux ultra-sons. Le surnageant est récupéré afin de le précipiter et de récupérer ainsi le polymère formé en solution et de l'analyser par SEC.

1.4.2 Photo-polymérisation à partir de la surface.

Les lames sont toujours lavées au piranha avant toute fonctionnalisation. Puis elles sont mises avec une solution de 4-cyanopentanoate de 4,4'azobis (1-10-dimercaptodécyle) à 1mM dans l'éthanol durant une nuit sous atmosphère inerte. Les lames sont ensuite rincées à l'éthanol deux fois, puis séchées sous flux d'azote. On procède rapidement à la polymérisation, en mettant en contact notre lame avec le monomère. Le réacteur est mis sous flux d'azote, puis irradié à une longueur d'onde de 312 nm dans le four UV pour

démarrer la polymérisation. A la fin du temps de polymérisation, les lames sont soigneusement rincées. Le surnageant est récupéré afin de le précipiter et de récupérer ainsi le polymère formé en solution et de le tester en SEC. Ceci n'est pas possible dans le cas de la copolymérisation, il se forme un solide insoluble dans les solvants testés.

2. Biofonctionnalisation de la surface par la BSA après formation du film polymère.

Une fois, que les surfaces d'or sont modifiées par le film polymère, elles sont mises en contact d'une solution de BSA à 4mg/mL dans du tampon phosphate 0,01M à pH 7,4 durant trois jours. Au terme de ces trois jours, les lames sont retirées puis soigneusement à l'eau ultra-pure, puis avec la solution de tampon phosphate 0,01M durant trois heures pour enlever tout résidu de BSA qui ne soit pas fixé sur la surface du polymère.

Réactifs

L'acrylamide (Aldrich), le bromure de bromo(isobutyryle) (Aldrich), le mercaptoudécanol (Aldrich), la bipyridine (Aldrich), le dibromodécane (Aldrich) ont été utilisés sans purification. Le méthacrylate de glycidyle (GMA) (Aldrich) à été distillé sous CaH₂ avant utilisation.

L'azo-bis (isobutyronitrile) a été recristallisé deux fois dans le méthanol. Le bromo(phénylacétate) de phényle est distillé avant utilisation.

Le méthanol, le chloroforme, la pyridine, le dichlorométhane, l'hexane, le toluène, le cyclohexane ont été utilisés sans purification.

L'eau a été purifiée à l'aide d'un système Millipore Elix 3 avant utilisation.

3 Techniques de caractérisation

3.1 Quantification de la quantité de BSA et d'anti-BSA par SPR

La conversion de la réflectivité en taux de recouvrement surfacique Γ à 660 nm s'effectue suivant la formule suivante :

$$\Gamma = \frac{\Delta R \cdot L_{zc}}{S_{P,R} \cdot \delta n / \delta C}$$

avec : ΔR la variation de réflectivité mesurée en %

$$L_{zc} = 1,02 \cdot 10^{-4} \text{ mm}$$

$$\delta n / \delta C = 1,9 \cdot 10^{-10} \text{ mm}^3 / \text{pg}$$

$$S_{P,R} = 2,5 \cdot 10^3 \text{ \% RIU (valeur obtenue par calibration de l'appareil)}$$

$$\text{On obtient ainsi } \Gamma \text{ (pg/mm}^2\text{)} = 215 \cdot \Delta R \text{ (\%)}$$

En pratique, la variation d'indice du milieu diélectrique ne fait que décaler angulairement la courbe plasmon sans changer sa forme. Le coefficient de conversion, utilisé dans le logiciel SPRI-1000, permet de convertir la variation de réflectivité liée à ce décalage en taux de recouvrement surfacique. Il suffit donc de faire le lien entre la variation de réflectivité et la variation angulaire pour pouvoir calculer le taux de recouvrement surfacique.

Le programme SPRI-View enregistre les courbes plasmons ainsi que ses dérivées (en %/°). La valeur de ces pentes à l'angle de travail choisi correspond donc au coefficient liant le décalage angulaire d'une courbe à la variation de réflectivité en cinétique. Cette valeur est aisément vérifiable sur les données expérimentales, vaut environ 26 %. On obtient ainsi Γ en pg/mm^2 . Le calcul pratique du taux de recouvrement Γ s'effectue suivant la formule suivante : $\Gamma (\text{pg}/\text{mm}^2) = 5600 * \Delta\theta$

3.2 Résonance magnétique nucléaire en solution.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance II 400 (400 MHz pour le ^1H et pour le ^{13}C), équipé d'une sonde BBFO 5 mm à température ambiante.

