



**HAL**  
open science

## Immobilisation de la trypsine sur un support de polyéthylène fonctionnalisé par voie plasma

Mahsa Ghasemi

► **To cite this version:**

Mahsa Ghasemi. Immobilisation de la trypsine sur un support de polyéthylène fonctionnalisé par voie plasma. Engineering Sciences [physics]. Chimie ParisTech, 2007. English. NNT: . pastel-00005078

**HAL Id: pastel-00005078**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00005078>**

Submitted on 4 May 2009

**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.

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE  
PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI)**

Spécialité / Ecole doctorale  
**GENIE DES PROCÉDES ET HAUTE TECHNOLOGIE**

Présentée par  
**Mademoiselle Mahsa Ghasemi**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS VI**

Sujet de la thèse

**Immobilisation de la trypsine sur un support de  
polyéthylène fonctionnalisé par voie plasma**

Soutenue le 28 septembre 2007 devant le jury composé de

Mme F. AREFI-KHONSARI	Professeur	Directeur de thèse
M. M. MINIER	Professeur	Directeur de thèse
M. D. MONTOVANI	Professeur	Rapporteur
M. A. ISAMBERT	Professeur	Rapporteur
Mme C-M. PRADIER	Directeur de Recherche	Examineur
M. M. CHEHIMI	Directeur de Recherche	Examineur
M. J. AMOUROUX	Professeur	Invité

Préparée à l'École Nationale Supérieure de Chimie de Paris

**A la mémoire de ma grande mère**

**A mes parents et à ma sœur**

**A mon oncle et à ma tante**

# **Sommaire**

<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>11</b>
<b>CHAPITRE I: ETAT DE L'ART SUR L'IMMOBILISATION DE BIOMOLECULES SUR UN SUPPORT SOLIDE .....</b>	<b>10</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>16</b>
I. Immobilisation des biomolécules sur des matériaux solides ou condensés .....	17
I.1. Généralités sur les biomolécules.....	17
I.2. Applications des enzymes immobilisées.....	18
I.3. Enzymes immobilisées.....	19
I.4. Méthodes d'immobilisation .....	21
I.4.1. Inclusion dans une matrice .....	22
I.4.2. Méthodes de confinement et microencapsulation .....	22
I.4.3. Réticulation.....	23
I.4.4. Adsorption .....	23
I.4.5. Liaisons covalentes.....	24
II. Fonctionnalisation de surface par différentes méthodes .....	26
II.1. Activation de la surface de polymère par voie chimique .....	26
II.2. Activation photochimique .....	27
II.3. Modification de la surface par plasma hors équilibre basse pression.....	27
II.3.1. Définition générale.....	27
II.3.2. Quantification des groupes amines greffés à la surface .....	29
II.3.3. Immobilisation des enzymes sur la surface traitée par plasma .....	30
<b>Conclusion.....</b>	<b>32</b>
<b>Références .....</b>	<b>33</b>
<b>CHAPITRE II: MODIFICATION DE SURFACE DES FILMS DE POLYETHYLENE (PE) PAR PROCEDE PLASMA BASSE PRESSION NH3 .....</b>	<b>40</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>45</b>
I. Fonctionnalisation de polymère par traitement plasma RF NH <sub>3</sub> basse pression.....	46
I.1. Réacteur plasma utilisé pour le traitement de surface des films de polymères .....	46
I.2. Choix du polymère support du greffage des fonctions amines.....	48
I.3. Choix des conditions de traitement de surface par plasma hors équilibre.....	49

II. Caractérisations physico-chimiques de la surface du PE traité par plasma NH <sub>3</sub> .....	50
II.1. Caractérisation de l'énergie de surface par la méthode de l'angle de contact.....	50
II.2. Modifications topographiques de la surface du film de PE.....	52
II.3. Mise en évidence des modifications chimiques de la surface du film de PE par spectroscopie de photoélectrons X (XPS).....	53
II.4. Quantification des fonctions amines greffées à la surface des films de PE traités par plasma NH <sub>3</sub> hors équilibre.....	57
II.4.1. Principe de la dérivation chimique pour l'identification des fonctions amines greffées .	57
II.4.2. Détermination quantitative des amines (primaires, secondaires et tertiaires) greffées à la surface de films de PE.....	59
II.4.2.1. Dosage des amines primaires.....	59
II.4.2.1.1. Méthode de dosage à base du réactif sulfo-LC-SPDP.....	60
a) Principe.....	60
b) Protocole opératoire .....	60
II.4.2.1.2. Méthode de dosage à partir du réactif NBZ (nitrobenzaldéhyde) .....	61
a) Principe.....	61
b) Protocole opératoire .....	61
II.4.2.1.3. Méthode de dosage à l'aide du réactif 2-iminothiolane (ITL)/acide bicinchoninic (BCA).....	62
a) Principe.....	62
b) Protocole opératoire .....	63
II.4.2.2. Dosage des amines primaires et secondaires .....	64
a) Principe.....	64
b) Protocole opératoire .....	65
II.4.2.3. Dosage des trois classes d'amines (primaires, secondaires, tertiaires) sur les surfaces de PE traitées par plasma NH <sub>3</sub> hors équilibre.....	66
a) Principe.....	66
b) Protocole opératoire .....	66
II.4.3. Comparaison entre les différentes méthodes choisies.....	67
III. Vieillissement du matériau greffé par des fonctions aminées.....	69
III.1. Etude du vieillissement de la surface de PE traité par plasma NH <sub>3</sub> par la méthode de l'angle de contact.....	69
III.2. Etude par dérivation chimique du vieillissement des fonctions amines greffées à la surface de films de PE traités par plasma NH <sub>3</sub> .....	70

III.3. Interprétation des études de vieillissement de la surface traité par plasma NH <sub>3</sub> .....	71
<b>Conclusion.....</b>	<b>74</b>
<b>Références .....</b>	<b>75</b>

**CHAPITRE III: ETUDE DE L'IMMOBILISATION D'UNE ENZYME SUR LA SURFACE DE POLYETHYLENE ACTIVE PAR PLASMA ..... 80**

**Introduction..... 84**

I. Validation de la fixation du bras espaceur..... 85

I. 1. Choix du bras espaceur ..... 85

I. 2. Protocole de fixation du glutaraldéhyde ..... 85

I.3. Caractérisation physico-chimique de la surface greffée par le glutaraldéhyde ..... 87

I.3.1. Topographie par MEB de la surface du PE traité et activé par le glutaraldéhyde (GA) ... 87

I.3.2. Caractérisation par XPS de la surface fonctionnalisée par le glutaraldéhyde (GA)..... 87

I.3.3. Etude par XPS de la quantité de GA fixée en surface en fonction de la concentration de la solution réactionnelle ..... 90

I.3.4. Dérivation chimique des fonctions aldéhydes greffées à la surface du PE après la fixation de GA ..... 91

I.3.4.1. Dosage des fonctions aldéhyde de la surface par la méthode tyramine / BCA..... 92

I.3.4.2. Dosage des fonctions aldéhydes de la surface par la méthode phénol-acide sulfurique (PAS) ..... 94

I.3.4.3. Résultats, comparaison entre les deux méthodes de dosage et discussion..... 96

I.4. Etude de l'évolution de la concentration de GA en surface en fonction du temps de vieillissement..... 99

II. Validation de l'immobilisation d'une enzyme - exemple de la trypsine..... 101

II. 1. Choix de la trypsine ..... 101

II. 2. Protocole d'immobilisation de la trypsine ..... 105

II.3. Etude de l'immobilisation de la trypsine ..... 106

II.3.1. Modification topographique de la trypsine immobilisée..... 106

II.3.2. Caractérisation physico-chimique par XPS de la surface après l'immobilisation ..... 107

II.3.3. Etude par XPS de la quantité de trypsine immobilisée en surface en fonction de la concentration de cette enzyme dans la solution d'incubation..... 112

II.3.4. Dosage de la trypsine immobilisée sur la surface par la méthode au BCA ..... 114

**Conclusion..... 117**

<b>Références .....</b>	<b>118</b>
<b>CHAPITRE IV: VALIDATION DE L'IMMOBILISATION COVALENTE DE L'ENZYME PAR MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE .....</b>	<b>80</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>129</b>
I. Trypsine .....	130
I. 1. Immobilisation et activité .....	130
I. 2. Mesure de l'activité enzymatique en phase homogène.....	132
I. 3. Etude de l'influence des conditions de réaction sur la cinétique d'hydrolyse du BAEE par la trypsine .....	134
I.3.1. Effet de la concentration de substrat.....	134
I.3.2. Effet de la température sur l'activité enzymatique.....	136
I.3.3. Effet du pH sur l'activité enzymatique.....	138
II. Immobilisation de la trypsine sur des surfaces de PE traité par différents plasma et mesure de son activité enzymatique .....	139
II. 1. Dispositif expérimental utilisé pour le traitement de la surface par plasma RF basse pression.....	140
II. 2. Mesure de l'activité enzymatique de la trypsine immobilisée sur la surface de PE.....	142
II.2.1. Immobilisation de la trypsine et mesure de son activité .....	142
II.2.2. Mise au point d'un protocole de rinçage des échantillons après l'immobilisation .....	144
II.2.3. Comparaison des activités enzymatiques obtenues par différents traitements plasma ..	146
II.2.3.1. Activité enzymatique de surfaces traitées par plasma NH <sub>3</sub> .....	146
II.2.3.2. Activité enzymatique de surfaces traitées par le mélange N <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> plasma .....	149
II.2.3.3. Activité enzymatique de surfaces traitées par plasma allylamine .....	150
III. Activité enzymatique de la trypsine immobilisée sur des surfaces de PE traité par plasma NH <sub>3</sub> .....	152
III.1. Evaluation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de la trypsine dans la solution d'incubation .....	152
III.2. Evaluation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de GA .....	153
III.3. Stabilité de l'activité enzymatique au cours d'essais répétitifs.....	154
<b>Conclusion.....</b>	<b>159</b>
<b>Références .....</b>	<b>161</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>166</b>



<b>Annexe:</b> .....	<b>169</b>
A.1. Produits et matériel.....	172
A.1.1 Produits réactifs: .....	172
A.1.2 : Acides et solvants: .....	173
A.1.3 : Matériels: .....	173
A.2. Analyses XPS (spectroscopie de photoélectrons induits par rayon X) .....	174
A.3. Microscopie de force atomique (AFM).....	177
A.4. Microscopie électronique à balayage (MEB) et analyse EDX.....	178
A.5. Séquences de la trypsine.....	179

# Abréviations

AFM: microscopie à force atomique

BAEE: *N*- $\alpha$ -Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester

BCA: acide bicinchoninic

BPB: bleu de bromophénol

DTT: dithiothreitol

DMAP: 4-diméthylaminopyridine

EDX: energy dispersive X-ray analysis

GA: glutaraldéhyde

ITL: 2-iminothiolane

MEB: microscopie électronique à balayage

NBZ: nitrobenzaldéhyde

PAS: phénol-acide sulfurique

PE: Polyéthylène

Sulfo-LC-SPDP: sulfosuccinimidyl 6-[3'-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoate

Sulfo-SHPP: sulfosuccinimidyl-3-[4-hydroxyphenyl] propionate

XPS: spectroscopie de photoélectron X

# **Introduction Générale**

# Introduction générale

L'immobilisation de protéines, et en particulier d'enzymes, sur des supports solides, est à l'origine d'un grand nombre d'applications dans les domaines biomédical, environnemental et industriel. Lorsqu'elles sont utilisées en tant que biocatalyseurs, par exemple pour la production de molécules chirales (chimie, pharmacie) ou pour la transformation de produits naturels (agroalimentaire), il est indispensable, au plan économique, de prolonger la durée d'utilisation des enzymes. Leur immobilisation sur support solide permet généralement d'augmenter leur stabilité au cours du temps et procure également un moyen efficace pour les opérations de séparation / recyclage, en mode discontinu, ou de rétention dans l'espace réactionnel, pour un réacteur en fonctionnement continu. Le développement de capteurs, par exemple pour l'analyse (environnement, biotechnologies), demande également la mise au point de supports fonctionnalisés par divers types de biomolécules (anticorps, enzymes, ADN).

Parmi les qualités recherchées pour les matériaux constituant les supports, l'inertie chimique et le faible coût sont primordiaux. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail était d'étudier l'immobilisation d'une enzyme sur des supports de polyéthylène traités par le procédé de plasma hors-équilibre. Ce procédé est un procédé sec, rapide et largement utilisé pour le traitement des surfaces. Cette technique est particulièrement intéressante car elle constitue une source d'espèces chimiquement réactives en phase gazeuse, suivant le choix du gaz plasmagène, permettant d'activer la surface. La possibilité de travailler à basse température permet de conserver les propriétés intrinsèques des matériaux traités et est particulièrement adaptée aux polymères sensibles à la température. Ce procédé évite également les procédés multi-étapes utilisés pour fonctionnaliser les surfaces des supports.

Dans un premier chapitre nous avons étudié l'état de l'art concernant les différentes techniques d'immobilisation des enzymes, en détaillant les avantages et les inconvénients de chacune. Ceci nous a amené à choisir une immobilisation par liaison covalente en raison de la stabilité procurée par cette méthode. Afin d'activer la surface du polyéthylène nous avons fait le point sur les différents types de plasma basse pression pouvant être mis en œuvre, en nous intéressant particulièrement aux plasmas permettant d'incorporer des fonctions aminées, en particulier des amines primaires, sur la surface: plasma ammoniac,  $N_2 + H_2$ , et allylamine. En effet,

les méthodes de couplage entre amines primaires du support et celles des protéines sont éprouvées et connues pour respecter l'activité enzymatique.

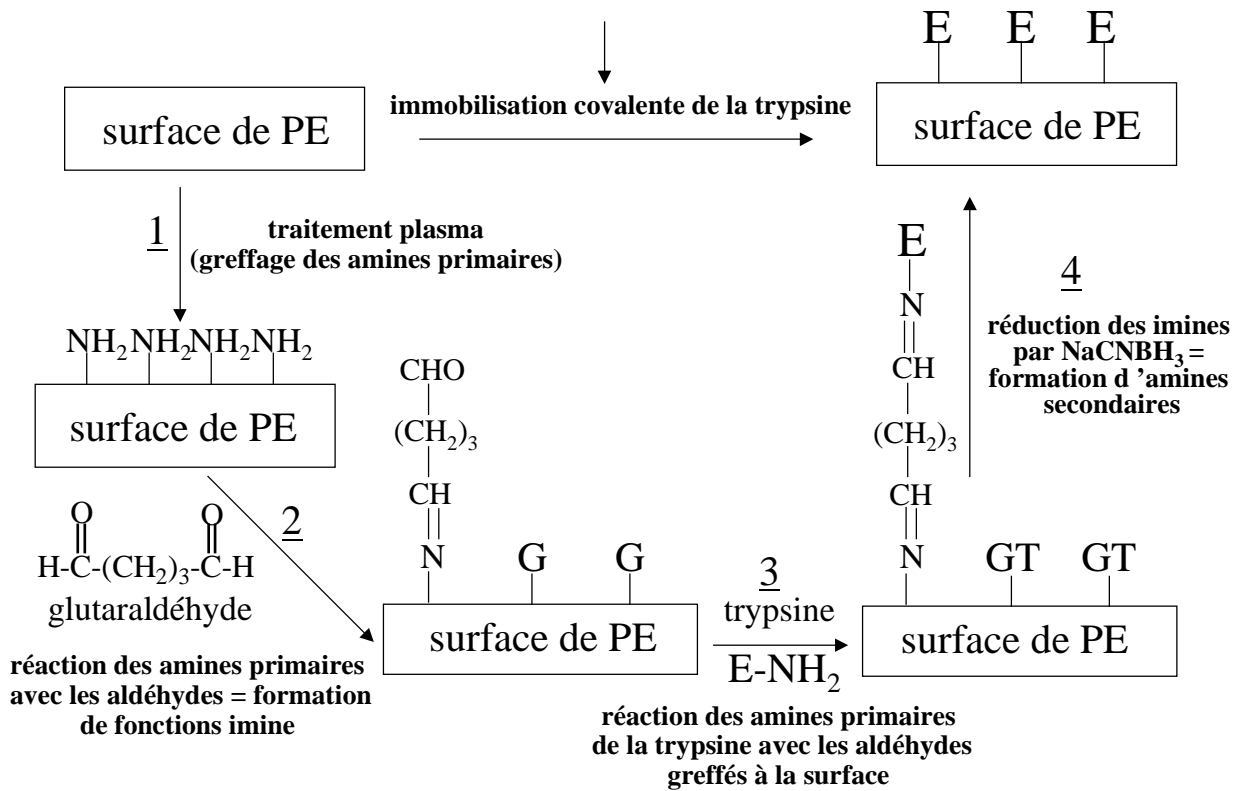
Dans le chapitre II nous avons utilisé un réacteur sous cloche selon une configuration asymétrique de deux électrodes de type couteau-cylindre pour fonctionnaliser un film de polyéthylène basse densité par plasma  $\text{NH}_3$ . Nous sommes placés dans les conditions optimisées au préalable dans le laboratoire et avons caractérisé la surface après traitement par différentes méthodes physico-chimiques: angle de contact, MEB, AFM et XPS. Etant donné l'importance portée à la densité des fonctions amines incorporées à la surface, nous avons comparé différentes méthodes de dérivation chimique assistées par spectrophotométrie UV/visible afin de déterminer quantitativement ces fonctions. Nous avons mis à profit ces méthodes pour étudier la cinétique du processus de vieillissement de la surface de polyéthylène traité, dans différentes conditions de conservation.

Dans le chapitre III, nous avons testé un protocole de fixation du glutaraldéhyde, utilisé comme bras espaceur, sur la surface. A nouveau, cette dernière a été caractérisée par XPS, MEB et AFM. Nous avons également mis au point et comparé deux méthodes de dosages des fonctions aldéhyde présentes à la surface. L'évolution du nombre de fonctions aldéhyde en surface a été suivie au cours du temps dans les mêmes conditions de conservation que précédemment.

Par la suite, nous avons validé un protocole d'immobilisation d'enzyme en choisissant la trypsine comme modèle d'étude. Comme dans les étapes précédentes, nous avons cherché à caractériser les surfaces et en particulier à confirmer la présence de l'enzyme par les méthodes physico-chimiques déjà évoquées. Cette étude a été complétée par des mesures de la quantité de protéine fixée, par une méthode colorimétrique.

Le dernier chapitre est une validation du processus global d'immobilisation puisqu'il est dédié à la mesure de l'activité enzymatique. Après une étude préalable des conditions de réaction sur la cinétique enzymatique en phase homogène, nous avons défini un protocole de rinçage des échantillons afin de nous assurer de mesurer l'activité réellement immobilisée. A cette étape nous avons testé les performances de différents types de plasmas:  $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2 + \text{H}_2$  et allylamine pour l'immobilisation covalente de la trypsine, à l'aide de la mesure de l'activité enzymatique. Enfin, nous nous sommes intéressés à la stabilité de l'activité enzymatique dans le cas des échantillons traités par plasma  $\text{NH}_3$ . L'évolution de l'activité enzymatique a été étudiée au cours de temps et au cours d'essais répétitifs.

## Objectif



**Différentes étapes du procédé d'immobilisation de la trypsine sur des films de polyéthylène**  
 (PE: polyéthylène, G: glutaraldéhyde, T: trypsine)

# Chapitre I

**Etat de l'art sur l'immobilisation de  
biomolécules sur un support solide**

## **Introduction**

### **I. Immobilisation des biomolécules sur des matériaux solides ou condensés**

- I.1. Généralités sur les biomolécules
- I.2. Applications des enzymes immobilisées
- I.3. Enzymes immobilisées
- I.4. Méthodes d'immobilisation
  - I.4.1. Inclusion dans une matrice
  - I.4.2. Méthodes de confinement et microencapsulation
  - I.4.3. Réticulation
  - I.4.4. Adsorption
  - I.4.5. Liaisons covalentes

### **II. Fonctionnalisation de surface par différentes méthodes**

- II.1. Activation de la surface de polymère par voie chimique
- II.2. Activation photochimique
- II.3. Modification de la surface par plasma hors équilibre basse pression
  - II.3.1. Définition générale
  - II.3.2. Quantification des groupes amines greffés à la surface
  - II.3.3. Immobilisation des enzymes sur la surface traitée par plasma

## **Conclusion**

## **Références**



## Introduction

Dans cette partie, nous allons donner quelques informations nécessaires à la bonne compréhension du sujet traité dont le but est de réaliser l'immobilisation d'une enzyme par liaison covalente sur une surface polymère fonctionnalisée par voie plasma.

Nous proposons, dans un premier temps, de présenter les intérêts de l'immobilisation de biomolécules (enzymes, anticorps, ADN) sur la surface des matériaux. Puis, nous résumerons les différents procédés permettant l'immobilisation des enzymes. Parmi ces méthodes, nous nous focaliserons sur l'immobilisation par liaison covalente.

Au cours de cette présentation, nous effectuerons une synthèse des travaux déjà effectués à travers des résultats issus de la littérature concernant la modification de surface des polymères. Puis nous détaillerons plus particulièrement les résultats de la littérature concernant les modifications de surface par plasma hors équilibre engendrées soit par des gaz non polymérisables ( $N_2+H_2$ ,  $NH_3$ ) soit par des molécules polymérisables (allylamine, éthylamine, hydrazine) afin d'incorporer les fonctions amines à la surface des polymères.

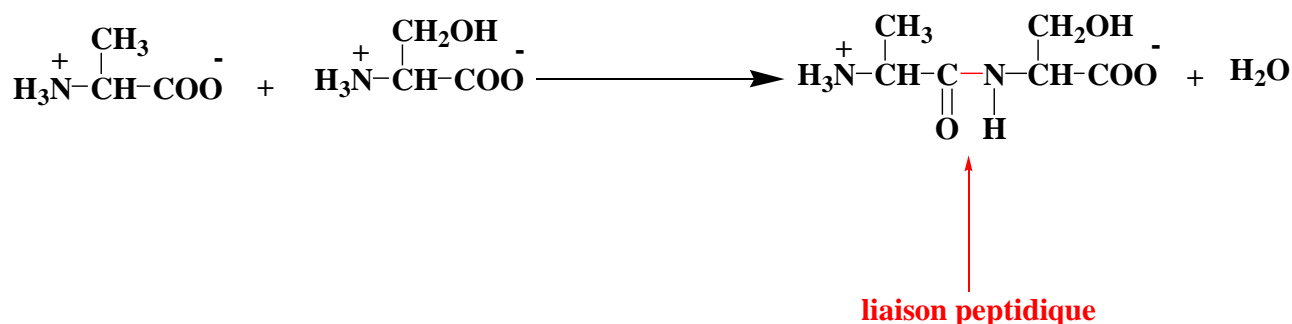
# I. Immobilisation des biomolécules sur des matériaux solides ou condensés

## I.1. Généralités sur les biomolécules

Les biomolécules les plus souvent rencontrées sous forme immobilisées sont les protéines [1,2,3], en particulier les enzymes [4,5] et les anticorps [6,7,8] ainsi que l'ADN [9,10].

C'était au début du 19<sup>ème</sup> siècle que le chimiste hollandais Gerardus Johannes Mulder découvre pour la première fois que les albumines (des composés qui coagulent quand on les chauffe) sont composées de carbone, d'oxygène, d'hydrogène et d'azote. En 1838 Jöns Jacob Berzelius, chimiste suédois, suggère à Mulder d'appeler ces albumines «protéines», car il leur attribue un rôle dominant parmi les composés biologiques [11].

Les **protéines** sont des polymères linéaires, ou chaînes, formés de 20 types d'acides aminés qui sont unis par des liaisons peptidiques: fonction amide résultant de la condensation du groupe  $\alpha$ -carboxyle d'un acide aminé avec le groupe  $\alpha$ -aminé de l'acide aminé le suivant dans la chaîne. Une molécule d'eau est produite dans cette condensation. Les chaînes latérales des acides aminés engagés dans la chaîne polypeptidique portent le nom de «résidu d'acide aminé». Les groupes libres, aminé et carboxyle, présents aux extrémités opposées d'une chaîne polypeptidique sont respectivement le groupe N-terminal (aminé terminal) et le groupe C-terminal (carboxyle terminal).



**Figure I.1.** Formation des liaisons peptidiques

Les **anticorps** (immunoglobulines) sont des protéines synthétisées par un animal en réponse à la présence d'une substance étrangère. Ils sont sécrétés par les plasmocytes qui dérivent des lymphocytes B (cellules B). Chaque anticorps a une affinité spécifique pour le matériel étranger qui a induit sa synthèse. Une macromolécule étrangère capable de provoquer la formation d'un

anticorps est appelée antigène (immunogène). Ces réactions sont appelées réactions immunologiques.

La séquence des acides aminés qui se polymérisent est déterminée par l'information génétique contenue dans le chromosome - constitué de molécules d'ADN (acide désoxyribonucléique) - qui, chez les eucaryotes, est entièrement localisée dans le noyau cellulaire. Les recherches sur l'ADN ainsi que le génie génétique tirent le plus grand profit de l'usage des enzymes de restriction.