3.3 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Les spectres IR-TF ont été enregistrés au moyen d'un spectromètre Bruker Tensor 27 DGTS en mode réflexion atténuée (ATR).

3.4 Microscopie à Force Atomique

L'AFM est une technique d'analyse permettant de caractériser l'état de surface d'un échantillon à l'échelle atomique. Elle est basée sur l'interaction à très courte portée entre une pointe et l'échantillon. Le principe repose sur la mesure des forces d'interactions entre une pointe et la surface à analyser. La pointe est fixée à l'extrémité d'un levier flexible et doit être la plus fine possible, se terminant idéalement par un seul atome.

Il existe trois modes d'utilisation de l'AFM : Le mode contact, le mode non-contact et le mode contact intermittent.

- Le mode contact consiste à utiliser les forces répulsives : la pointe appuie sur la surface, elle est donc repoussée du fait du principe de Pauli, et le levier est dévié. La rétroaction s'effectue dans la mesure directe de la déviation.

- Le mode contact intermittent, consiste à faire vibrer le levier à sa fréquence propre de résonance (typiquement de l'ordre de la centaine de kHz), avec une certaine amplitude. Quand la pointe interagit avec la surface (essentiellement de façon répulsive), l'amplitude décroît (parce que la fréquence de résonance change). La rétroaction se fait sur l'amplitude d'oscillation du levier.
- Le mode non-contact utilise, lui, les forces attractives. Difficile à gérer, il est très peu utilisé en pratique, parce que les forces sont faibles et nécessite un environnement à faible bruit. Par ailleurs, la couche d'adsorbats (toute surface à l'air ambiant est recouverte d'une couche de quelques nanomètres d'eau et de divers polluants) vient largement affecter les mesures, le vide est plus que conseillé pour obtenir une résolution suffisante en pratique. La rétroaction s'effectue soit sur la déviation (déviation du levier qui va dans le sens contraire au cas du mode contact), soit sur l'amplitude des oscillations.

Dans notre étude, les observations morphologiques ont été effectuées sur un *Dimension 3100 AFM* et traité à l'aide *Nanoscope III a de Veeco Instruments*. Le mode utilisé est le mode contact..... dans les conditions ambiantes.

3.5 Mesures d'angles de contact

L'appareil de mesure d'angle de contact, le *Drop Shape Analysis System Easy Drop Standard*, est composé d'un système d'éclairage, d'un plateau amovible sur lequel sera placé l'échantillon, d'une caméra vidéo enregistrant l'image de la goutte en fonction du temps et d'une seringue permettant de déposer les gouttes calibrées. Le logiciel *Drop Shape Analysis* permet d'acquérir et de traiter des séquences vidéo et des images. Le liquide utilisé pour nos mesures est l'eau ultra-pure.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse a concerné la fonctionnalisation de lames d'or, par voie covalente, par des films minces de polymères à base de méthacrylate de glycidyle et l'étude de l'influence de la méthode de préparation de ces films sur la quantité de biomolécules fixées ainsi que de l'activité de celles-ci.

Pour cela, nous avons préparé des films minces de poly (méthacrylate de glycidyle) par deux techniques : « le grafting onto » et le « grafting from ». Et dans le cadre de la technique du « grafting from » deux types d'amorçage ont été réalisés, un amorçage par le biais d'une monocouche vinylique et celui par une monocouche auto-assemblée. Ces polymérisations ont été effectuées par voie photochimique.

Nous avons pu mettre en évidence l'importance de la méthode de préparation du film polymère sur son épaisseur et sa densité. En effet, la méthode du « grafting from » s'avère être la plus adaptée si l'on désire obtenir un film polymère homogène et plus particulièrement l'utilisation d'une couche d'amorceur directement liée à la surface pour amorcer la polymérisation. De plus, il s'avère que l'amorçage de la polymérisation par le biais d'une monocouche auto-assemblée permet d'obtenir un film polymère plus homogène et de plus grande densité de chaînes polymère par unité de surface.