Les **enzymes** sont les catalyseurs des systèmes biologiques de nature protidique qui interviennent dans toutes les réactions métaboliques énergétiquement possibles qu'elles accélèrent par activation spécifique. Elles permettent d'atteindre rapidement l'état d'équilibre de la réaction sans le modifier. Elles ont une grande spécificité de substrat (pour les enzymes protéolytiques, la spécificité portent sur le lieu d'attaque de l'enzyme), accélèrent des réactions chimiques spécifiques et fonctionnent en solution aqueuse, dans des conditions de température et de pH généralement très douces <sup>[12]</sup>.

Le site actif d'une enzyme est la région qui réunit et met en contact les réactifs - souvent appelés substrats - et facilite ainsi la réaction. On peut distinguer dans le site actif, d'une part le site de fixation qui se combine au substrat par des liaisons faibles et le site catalytique qui agit sur le substrat pour lui faire subir la réaction chimique. Les liaisons disulfures jouent souvent un rôle fondamental en rapprochant les acides aminés du site actif; les liaisons faibles jouent également ce rôle <sup>[13]</sup>.

Une classification officielle des enzymes a été adoptée en 1961. Elle permet de classer les enzymes en six groupes selon le type de réaction catalysée (oxydoréductases, hydrolases, lyases, isomérasés, ligases). Dans les groupes des hydrolases, on peut citer les enzymes protéolytiques qui hydrolysent les liaisons peptidiques, comme la trypsine, la chymotrypsine et la thrombine.

## **I.2. Applications des enzymes immobilisées**

Les enzymes ont paru dès le début comme un mode privilégié d'utilisation de la biocatalyse. Ces biocatalyseurs peuvent présenter cependant quelques inconvénients parmi lesquels leur manque de stabilité et leur coût qui ont pu paraître rédhibitoires pour certaines applications. A ces inconvénients ont répondu les techniques d'immobilisation contribuant à la stabilisation des enzymes dans leurs conditions d'utilisation, à leur récupération éventuelle pour réutilisation et à la possibilité de développer des réacteurs fonctionnant en continu. Ce qui a ouvert la voie à

l'exploitation industrielle. D'autres avantages majeurs de ces techniques sont d'augmenter, de façon souvent considérable, la productivité des bioréacteurs et la pureté des produits. Les principales applications industrielles de ces techniques sont <sup>[14]</sup> : l'isomérisation du glucose, la production d'acide 6-aminopénicillanique, l'hydrolyse du lactose, la synthèse d'acides aminés lysine, acide aspartique et alanine, l'hydrolyse de polysaccharides et de protéines, la production d'acrylamide, le traitement des eaux.

Certaines enzymes trouvent des applications dans l'amélioration de goûts désagréables. Par exemple la trypsine peut être immobilisée sur un verre poreux par l'intermédiaire du glutaraldéhyde et agir sur le lait de manière à ralentir et diminuer l'apparition du goût amer.

Les enzymes immobilisées peuvent aussi être utilisées dans les domaines du diagnostic et comme agent thérapeutique <sup>[14]</sup>, pour l'électronique <sup>[15]</sup>, et la mise au point de biocapteurs <sup>[16]</sup>.

Actuellement on assiste également à un grand regain d'intérêt pour les applications de la trypsine immobilisée dans des microréacteurs, dans le domaine de la protéomique, pour la cartographie à haut débit des protéines <sup>[17]</sup>.

### **I.3. Enzymes immobilisées**

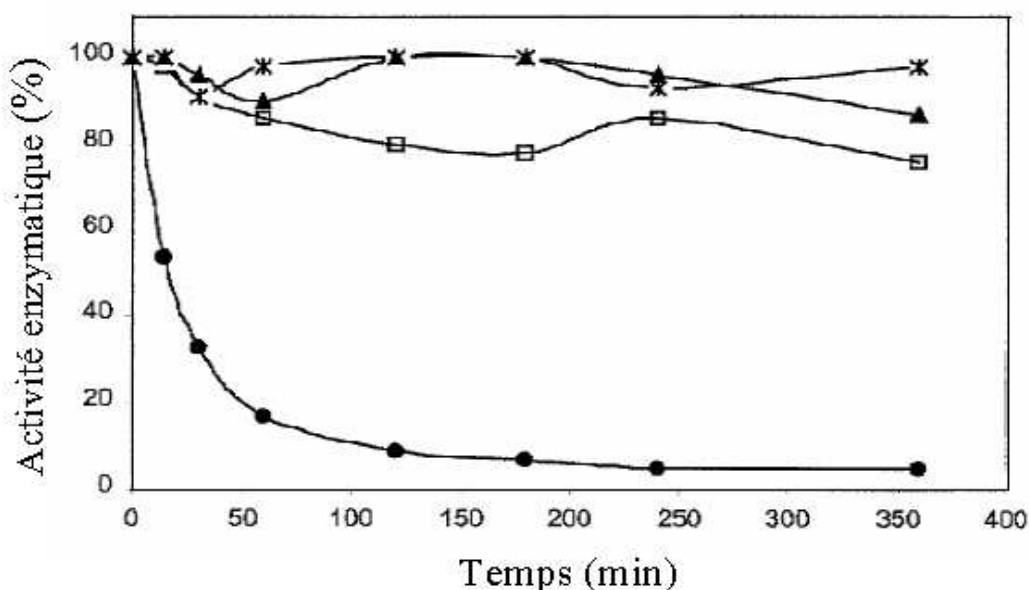
Une enzyme immobilisée est une enzyme liée par des moyens physico-chimiques en surface ou à l'intérieur d'un support solide. On cherche généralement à conserver son activité enzymatique, qui a tendance à diminuer après immobilisation du fait de possibles gênes stériques, de limitations dans l'accessibilité au site actif ; et à augmenter sa stabilité dans le temps, ce qui est souvent le cas du fait de la structure plus rigide conférée par l'immobilisation aux enzymes. On distingue normalement trois types de stabilité pour une enzyme immobilisée:

1. Stabilité de stockage: évolution de l'activité enregistrée dans les conditions usuelles de conservation <sup>[18]</sup>
2. Stabilité opérationnelle: évolution de l'activité de l'enzyme pendant des essais répétitifs
3. Stabilité thermique: résistance à des températures plus élevées auxquelles l'enzyme est normalement dénaturée

Par exemple, la glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (GAPDH) a été greffée à l'aide du glutaraldéhyde sur la surface du verre poreux. On observe une augmentation de la stabilité de la GAPDH fixée sur la surface par liaison covalente par rapport à la stabilité de la même enzyme en

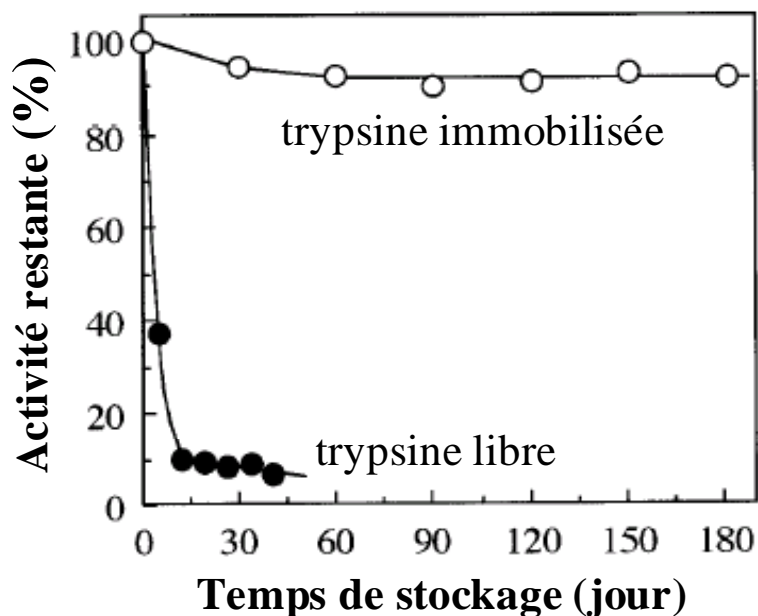
phase homogène. L'enzyme libre perd son activité assez rapidement (dès les 4 premières heures) tandis que l'activité de l'enzyme immobilisée reste stable pendant 30 jours <sup>[19]</sup>.

La trypsine immobilisée sur des polyesters via différents espaceurs (polyéthylène glycol (PEG)-diamine, sérum albumine Bovine (BSA), dextran aminé ou porteur de fonctions aldéhyde), présente une stabilité thermique supérieure après l'immobilisation: l'activité reste la même pendant environ 350 minutes à la température de 50°C alors qu'à la même température l'enzyme libre présente une perte de la moitié de son activité en une durée de moins de 20 min (Figure I.2.) <sup>[20]</sup>.



**Figure I.2.** Stabilité thermique de la trypsine: trypsine libre (25 µg/ml) (●); trypsine immobilisée par: PEG-diamine (□), dextran aminé (▲) et BSA (\*); incubation à 50°C dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M pH=7,5) <sup>[20]</sup>

L'immobilisation d'une enzyme sur ou dans une structure solide condensée répond à deux objectifs principaux. En premier lieu, une enzyme étant un catalyseur, il est très important de pouvoir la séparer des substrats et des produits de réaction afin d'assurer un recyclage efficace. L'intérêt est évident dans l'optique d'un procédé réactionnel continu. Le deuxième avantage généralement admis est la stabilisation de la protéine <sup>[21,22]</sup>, en particulier lors de sa fixation par liaison covalente à un support. De plus lorsqu'on met en œuvre des protéases, l'immobilisation permet de diminuer les phénomènes d'hydrolyse mutuelle des enzymes (autolyse) qui conduit à leur inactivation rapide en phase homogène <sup>[23,24]</sup>.



**Figure I.3.** Diminution des phénomènes d'hydrolyse de la trypsine après l'immobilisation <sup>[24]</sup>

#### I.4. Méthodes d'immobilisation

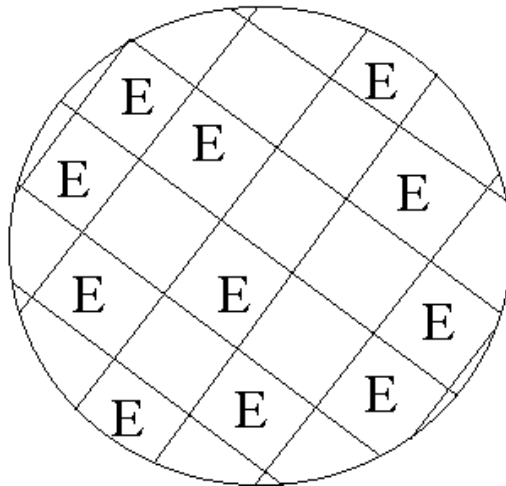
Les méthodes citées dans la littérature sont très nombreuses. Cependant, il existe quatre grandes méthodes, couramment utilisées pour immobiliser des enzymes: l'inclusion, le confinement, la réticulation, la fixation sur un support. Le principe de ces méthodes est résumé dans le tableau I.1.

Immobilisation par rétention Physique	Inclusion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• dans une matrice constituée par le réseau tridimensionnel d'un polymère</li> </ul>
	Confinement	<ul style="list-style-type: none"> <li>• dans une microcapsule réunie par une membrane semiperméable</li> <li>• dans une fibre creuse</li> </ul>
Immobilisation par interaction physique ou liaison chimique	Fixation sur un support	<ul style="list-style-type: none"> <li>• par adsorption</li> <li>• par liaison covalente</li> </ul>
	Réticulation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• établissement d'un réseau par liaisons covalentes intermoléculaires</li> </ul>

**Tableau I.1.** Différentes méthodes d'immobilisation des enzymes

### I.4.1. Inclusion dans une matrice

L'enzyme est dispersée dans une solution homogène de monomère ou d'émulsion. La polymérisation du monomère conduit à la formation d'un réseau au sein duquel l'enzyme est emprisonnée d'une manière purement physique.



**Figure I.4.** Inclusion dans un réseau de polymère insoluble

Cette méthode est très simple mais possède trois inconvénients principaux:

- le réseau formé est presque toujours trop lâche pour retenir complètement l'enzyme.
- la limitation diffusionnelle des substrats, des produits
- En présence d'agents complexants le gel se solubilise.

### I.4.2. Méthodes de confinement et microencapsulation

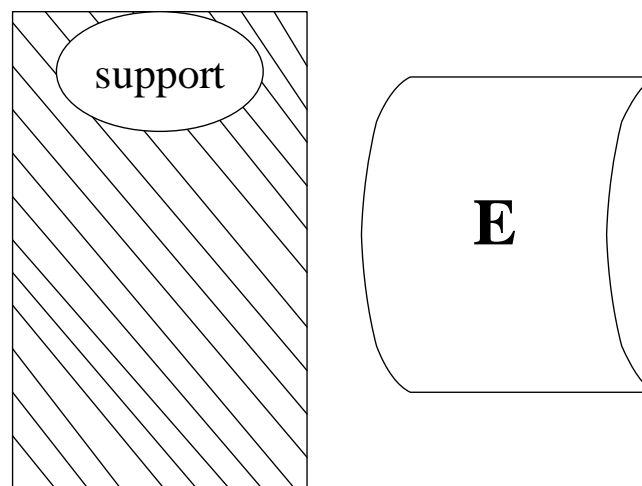
Cette technique consiste à enfermer des enzymes dans une membrane semi-perméable. La limitation à des substrats de faible poids moléculaire pour l'enzyme, constitue le désavantage de cette méthode. Le second inconvénient est que la polymérisation interfaciale qui aboutit à la formation des microcapsules entraîne fréquemment une dénaturation des enzymes. Certains ont alors songé à utiliser des fibres creuses à travers lesquelles l'enzyme ne peut diffuser.

### I.4.3. Réticulation

La réticulation consiste à établir des liens covalents entre molécules d'enzymes ou entre molécules d'enzymes et de protéines inertes par l'intermédiaire d'agents polyfonctionnels, afin d'obtenir des structures de très haute masse molaire.

### I.4.4. Adsorption

Cette méthode est extrêmement simple à mettre en œuvre puisqu'il suffit de laisser en contact l'enzyme et le support à un pH, une force ionique et une température convenable. Les différents types de liaisons intervenant dans l'adsorption sont: interactions de Van der Waals, liaison hydrogène, transfert de charges (liaison ionique), échanges d'ions, interactions hydrophobes.



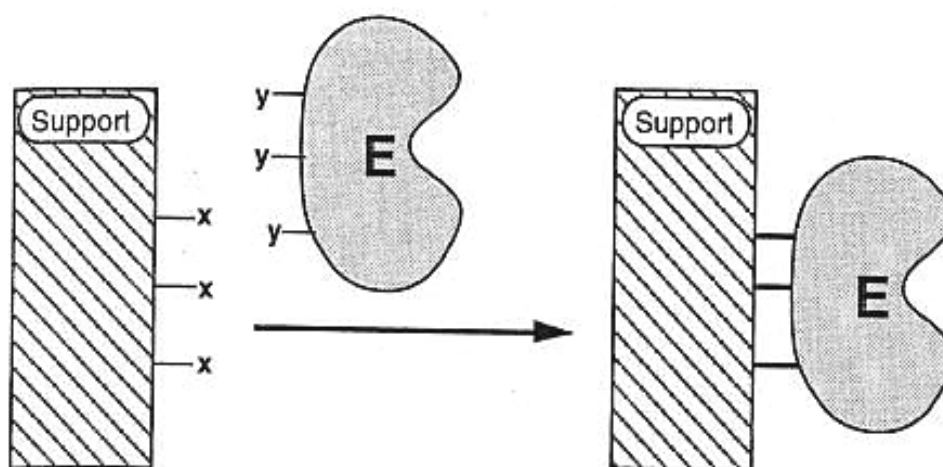
**Figure I.5.** Immobilisation sur un support par adsorption physique

Le principal inconvénient est la fragilité de la fixation; ce peut être également un avantage si l'on souhaite désorber l'enzyme immobilisée pour la remplacer par une enzyme native. Les autres désavantages de cette méthode sont les risques de mauvaise accessibilité au site actif, du fait de l'absence de bras espaceur, les difficultés d'utilisation en réacteurs continus du fait d'une désorption progressive de la protéine, qui est alors libérée dans le milieu réactionnel <sup>[25]</sup>.



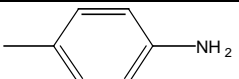
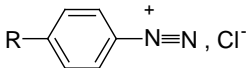
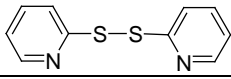
### I.4.5. Liaisons covalentes

Cette immobilisation est réalisée par l'intermédiaire de liaisons irréversibles et covalentes entre les groupements fonctionnels de l'enzyme et les groupes réactifs du support. Ces groupes, en général insuffisamment réactifs, nécessiteront une activation préalable. A priori, il faut activer soit l'enzyme, soit le support. Pour des raisons qui tiennent à la difficulté de maintenir l'activité de l'enzyme (l'activation des groupes fonctionnels de l'enzyme peut conduire à la dénaturation de l'enzyme) et aussi à la faible réactivité chimique des acides aminés (amine primaire, acide carboxylique, parfois thiol, phénol, hydroxyle), on choisit généralement d'activer le support.



**Figure I.6.** Immobilisation covalente de l'enzyme sur un support

Afin de lier l'enzyme au support par liaisons covalentes, on fait apparaître sur le support des fonctions chimiques réactives. Ces fonctions peuvent être créées par réaction directe (cellulose + CNBr par exemple) ou par greffage de composé bifonctionnel (bras espaceur) qui comporte une fonction capable de former une liaison covalente avec les fonctions portées par les enzymes. Ce composé permet de fixer l'enzyme à une certaine distance du support et d'avoir une meilleure accessibilité de l'enzyme à son substrat. Le tableau présenté montre certains des différents bras espaceurs utilisés pour lier les fonctions des supports et les fonctions portées par l'enzyme.

Groupement fonctionnel au niveau du support	Composé bifonctionnel (bras espaceur)	Groupement fonctionnel au niveau de l'enzyme
-COOH	Carbodiimide ( $R_1-N=C=N-R_2$ ) Chlorure d'acide ( $PCl_3, PCl_5$ )	-NH <sub>2</sub>
-OH	Chlorotriazine ( $C_3N_3Cl_2$ ) Halogénures de cyanogène (BrCN, ClCN)	-NH <sub>2</sub>
-NH <sub>2</sub>	Glutaraldéhyde ( $OHC-(CH_2)_3-CHO$ )	-NH <sub>2</sub>
-NH <sub>2</sub>	Carbodiimide ( $R_1-N=C=N-R_2$ ) Isothiocyanate ( $R-N=C=S$ )	-COOH
	Isocyanate ( $R-N=C=O$ ) Isothiocyanate ( $R-N=C=S$ ) Sels de diazonium 	-tyrosine
-SH	4,4'-Dithiopyridine 	-SH
-SH	3-Maleimidopropionic acid <i>N</i> -hydroxysuccinimide ester	-NH <sub>2</sub>

**Tableau I.2.** Principaux groupements réactionnels entre le support et l'enzyme

Les supports généralement utilisés pour l'immobilisation peuvent être classés en deux grands groupes:

a) les supports organiques qui comprennent les polysides (acétate de cellulose <sup>[26]</sup>, nitrate de cellulose <sup>[27]</sup>, dextrane <sup>[28]</sup>, agarose, alginate <sup>[29]</sup>, chitosan <sup>[30]</sup>, amidon), les polymères (le polyéthylène (PE) <sup>[31]</sup>, le polypropylène (PP) <sup>[32]</sup>, le polystyrène (PS) <sup>[33]</sup>, le polyéthylènetéréphtalate (PET) <sup>[34]</sup> etc).

b) les supports inorganiques (verre poreux, silice <sup>[35]</sup>, métalliques <sup>[36]</sup>, alumino-silicates, etc.)

Les supports organiques peuvent être chimiquement activés par différentes techniques, ce qui constitue l'un de leurs principaux avantages car ils permettent la fixation d'enzymes par différentes voies. Les supports inorganiques sont généralement plus stables (résistance à l'usure, aux agents chimiques et aux bactéries) mais la fixation covalente sur ces supports est difficile à cause de leur faible réactivité.

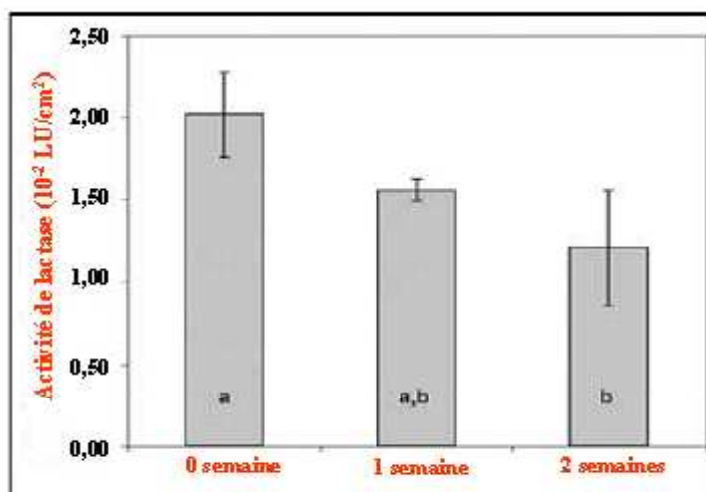
## II. Fonctionnalisation de surface par différentes méthodes

La fonctionnalisation permet de créer à la surface du support des fonctions chimiques réactives, c'est-à-dire des fonctions utilisables pour la fixation par liaison covalente d'une autre molécule. Les méthodes d'activation des supports de polymère sont:

- par voie chimique
- par irradiation UV (activation photochimique)
- par traitement plasma

### II.1. Activation de la surface de polymère par voie chimique

Afin d'introduire des groupements amines à la surface du polyéthylène (PE), Goddard et collaborateurs <sup>[37]</sup> ont récemment étudié l'activation par la voie chimique. Après avoir rincé et séché les films pendant la nuit, les films sont immergés dans une solution de trioxyde de chrome anhydre, d'eau déionisée et d'acide sulfurique à 70°C. Le polyéthylèneimine (PEI) est ensuite fixé de façon covalente sur ce film oxydé en utilisant la méthode de Kingshott <sup>[38]</sup>. L'immobilisation de la lactase a été effectuée par l'intermédiaire de la réaction du glutaraldéhyde avec les amines primaires de la surface. Les auteurs ont montré que l'activité enzymatique de la lactase immobilisée sur PE diminuait de 22 % à 23 % par semaine pendant le stockage (avec une activité au départ de 0,020 U / cm<sup>2</sup>).



**Figure I.7.** Activité de la lactase immobilisée pendant le stockage à pH 6,8 dans la solution de tampon phosphate au réfrigérateur (une unité de la lactase (LU) est définie par la libération de 1  $\mu$ mol d'o-nitrophenol par minute à 37°C <sup>[37]</sup>

## II.2. Activation photochimique

L'étude de l'activation de la surface de polymère par l'action d'un rayonnement UV a été établie par différentes équipes. Nahar et al. <sup>[39]</sup> ont montré que la peroxydase de raifort (horseradish peroxydase) peut être immobilisée sur le polystyrène activé par la méthode photochimique utilisant le 1-fluoro-2-nitro-4-azidobenzène (FNAB). L'activité enzymatique (menée par la lumière de soleil) de la surface traitée dans ce cas est deux fois plus élevée en comparaison avec la surface non traitée.

Les autres modifications par irradiation UV provoquent aussi une oxydation de la surface du polymère en utilisant soit l'ozone à 254 nm <sup>[40-42]</sup> soit le trifluoroéthane-sulfonyl chlorure (tresyl chlorure) à 365 nm <sup>[43]</sup>.

Concernant l'immobilisation de l'enzyme par cette méthode, l'étude bibliographique ne nous a pas permis de trouver des valeurs de l'activité enzymatique de la surface immobilisée.

## II.3. Modification de la surface par plasma hors équilibre basse pression

### II.3.1. Définition générale

Le plasma est un gaz ionisé électriquement neutre dans lequel se côtoient des ions, des espèces moléculaires ou atomiques excitées, des radicaux, des électrons et des photons. Les plasmas froids basse pression sont des milieux lumineux obtenus en soumettant un gaz à l'action d'un champ électrique ou électromagnétique à basse pression (0,1 à 10<sup>4</sup> Pa). Les phénomènes de base de la physico-chimie des plasmas reposent sur le processus de collision et de transfert d'énergie entre une molécule ou un atome et un électron accéléré par un champ électromagnétique. Lors de ces collisions inélastiques, l'électron transfère une partie de son énergie à la molécule ou à l'atome et modifie leur énergie interne. Cela conduit à l'apparition d'espèces gazeuses réactives de type radicalaire ou moléculaire permettant de développer la chimie spécifique au plasma. Ce type de plasma est dit froid car la température macroscopique du gaz reste voisine de la température ambiante. Ceci permet de modifier chimiquement la surface sans altérer les propriétés de cœur des matériaux très sensible aux effets de température tel que les polymères.