D'autre part, nous avons montré que la formation du film de PGMA par la méthode du « grafting from » s'effectuait selon un mode mixte, faisant intervenir dans un premier temps, l'augmentation de l'épaisseur du film de P(GMA) *via* la croissance des chaînes polymères greffées puis *via* la densification du nombre de chaînes greffées. Ces caractéristiques des films se traduisent par une plus grande quantité de biomolécules fixées ici l'albumine de sérum bovin. Cependant, en comparant les capacités immunoréceptrices des films de P(GMA) obtenus par les différentes voies, on note que la technique du grafting onto se démarque par rapport aux autres méthodes. En effet, nous avons constaté que l'efficacité de reconnaissance de la BSA par l'anti-BSA, caractérisée par le rapport $\Sigma_{\text{anti-BSA}} / \Sigma_{\text{BSA}}$, des films de P(GMA) préparés par la méthode grafting onto était supérieure aux autres méthodes de préparation (cf. Tableau récapitulatif).

Tableau récapitulatif

Nature du polymère		$\Gamma_{\text{exp.BSA}}$ (ng/mm ²)	$\frac{\Sigma_{\text{anti-BSA}}}{\Sigma_{\text{exp.BSA}}}$	Temps de préparation
<i>P(GMA)</i>	Grafting onto	2,25-3,5	0,33-0,4	3 jours
	Vinylique	1,75-4,1	0,09-0,33	3 à 4 jours
	Amorceur de type AIBN	3,2-10,7	0,008-0,16	3 à 4 jours
<i>copolymères</i>	Acrylamide	2,5-7,9	0,037-0,18	3 à 4 jours
	GMAOH	6,3-18,6	0,006-0,02	3 à 4 jours

Dans une autre partie, nous avons étudié différentes stratégies pour l'élaboration de films minces de copolymères de méthacrylate de glycidyle pour lesquels nous avons montré l'effet du caractère hydrophile de ces films minces sur les interactions non spécifiques qui existent entre l'anti-albumine de sérum bovin que nous avons sélectionné comme biomolécule cible modèle et les différents films copolymères. Les différents films minces copolymères résultent, dans un premier temps de la fonctionnalisation post-polymérisation d'un film mince de P(GMA) préparé par la méthode du grafting from à partir d'une couche vinylique, puis par la copolymérisation du méthacrylate de glycidyle avec un comonomère hydrophile tel que le méthacrylate de glycérol et enfin l'acrylamide par la technique du grafting from à partir d'une couche vinylique.

Nous avons montré que par l'incorporation d'hydrophilie au sein des films polymères, on diminuait très fortement les interactions non spécifiques entre l'anti-albumine de sérum bovin et les interfaces constituées par les films minces de copolymères. Ce qui constitue une véritable alternative à l'utilisation d'un surfactant tel que le Tween 20 lors de la reconnaissance moléculaire.

Dans un autre temps, nous avons évalué la capacité de greffage d'albumine de sérum bovin de chacun des films minces à base de copolymères de méthacrylate de glycidyle puis les performances de reconnaissance spécifique entre l'albumine de sérum bovin greffée sur les surfaces copolymères et l'anti-albumine de sérum bovin en solution.

Nous avons montré que l'albumine de sérum se fixait de manière importante sur les films copolymères de type poly (GMA-co-acrylamide) et poly (GMA-co-méthacrylate de glycérol) avec une tendance à l'agrégation sur ces derniers. Cette agrégation peut constituer

une des raisons qui favorise la perte d'efficacité ou la dénaturation de la BSA, notamment sur les films minces de poly (GMA-co-méthacrylate de glycérol).

De plus, nous avons montré que dans le cadre d'une méthode de préparation rapide et simple de capteurs à base de films minces de poly(GMA), une technique de préparation parmi celles proposées tout au long de ce manuscrit se démarquait : le grafting onto. Dans cette dynamique de rapidité de mise en œuvre tout en conservant les capacités de greffage en albumine de sérum bovin ainsi que ses propriétés de reconnaissance, les films préparés de P(GMA) par la méthode du grafting onto présentent quant à eux ces avantages (cf. Tableau récapitulatif).

Il serait intéressant de pouvoir modéliser la structure de la BSA au sein des films copolymères qui ont été synthétisés afin d'apporter plus de réponses aux interrogations soulevées. Par ailleurs, il serait aussi intéressant de compléter cette étude en testant la fixation d'une biomolécule de taille plus petite sur les différents films minces préparés dans cette étude.