L'avantage de cette technique par rapport à la voie chimique est le suivant <sup>[44]</sup>:

-une homogénéité de la surface

- une amélioration de l'adhésion de support
- une bonne résistance chimique et physique
- une modification de la surface sans toucher les propriétés du cœur (bulk)
- une possibilité de l'application sur différents supports comme les métaux, les polymères, céramiques, les verres avec différentes géométries de surface
- une possibilité de l'introduction des différentes fonctions comme amines, aldéhydes, carboxyliques, hydroxyles par plasma

En raison de différentes applications dans le domaine de l'immobilisation des biomolécules (enzyme, peptide), polysaccharide <sup>[3]</sup> (héparine <sup>[45, 46]</sup>, dextran <sup>[3]</sup>), anticorps <sup>[47-49]</sup>, collagène <sup>[50]</sup>), comme la culture des cellules <sup>[51-54]</sup>, l'adsorption des protéines <sup>[55]</sup> (l'implantation des prothèses dans le système cardiovasculaire, les membranes pour des biocapteurs <sup>[56]</sup>, les lentilles de contact <sup>[57]</sup>), plusieurs recherches ont été effectuées sur des surfaces fonctionnalisées par  $-NH_2$  <sup>[58]</sup>.

L'incorporation des groupes d'amines à la surface du support peut se faire par deux procédures:

1. Avec des gaz non polymérisables comme  $N_2$ ,  $NH_3$

Une comparaison entre des plasmas d'azote et d'ammoniac par les équipes de F. Arefi et al. <sup>[59]</sup> montre que la cinétique de nitruration dans un plasma d'ammoniac basse pression est effective dès les premiers temps de traitement (115 ms). En revanche le plasma d'azote nécessite un temps plus long (1 s). En conséquence, l'incorporation d'azote par plasma ammoniac est plus rapide que par plasma  $N_2+H_2$  ou plasma  $N_2$ .

2. Avec des gaz polymérisables comme l'allylamine ( $CH_2=CH-CH_2-NH_2$ ), le propylamine ( $CH_3-CH_2-CH_2-NH_2$ ), le butylamine ( $CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$ )

Le dépôt de la fonction d'amine avec cette technique est préférable en raison de la densité plus élevée des fonctions amines incorporées par ce procédé <sup>[60,61]</sup>. Il est possible à l'aide de la polymérisation par plasma en utilisant les conditions douces (puissances faible et / ou décharges RF pulsées) d'avoir une rétention importante des fonctions amines primaires et un taux de dissociation faible du précurseur utilisé. Cependant le problème essentiel de ce genre de surfaces réside dans la stabilité du dépôt au lavage.

### 3. Post-greffage en utilisant l'argon (Ar) comme un pré-traitement

La surface des polymères est activée par plasma Ar (formation des radicaux libre sur la surface) et greffée par une molécule aminée (acrylamine <sup>[62]</sup>).

Ces techniques sont utilisées sur une grande variété de supports polymères pour différentes applications. Pour des applications biomédicales qui sont souvent les plus recherchés <sup>[63]</sup>, on peut citer comme exemple le polystyrène (PS), le PC, le PMMA, le polyéthylène (PE) le polyétherethercétone (PEEK), le polyéthylènetéréphtalate (PET), le polytétrafluoroéthylène (PTFE). Le PS et le PC sont utilisés pour la culture des cellules, le PEEK et le PE pour des implantations et prothèses, le PET et le PTFE pour la greffe des vasculaires <sup>[64]</sup>.

#### II.3.2. Quantification des groupes amines greffés à la surface

Etant donné l'importance portée à la densité des fonctions amines (primaires, secondaires et tertiaire) incorporées à la surface, plusieurs technique (spectroscopie UV-visible, fluorescence, RMN, XPS) sont présentées dans la littérature <sup>[65-67]</sup>. Le tableau I.3. présente différents résultats de densités surfaciques des fonctions amines par différentes méthodes de dérivatisation couplées soit à la spectroscopie UV-visible soit à XPS.

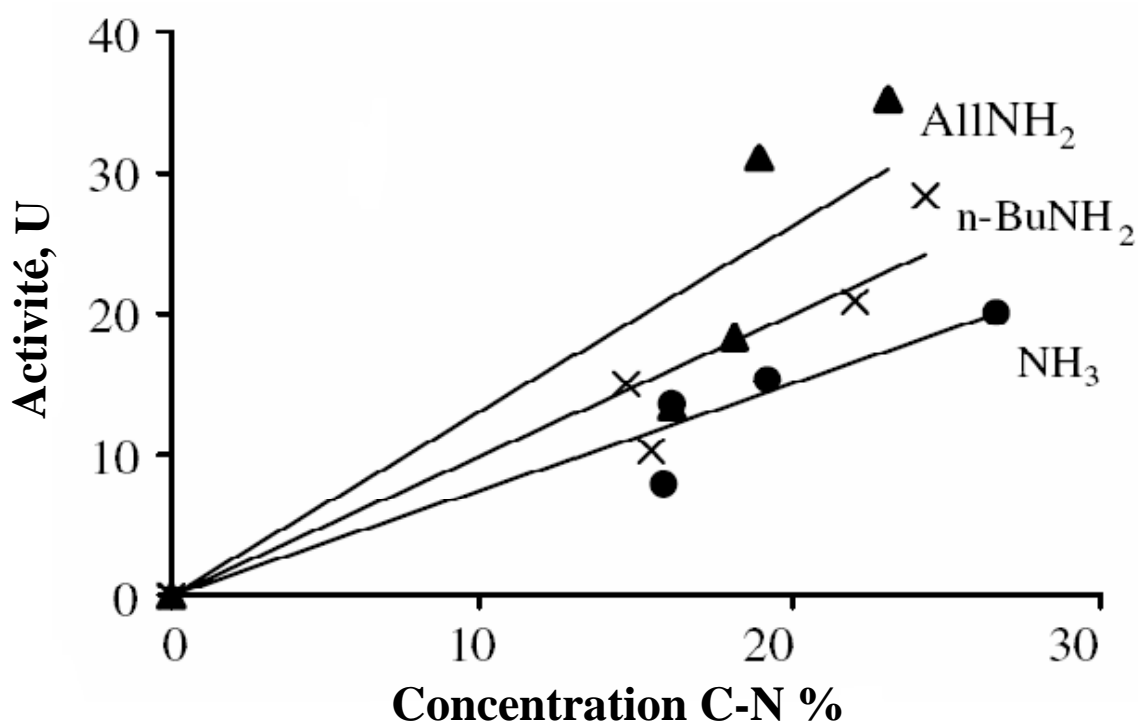
Support	Type de traitement	Densité des amines (amines groupes/nm <sup>2</sup> )	Référence
Polystyrène (PS)	Plasma azote (N <sub>2</sub> )	1,2	Wang et al. <sup>[68]</sup>
SiO <sub>2</sub> / Si	Voie chimique	2-8,9	Moon et al. <sup>[69]</sup>
Polyéthylène (PE)	Plasma hydrazine	8-19	Jiang et al. <sup>[70]</sup>
Surface métallique	Plasma allylamine	5-12	Puleo et al. <sup>[3]</sup>

**Tableau I.3.** Densités des fonctions amines par la spectroscopie UV-visible ou par XPS

Il a été reporté que la densité de ces fonctions diminue dans le temps aussi bien sur les surfaces stockées dans l'air que sur celles lavées dans les différents solvants.

### II.3.3. Immobilisation des enzymes sur la surface traitée par plasma

I. Gancarze et son équipe <sup>[71]</sup> ont mené une étude sur l'influence de la présence d'argon dans un plasma micro-onde par la décharge pulsée dans différents gaz (l'ammoniac, l'allylamine et le n-butylamine) sur l'activité de la glucose isomérase immobilisée. Ils ont aussi suivi l'évolution de l'activité de cette enzyme immobilisée en fonction de la concentration de liaison C-N sur les films de polysulfone. Ils ont trouvé une meilleure activité enzymatique (35,2 U) sur les surfaces traitées par un plasma d'allylamine entraîné par l'argon (Puissance = 60 W, Temps de traitement = 3 min, Pression = 2 mbar). Ils ont obtenu une corrélation linéaire entre la concentration de fonction C-N et l'activité de glucose isomérase (Figure I.8.).



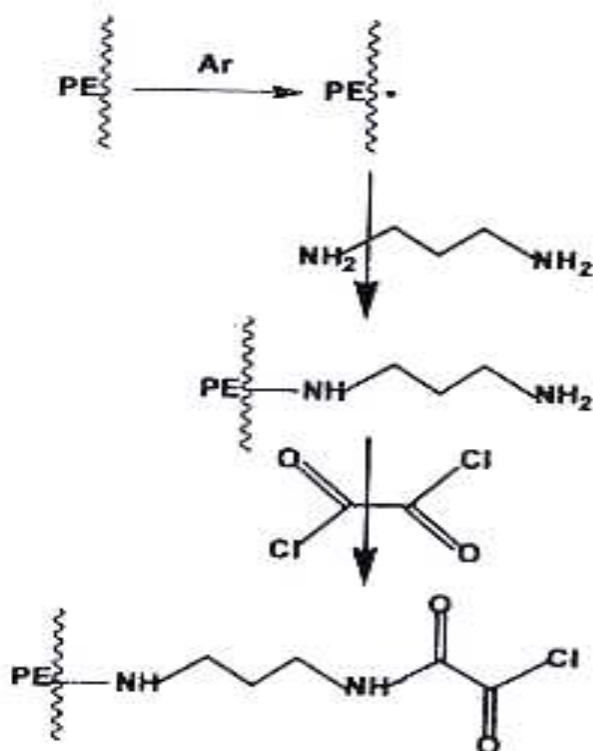
**Figure I.8.** Evolution du rapport de l'activité de glucose isomérase en fonction de la concentration de liaison C-N mesurée par XPS pour des surfaces traitées par un plasma d'ammoniac, de n-butylamine et d'allylamine <sup>[71]</sup>

(une unité de la glucose isomérase (U) est définie par la libération de 1  $\mu$ mol de fructose par minute)

S. Alvarez-Blanco et al. <sup>[72]</sup> ont choisi la méthode de post-greffage plasma pour activer le support de polyéthylène afin d'immobiliser la peroxydase de raifort (Horseradish HRP) dans le but de diminuer l'adsorption de l'enzyme sur la surface. Le procédé consiste à créer dans un premier temps des sites réactifs par une décharge RF pulsée dans l'argon à basse pression (200 mtorr). Cette

étape est suivie de l'introduction du précurseur le 1,3 diamine propane sous vide à la température ambiante. Cette technique est utilisée pour éviter la décomposition du précurseur et en conséquence avoir une rétention plus importante des fonctions amines.

Après avoir activé la surface par des groupements  $-NH_2$  selon la méthode détaillée précédemment, chlorure d'oxallyle est fixé de façon covalente sur la surface fonctionnalisée par  $-NH_2$ .



**Figure I.9.** Schéma de la méthode présentée pour l'immobilisation Horseradish peroxydase sur un support de PE (Plasma RF, Puissance=13,56, Pression d'Ar= 200 mtorr) <sup>[72]</sup>

R. Ganapathy et ses collaborateurs <sup>[73]</sup> se sont intéressés à l'influence de la longueur de la chaîne des bras espaceurs sur l'activité de la  $\alpha$ -chymotrypsine immobilisée sur différents supports (polyester, polystyrène, polyéthylène) via des liaisons covalentes. Ils ont observé que le support n'a pas d'influence sur l'activité de l'enzyme immobilisée; par contre il existe une corrélation entre la longueur des bras espaceurs et l'activité enzymatique. D'après eux l'activité enzymatique de la chymotrypsine peut être améliorée par l'utilisation de bras espaceurs ayant de longues chaînes. Ce qui procure une augmentation de la mobilité de l'enzyme.



## Conclusion

Cette étude bibliographique met en évidence l'approche scientifique et expérimentale proposée pour le traitement de surface des polymères dans le but d'y incorporer les fonctions actives permettant une immobilisation des enzymes.

Les plasmas basse pression sont les procédés les mieux adaptés au traitement de surface des polymères dans la mesure où ils constituent une source d'espèces chimiquement réactives à température ambiante.

L'introduction de fonctions amines par plasma hors-équilibre peut être envisagée selon différentes voies: le post-greffage, la fonctionnalisation et la polymérisation. Alors que les deux premières méthodes s'avèrent extrêmement intéressantes en terme de cinétique d'incorporation de fonctions amines et de sélectivité, la polymérisation par plasma de précurseurs tels que l'allylamine, dans les conditions douces du plasma, pourrait conduire à la formation d'une couche mince ayant un taux de fonctions amines importantes. Cependant, un compromis doit être trouvé entre la sélectivité du procédé et la stabilité des fonctions formées.

Parmi les différentes méthodes d'immobilisation des enzymes, l'immobilisation par liaisons covalentes permet d'obtenir des liaisons solides entre enzyme et support et paraît ainsi la mieux adaptée pour réaliser des systèmes performants sur de longues durées.

## Références

[1] – **K. Kato, Y. Ikada**

«Selective adsorption of proteins to their ligands covalently immobilized onto microfibers»

Biotechnology and Bioengineering, 47, 5, 1995, p 557-566

[2] – **S. R. Ahmed, A. T. Lutes, T. A. Barbari**

«Specific capture of target proteins by oriented antibodies bound to tyrosinase-immobilized protein A on a polyallylamine affinity membrane surface»

Journal of Membrane Science, 282, 1-2, 2006, p 311-321

[3] – **D. A. Puleo, R. A. Kissling, M. S. Sheu**

«A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy»

Biomaterials, 23, 2002, p 2079-2087

[4] – **S. Rejikumar, S. Devi**

«Immobilization of  $\beta$ -Galactosidase onto polymeric supports»

Journal of Applied Polymer Science, 55, 1995, p 871-878

[5] – **Y. Chen, E. T. Kang, K. G. Neoh, K. L. Tan**

«Covalent immobilization of invertase onto the surface-modified polyaniline from graft copolymerization with acrylic acid»

European Polymer Journal, 36, 2000, p 2095-2103

[6] – **J. M. Song, T. Vo-Dinh**

«Miniature biochip system for detection of Escherichia coli O157:H7 based on antibody-immobilized capillary reactors and enzyme-linked immunosorbent assay»

Analytica Chimica Acta, 507, 2004, p 115-121

[7] – **H. Korri-Youssoufi, C. Richard, A. Yassar**

«A new method for the immobilisation of antibodies in conducting polymers»

Materials Science and Engineering, 15, 2001, p 307-310

[8] – **D. E. McManus, D. H. Randerson**

«A covalently immobilized antibody: The influence of the bond chemistry and support polymer on the uptake, stability and immunoreactivity»

The Chemical Engineering Journal, 32, 1986, p B19-B28

[9] – **Z. Zhang, Q. Chen, W. Knoll, R. Foerch, R. Holcomb, D. Roitman**

«Plasma polymer film structure and DNA probe immobilization»

Macromolecules, 36, 2003, p 7689-7694

[10] – **K. Kato, Y. Ikada**

«Immobilization of DNA onto a polymer support and its potentiality as immunoadsorbent»

Biotechnology and Bioengineering, 51, 1996, p 581-590

[11] – **H. R. Horton, L. A. Moran, R. S. Ochs, J. D. Rawn, K. G. Scrimgeour**

«Principes de biochimie»

De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles, 1994, 1<sup>ère</sup> édition, 3<sup>e</sup> triage 2000, p 53

[12] – **T. Hayashi, Y. Ikada**

«Protease immobilization onto polyacrolein microspheres»

Biotechnology and Bioengineering, 35, 5, 1990, p 518-524

[13] – **J. Kruh**

«Biochimie: études médicales et biologiques, I. biologie cellulaire et moléculaire»

Hermann, éditeurs des sciences et des arts, 1987, p 150

[14] – **W. Marconi**

«Immobilized enzymes: Their catalytic behaviour and their industrial and analytical applications»

Reactive polymers, 11, 1989, p 1-19

[15] – **A. A. Shulga, M. Koudelka-Hep, N. F. Derooij**

«Glucose sensitive enzyme field effect transistor using potassium fericyanide as an oxidizing substrate»

Analytical Chemistry, 66, 1994, p 205-210

[16] – **J. M. Fernandez-Romero, M. D. L. DeCastro**

«Flow through optical biosensor based on the permanent immobilization of an enzyme and transient retention of a reaction product»

Analytical Chemistry, 65, 1993, p 3048-3052

[17] – **S. Ekström, P. Önnarfjord, J. Nilsson, M. Bengtsson, T. Laurell, G. Marko-Varga**

«Integrated microanalytical technology enabling rapid and automated protein identification»

Analytical Chemistry, 72, 2000, p 286-293

[18] – **S. Soni, J. D. Desai, S. Devi**

«Immobilization of Yeast Alcohol Dehydrogenase by entrapment and covalent binding to polymeric supports»

Journal of Applied Polymer Science, 82, 2001, p 1299-1305

[19] – **M. Bartolini, V. Andrisano, I. W. Wainer**

«Development and characterization of an immobilized enzyme reactor based on glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase for on-line enzymatic studies»

Journal of Chromatography A, 987, 2003, p 331-340

[20] – **M. Nouaimi, K. Möschel, H. Bisswanger**

«Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers»

Enzyme and Microbial Technology, 29, 2001, p 567-574

[21] – **L. Cao, F. Van Rantwijk, R. A. Sheldon**

«Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase»

Organic Letter, 2, 2000, p 1361-1364

[22] – **R. Schoevaart, M. W. Wolbers, M. Golubovic, M. Ottens, A. P. G. Kieboom, F. Van Rantwijk, L. A. M. Van der Wielen, R. A. Sheldon**

«Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)»

Biotechnology and Bioengineering, 87, 2004, p 754-762

[23] – **V. V. Mozhaev, N. S. Melik-Nubarov, M. V. Sergeeva, V. Siksnis, K. Martinek**

«Strategy for stabilizing enzyme. Part one: Increasing stability of enzyme via their multi-point interaction with a support»

Biocatalysis, 3, 1990, p 179-187

[24] – **K. Yamada, T. Nakasone, R. Nagano, M. Hirata**

«Retention and reusability of trypsin activity by covalent immobilization onto grafted polyethylene plates»

Journal of Applied Polymer Science, 89, 2003, p 3574-3581

[25] – **M. I. Kim, J. Kim, J. Lee, H. Jia, H. B. Na, J. K. Youn, J. H. Kwak, A. Dohnalkova, J. W. Grate, P. Wang, T. Hyeon, H. G. Park, H. N. Chang**

«Crosslinked enzyme aggregates in hierarchically-ordered mesoporous silica: A simple and effective method for enzyme stabilization»

Biotechnology and Bioengineering, 96, 2007, p 210-218

[26] – **Tai Shung Chung, Kai-Chee Loh, Sock Khiang Goh**

«Development of cellulose acetate membranes for bacteria immobilization to remove phenol»

Journal of Applied Polymer Science, 68, 1998, p 1677-1688

[27] – **S. Ben Rejeb, M. Tatoulian, F. Arefi Khonsari, N. Fischer Durand, A. Martel, J. F. Lawrence, J. Amouroux, F. Le Goffic**

«Functionalization of nitrocellulose membranes using ammonia plasma for the covalent attachment of antibodies for use in membrane-based immunoassays»

Analytica Chimica Acta, 376, 1998, p 133-138

[28] – **L. M. Dai, H. A. W. St. John, J. J. Bi, P. Zientek, R. C. Chatelier, H. J. Griesser**

«Biomedical coatings by the covalent immobilization of polysaccharides onto gas-plasma-activated polymer surfaces»

Surface and Interface Analysis, 29, 2000, p 46-55

[29] – **S. Cosnier, A. Novoa, C. Mousty, R. S. Marks**

«Biotinylated alginate immobilization matrix in the construction of an amperometric biosensor: application for the determination of glucose»

Analytica Chimica Acta, 453, 2002, p 71-79

[30] – **H. Seo, K. Itoyama, K. Morimoto, T. Takagishi, M. Oka, T. Hayashi**

«Spacer effects on enzymatic activity of bromelain immobilized onto porous chitosan beads»

European Polymer Journal, 34, 1998, p 917-922

[31] – **U. Hayat, A. M. Tinsley, M. R. Calder, D. J. Clark**

«ESCA investigation of low-temperature ammonia plasma-treated polyethylene substrate for immobilization of protein»

Biomaterials, 13, 1992, p 801-806

[32] – **M. Mason, K. P. Vercruyse, K. R. Kirker, R. Frisch, D. M. Marecak, G. D. Prestwich, W. G. Pitt**

«Attachment of hyaluronic acid to polypropylene, polystyrene, and polytetrafluoroethylene»

Biomaterials, 21, 2000, p 31-36

[33] – **H. J. Steffen, J. Schmidt, A. Gonzalez-Elipe**

«Biocompatible surfaces by immobilization of heparin on diamond-like carbon films deposited on various substrates»

Surface and Interface Analysis, 29, 2000, p 386-391

[34] – **B. Gupta, C. Plummer, I. Bisson, P. Frey, J. Hilborn**

«Plasma-induced graft polymerization of acrylic acid onto poly (ethylene terephthalate) films: characterization and human smooth muscle cell growth on grafted films»

Biomaterials, 23, 2002, p 867-871

[35] – **M. T. Martín, M. Alcalde, F. J. Plou, A. Ballesteros**

«Covalent immobilization of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) in activated silica and Sepharose»

Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 39, 2002, p 229-234

[36] – **M. Minier, M. Salmain, N. Yacoubi, L. Barbes, C. Méthivier, S. Zanna, C. M. Pradier**

«Covalent immobilization of lysozyme on stainless steel. Interface spectroscopic characterization and measurement of enzymatic activity»

Langmuir, 21, 2005, p 5957-5965

[37] – **J. M. Goddard, J. N. Talbert, J. H. Hotchkiss**

«Covalent attachment of lactase to low-density polyethylene films»

Journal of Food Science, 72, 2007, p E36-E41

[38] – **P. Kingshott, J. Wei, D. Bagge-Ravn, N. Gadegaard, L. Gram**

«Covalent attachment of poly(ethylene glycol) to surfaces, critical for reducing bacterial adhesion»

Langmuir, 19, 2003, p 6912-6921

[39] – **P. Nahar, A. Naqvi, S. Farhat Basir**

«Sunlight-mediated activation of an inert polymer surface for covalent immobilisation of protein»

Analytical Biochemistry, 327, 2004, p 162-164

[40] – **K. Yanagisawa, T. N. Murakami, Y. Tokuoka, A. Ochiai, M. Takahashi, N. Kawashima**

«Immobilization and enzymatique activity of glucose oxidase on polystyrene surface modified with ozone aeration and UV irradiation in distilled water and / or aqueous ammonia solution»

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 48, 2006, p 67-71

[41] – **M. M. Browne, G. V. Lubarsky, M. R. Davidson, R. H. Bradley**

«Protein adsorption onto polystyrene surfaces studied by XPS and AFM»

Surface Science, 553, 2004, p 155-167

[42] – **H. Y. Nie, M. J. Walzak, B. Berno, N. S. McIntyre**

«Atomic force microscopy study of polypropylene surfaces treated by UV and ozone exposure: modification of morphology and adhesion force»

Applied Surface Science, 144-145, 1999, p 627-632

[43] – **P. Kumar, K. C. Gupta**

«A rapide method for the construction of oligonucleotide arrays»

Bioconjugate Chemistry, 14, 2003, p 507-512

[44] – **P. K. Chu, J. Y. Chen, L. P. Wang, N. Huang**

«Plasma-surface modification of biomaterials»

Materials Science and Engineering R, 36, 2002, p 143-206

[45] – **L. M. Dai, H. A. W. St. John, J. J. Bi, P. Zientek, R. C. Chatelier, H. J. Griesser**

«Biomedical coatings by the covalent immobilization of polysaccharides onto gas-plasma-activated polymer surfaces»

Surface and Interface Analysis, 29, 2000, p 46-55

[46] – **J. -S. Bae, E. -J. Seo, I. K. Kang**

«Synthesis and characterization of heparinized polyurethanes using plasma glow discharge»

Biomaterials, 20, 1999, p 529-537

[47] – **C. C. Tsai, Y. Chang, H. W. Sung, J. C. Hsu, C. N. Chen**

«Effects of heparin immobilization on the surface characteristics of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin): an in vitro study»

Biomaterials, 22, 2001, p 523-533

[48] – **Z. y. Wu, Y Yan, G. Shen, R. Yu**

«A novel approach of antibody immobilization based on n-butyl amine plasma-polymerized films for immunosensors»

Analytica Chimica Acta, 412, 2000, p 29-35

[49] – **D. S. Wilson, S. Nock**

«Functional protein microarrays»

Current Opinion in chemical Biology, 6, 2001, p 81-85

[50] – **K. Nakanishi, A. Masao, Y. Sako, Y. Ishida, H. Muguruma, I. Karube**

«Detection of the red tide-causing plankton Alexandrium affine by a piezoelectric immunosensor using a novel method of immobilizing antibodies»

Analytical Letters, 29, 1996, p 1247-1258

[51] – **J. Yang, J. Bei S. Wang**

«Enhanced cell affinity of poly (D-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage»

Biomaterials, 23, 2002, p 2607-2614

[52] – **F. R. Pu, R. L. Williams, T. K. Markkula, J. A. Hunt**



«Effects of plasma treated PET and PTFE on expression of adhesion molecules by human endothelial cells in vitro»

Biomaterials, 23, 11, 2002, p 2411-2428

[53] – **J. Yang, J. Z. Bei, S. G. Wang**

«Improving cell affinity of -poly(D,L-lactide) film modified by anhydrous ammonia plasma treatment»

Polymers for Advanced Technologies, 13 (3-4), 2002, p 220-226

[54] – **A. Harsch, J. Calderon, R. B. Timmons, G. W. Gross**

«Pulsed plasma deposition of allylamine on polysiloxane: a stable surface for neuronal cell adhesion»

Journal of Neuroscience Methodes, 98, 2000, p 135-144

[55] – **J. H. Lee, H. W. Jung, I. K. Kang, H. B. Lee**

«Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups»

Biomaterials, 15, 1994, p 705-711

[56] – **B. Lassen, M. Malmsten**

«Competitive Protein Adsorption at Plasma Polymer Surfaces»

Journal of Colloid Interface Science, 186, 1, 1997, p 9-16

[57] – **Y. M. Lee, J. K. Shim**

«Preparation of pH/temperature responsive polymer membrane by plasma polymerization and its riboflavin permeation»

Polymer, 38, 1997, p 1227-1232

[58] – **P. Kingshott, H. A. W. St John, R. C. Chatelier, H. J. Griesser**

«Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry detection of proteins adsorbed in vivo onto contact lenses»

Journal of Biomedical Materials Research, 49, 2000, p 36-42

[59] – **F. Arefi-Khonsari, M. Tatoulian, J. Kurdi, J. Amouroux**

«Plasma processing of polymers for enhanced adhesion to metals and metal oxides»

Proceedings of the 80th Anniversary Memorial Center Tokyo Institute of Technology Symposium;  
RadTech: Japan, 2000, p 158-165

[60] – **M. T. van Os, B. Menges, R. Foerch, G. J. Vancso, W. Knoll**

«Characterization of plasma-polymerized allylamine using waveguide mode spectroscopy»  
Chemical Material, 11, 1999, p 3252-3257

[61] – **F. Fally, C. Doneux, J. Riga, J. J. Verbist**

«Quantification of the functional groups present at the surface of plasma polymers deposited from propylamine, allylamine, and propargylamine»  
Journal of Applied Polymer Science, 56, 1995, p 597-614

[62] – **S. Sano, K. Kato, Y. Ikada**

«Introduction of functional groups onto the surface of polyethylene for protein immobilization»  
Biomaterials, 14, 1993, p 817-822

[63] – **A. K. Walker, Y Wu, .R. B Timmons G. R. Kinsel, K. D Nelson**

«Quantification of the functional groups present at the surface of plasma polymers deposited from propylamine, allylamine, and propargylamine»  
Analytical chemistry (Technical Note), 71, 1999, p 268-272

[64] – **J. R. Hollahan, B. B. Stafford, R. D. Falb, S. T. Payne**

«Attachment of amino groups to polymer surfaces by radiofrequency plasmas»  
Journal of applied Polymer Science, 13, 1969, p 807-816

[65] – **P. Hamerli, Th. Weigel, Th. Groth, D. Paul**

«Surface properties of and cell adhesion onto allylamine-plasma-coated polyethylenterephthalat membranes»  
Biomaterials, 24, 2003, p 3989-3999.

[66] – **Y., Xing, E., Borguet**

«Specificity and sensitivity of fluorescence labelling of surface species»  
Langmuir, 23, 2007, p 684-688.

[67] – **T. K. Markkula, J. A. Hunt, F. R. Pu, R. L. Williams**

«Surface chemical derivatization of plasma-treated PET and PTFE»

Surface and Interface analysis 34, 2002, p 583-587

[68] – **M. J. Wang, Y. I. Chang, F. Poncin-Epaillard**

«Effects of the addition of Hydrogen in the Nitrogen cold plasma: The surface modification of polystyrene»

Langmuir, 19, 2003, p 8325-8330

[69] – **J. H. Moon, J. W. Shin, S. Y. Kim, J. W. Park**

«Formation of uniform aminosilane thin layers: An imine formation to measure relative surface density of the amine group»

Langmuir, 12, 1996, p 4621-4624

[70] – **X. Jiang, H. Yu, R. Frayne, O. Unal, C. M. Strother**

«Surface functionalization of polyethylene for magnetic resonance signal-enhancing coating materials»

Chemical Material, 14, 2002, p 1914-1920

[71] – **I. Gancarz, J. Bryjak, G. Poźniak, W. Tylus**

«Plasma modified polymers as a support for enzyme immobilization (II. Amines plasma)»

European Polymer Journal, 39, 2003, p 2217-2224

[72] – **S. Alvarez-Blanco, S. Manolache, F. Denes**

«A novel plasma-enhanced way for surface-functionalization of polymeric substrates»

Polymer Bulletin, 2001, p 329-336

[73] – **R. Ganapathy, S. Manolache, M. Sarmadi, W. J. Simonsick, J. R., F. Denes**

«Immobilization of active  $\alpha$ -chymotrypsin on RF-plasma functionalized polymer surfaces»

Journal of Applied Polymer Science, 78, 2000, 1783-1796

## **Chapitre II**

**Modification de surface des films de  
polyéthylène (PE) par procédé  
plasma basse pression  $\text{NH}_3$**

## **Introduction**

### **I. Fonctionnalisation de polymère par traitement plasma RF NH<sub>3</sub> basse pression**

- I.1. Réacteur plasma utilisé pour le traitement de surface des films de polymères
- I.2. Choix du polymère support du greffage des fonctions amines
- I.3. Choix des conditions de traitement de surface par plasma hors équilibre

### **II. Caractérisations physico-chimiques de la surface du PE traité par plasma NH<sub>3</sub>**

- II.1. Caractérisation de l'énergie de surface par la méthode de l'angle de contact
- II.2. Modifications topographiques de la surface du film de PE
- II.3. Mise en évidence des modifications chimiques de la surface du film de PE par spectroscopie de photoélectrons X (XPS)
- II.4. Quantification des fonctions amines greffées à la surface des films de PE traités par plasma NH<sub>3</sub> hors équilibre
  - II.4.1. Principe de la dérivation chimique pour l'identification des fonctions amines greffées
  - II.4.2. Détermination quantitative des amines (primaires, secondaires et tertiaires) greffées à la surface de films de PE
    - II.4.2.1. Dosage des amines primaires
      - II.4.2.1.1. Méthode de dosage à base du réactif sulfo-LC-SPDP
      - II.4.2.1.2. Méthode de dosage à partir du réactif NBZ (nitrobenzaldéhyde)
      - II.4.2.1.3. Méthode de dosage à l'aide des réactifs 2-iminothiolane (ITL) et acide bicinchoninic (BCA)
    - II.4.2.2. Dosage des amines primaires et secondaires
    - II.4.2.3. Dosage des trois classes d'amines (primaires, secondaires, tertiaires) sur les surfaces de PE traitées par plasma NH<sub>3</sub> hors équilibre
  - II.4.3. Comparaison entre les différentes méthodes choisies

### **III. Vieillessement du matériau greffé par des fonctions aminées**

- III.1. Etude du vieillissement de la surface de PE traité par plasma NH<sub>3</sub> par la méthode de l'angle de contact
- III.2. Etude par dérivation chimique du vieillissement des fonctions amines greffées à la surface de films de PE traités par plasma NH<sub>3</sub>
- III.3. Interprétation des études de vieillissement de la surface traité par plasma NH<sub>3</sub>

## **Conclusion**

## **Références**

## Introduction

La technologie plasma basse pression est utilisée pour la modification de polymères permettant un meilleur contrôle des propriétés physico-chimiques comme la mouillabilité et l'adhésion. De plus, le polymère traité présente de nouvelles propriétés de surface adaptées à l'immobilisation de biomolécules.

L'objectif de ce chapitre est de qualifier les propriétés physico-chimiques de la surface du polyéthylène après greffage de fonctions amines à la surface à l'aide d'un plasma d'ammoniac. A cet effet, nous ferons appel à différentes techniques d'analyse de surface en vue de préciser les modifications topographiques et chimiques de la surface.

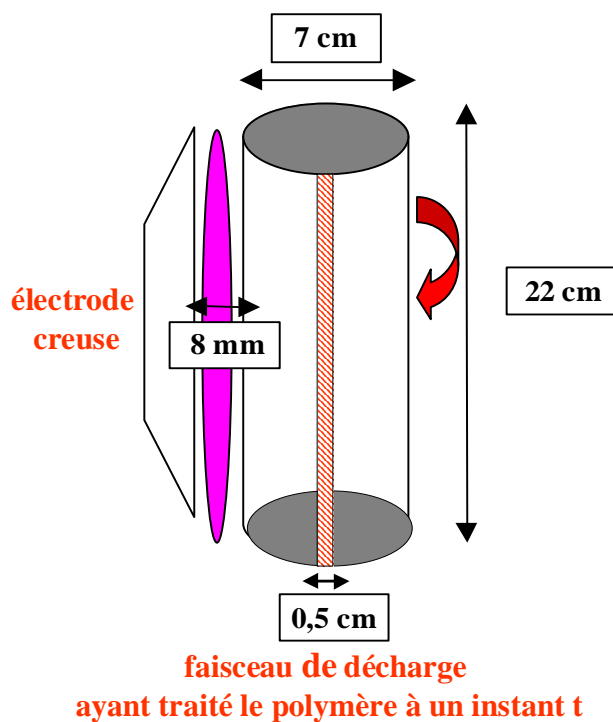
Dans un premier temps, après la description du réacteur plasma basse pression utilisée pour le traitement des films de PE, nous étudierons l'évolution de l'énergie de surface à l'aide de la technique de mesure de la mouillabilité des surfaces par angle de contact. Dans un deuxième temps, les modifications topographiques et chimiques de la surface du PE seront analysées par microscopie électronique à balayage (MEB), microscopie à force atomique (AFM) et spectroscopie de photoélectron X (XPS). Enfin, cette étude sera complétée par différentes méthodes de dérivation chimique dans le but de quantifier les fonctions amines greffées en surface et d'identifier en particulier les amines primaires. Cette mesure est essentielle pour valider les différentes étapes de fixation conduisant à l'immobilisation de l'enzyme.

Ainsi, la corrélation de l'ensemble des résultats obtenus permettra d'établir une meilleure compréhension des modifications de surface associées au traitement plasma  $\text{NH}_3$ .

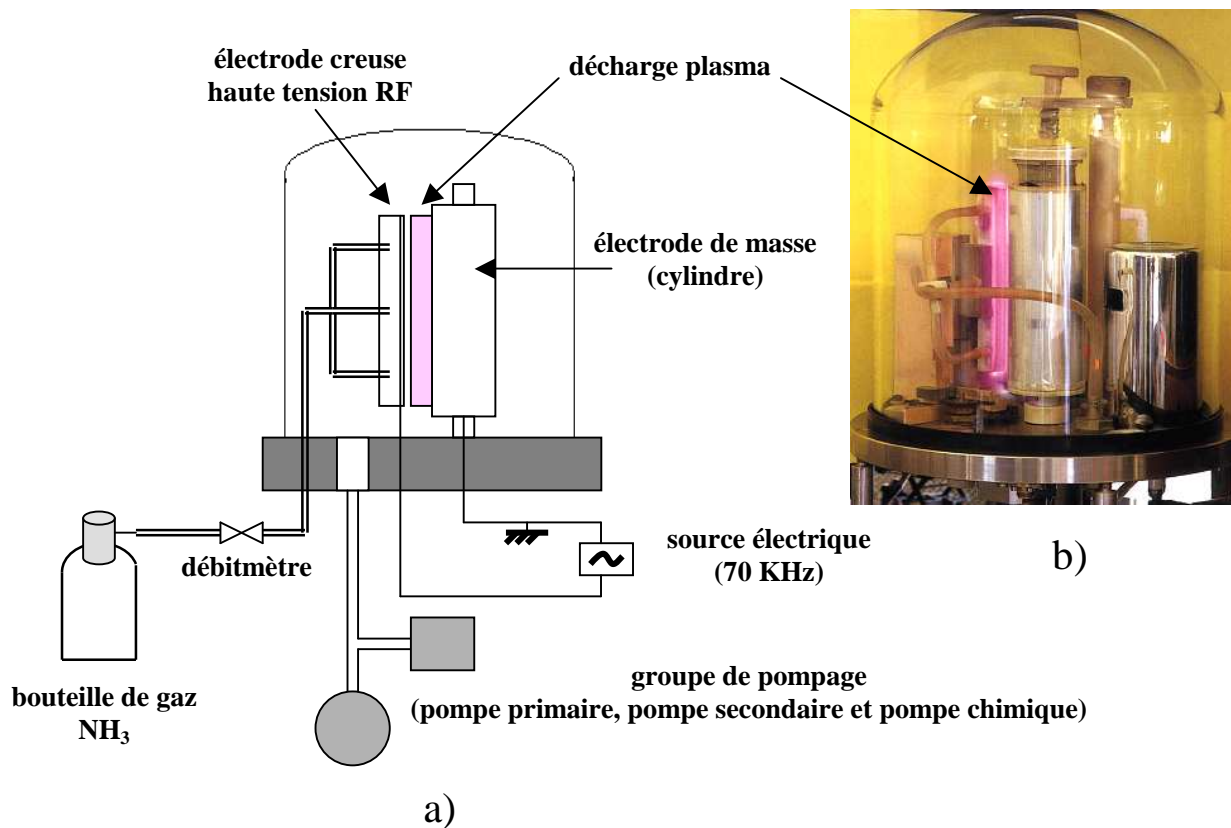
## I. Fonctionnalisation de polymère par traitement plasma RF NH<sub>3</sub> basse pression

### I.1. Réacteur plasma utilisé pour le traitement de surface des films de polymères

Le traitement de surface des films de polymère a été réalisé dans un réacteur plasma basse pression hors équilibre disposant, selon une configuration asymétrique, de deux électrodes de type couteau-cylindre. L'électrode reliée à la haute tension radio-fréquence (RF) est en acier inoxydable, elle se présente comme un couteau creux de longueur 20 cm ayant une ouverture de fente de 0,5 mm pour permettre le passage du flux de gaz plasmagène. La contre-électrode reliée à la masse, est un cylindre de diamètre 7 cm et de longueur 22 cm. Le film de polyéthylène (22 cm par 22 cm) est enroulé autour du cylindre. La vitesse de rotation du cylindre est fixée à 1 tour par seconde ce qui correspond à une vitesse linéaire de 22 cm par seconde. La largeur du rideau plasma traitant le polymère (PE) est estimée à 0,5 cm (Figure II.1.). La face du PE traité peut être divisée en  $22/0,5$ , soit 44 faisceaux de décharge, chaque faisceau étant traité pendant  $1/44$  seconde à chaque tour <sup>[1]</sup>. Ainsi, pour une rotation de 1 tour / s, le temps de traitement est de 0,023 s par seconde écoulée.



**Figure II.1.** Détail de la configuration des électrodes type couteau-cylindre du réacteur plasma RF hors équilibre basse pression



**Figure II.2.** Réacteur plasma RF basse pression utilisé pour le traitement de films de polymère: a) schéma du réacteur et b) photo du réacteur

Les gaz plasmagènes sont injectés à travers l'électrode creuse et la décharge s'établit dans l'espace inter-électrodes, fixé à 8 mm, à l'aide d'une source d'excitation d'une puissance maximale de 800 watts et d'un générateur Radio-Fréquence (RF) délivrant une fréquence de 70 kHz. Pour éviter le risque de passage au régime d'arc, l'électrode haute tension est gainée de polyéthylène haute densité.

Afin d'éliminer l'oxygène atmosphérique, l'installation est placée sous un vide de  $10^{-2}$  Pa pendant une heure puis la circulation du mélange gazeux choisi est établie à l'aide d'un système de pompage primaire et secondaire (pompe turbo-moléculaire). Différents gaz peuvent être utilisés [2,3,4]; cependant notre attention se portera plus particulièrement sur l'utilisation de l'ammoniac [5].

Le groupe du pompage primaire et secondaire assure l'élimination de l'atmosphère N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> jusqu'à  $10^{-2}$  tandis que les conditions de traitement à  $10^2$  Pa en atmosphère NH<sub>3</sub> sont assurées par une pompe chimique utilisant une huile fluorée insensible à la dégradation de ses propriétés par le gaz NH<sub>3</sub> (Figure II.2.). Pour éviter la corrosion de la pompe turbo-moléculaire par NH<sub>3</sub>, une vanne



tiroir permet d'isoler cette pompe et de la protéger durant le traitement. Le système de pompage pendant le traitement est composé d'une pompe primaire et d'une pompe chimique.

## I.2. Choix du polymère support du greffage des fonctions amines

Comme nous l'avons vu précédemment au chapitre I, le traitement par plasma est très utilisé pour le traitement de surface de différents polymères; nous nous intéresserons ici au polyéthylène (PE)  $(-CH_2-CH_2-)_n$  dont les principales propriétés sont <sup>[6,7]</sup>:

- Une résistance chimique élevée et une bonne flexibilité
- Une faible masse spécifique (densité de 0,9-0,92 g/cm<sup>3</sup>)
- Un caractère hydrophobe marqué avec une tension de surface très faible
- Une bonne stabilité thermique (la température maximale d'exploitation est comprise entre 50 et 90°C et la température minimale d'exploitation de -60°C)
- Une très haute pureté et une non toxicité biologique

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé un film de PE basse densité (0,92 g/cm<sup>3</sup>) de 100 µm d'épaisseur fourni par la société Goodfellow (référence: ET 311201). Les principales propriétés sont résumées dans le tableau suivant:

Adsorption d'eau sur 24 heures (%)	<0,015
Indice de réfraction	1,51
Indice limite d'oxygène (%)	17
Conductivité thermique (W m <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	0,33 à 23 °C
Chaleur spécifique (J K <sup>-1</sup> Kg <sup>-1</sup> )	1900-2300

**Tableau II.1.** Caractéristiques des films de PE basse densité (valeurs données par Goodfellow)

Après le traitement, le film de PE traité est découpé en disques de diamètre 2,4 cm (surface S = 4,52 cm<sup>2</sup>).

### I.3. Choix des conditions de traitement de surface par plasma hors équilibre

Les paramètres opératoires utilisés pour le traitement de films de polyéthylène par plasma RF hors équilibre d'ammoniac sont résumés dans le tableau suivant. Ces conditions seront celles utilisées par la suite pour le traitement de films de PE. Notons que ces conditions ont déjà été optimisées par les études effectuées au laboratoire LGPPTS <sup>[8]</sup>.

Gaz	NH <sub>3</sub>
Débit de gaz	175 cm <sup>3</sup> /min
Pression	1,5 mbar
Puissance plasma	40 W
Temps de traitement	2 s

**Tableau II.2.** Conditions opératoires retenues pour le traitement par plasma d'ammoniac hors équilibre

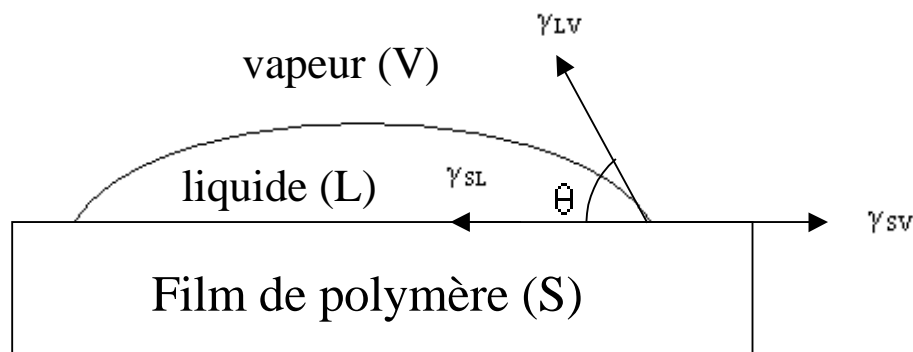
## II. Caractérisations physico-chimiques de la surface du PE traité par plasma NH<sub>3</sub>

L'objectif de cette partie est d'étudier les modifications physico-chimiques induites par le traitement plasma hors équilibre; afin d'étudier la modification de surface engendrée nous avons fait appel à la méthode de l'angle de contact (détermination de l'énergie libre de surface), la spectroscopie de photoélectrons X (XPS), la microscopie de force atomique (AFM) et la microscopie électronique à balayage (MEB). Cette étude sera complétée par une comparaison de différentes méthodes permettant d'identifier et de quantifier les fonctions amines.

### II.1. Caractérisation de l'énergie de surface par la méthode de l'angle de contact

La détermination de l'énergie libre de surface permet de qualifier les modifications morphologiques et chimiques de l'extrême surface; cette mesure repose sur la méthode de l'angle de contact. Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface, l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide est appelé angle de contact. La mesure rend compte de l'aptitude du liquide choisi à s'étaler sur la surface d'un solide; elle permet de qualifier la surface après traitement: hydrophobe (grand angle, faible énergie de surface) ou hydrophile (petit angle, grande énergie de surface). L'interaction liquide / surface est régie par les trois paramètres suivants:

- tension interfaciale solide-liquide  $\gamma_{SL}$  (J/m<sup>2</sup>)
- tension interfaciale solide-vapeur  $\gamma_{SV}$  (J/m<sup>2</sup>)
- tension interfaciale liquide-vapeur  $\gamma_{LV}$  (J/m<sup>2</sup>)



**Figure II.3.** Principe de la mesure d'angle de contact

Ces trois grandeurs sont reliées par l'équation de Young qui est la base de la plupart des méthodes de calcul de l'énergie de surface.

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cdot \cos\theta$$

Le travail d'adhésion entre une surface solide et un liquide peut s'exprimer à l'aide de l'équation combinée de Young-Dupré qui donne une relation directe entre l'adhésion thermodynamique et l'angle de contact de la goutte de liquide déposée sur la surface du polymère:

$$W_{SL} = \gamma_{SV} + \gamma_{LV} - \gamma_{SL}$$

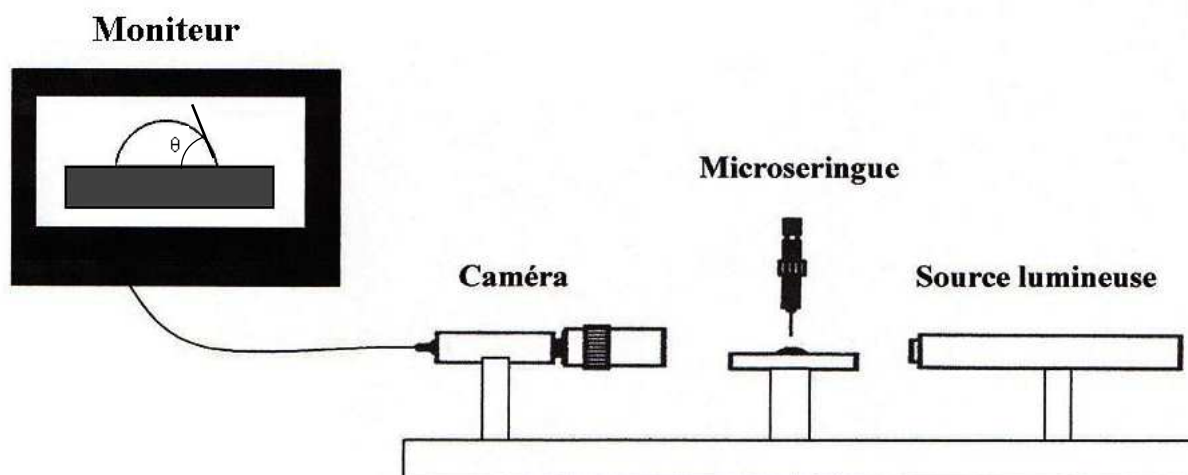
$$W_{SL} = \gamma_{LV} (1 + \cos\theta)$$

Avec:

$\gamma_{LV}$  : énergie libre de surface du liquide (cette valeur vaut 72,8 mJ/m<sup>2</sup> dans le cas de l'eau)

$\theta$ : angle de contact du liquide sur la surface du polymère

Les mesures d'angle de contact sont effectuées automatiquement à l'aide d'un système de traitement d'image avec un intervalle de mesure toutes les 0,6 s. Le système comporte une caméra monochrome de télévision afin de visualiser la goutte déposée, une source de lumière pour l'éclairage de l'échantillon, une microseringue permettant de déposer un volume de  $2 \pm 0,1 \mu\text{l}$  de liquide (en général de l'eau distillée) sur le porte échantillon sur lequel est placé le film de polymère. Pour chaque échantillon, une valeur moyenne a été calculée à partir de 3 analyses effectuées en différents endroits de l'échantillon <sup>[9]</sup>.

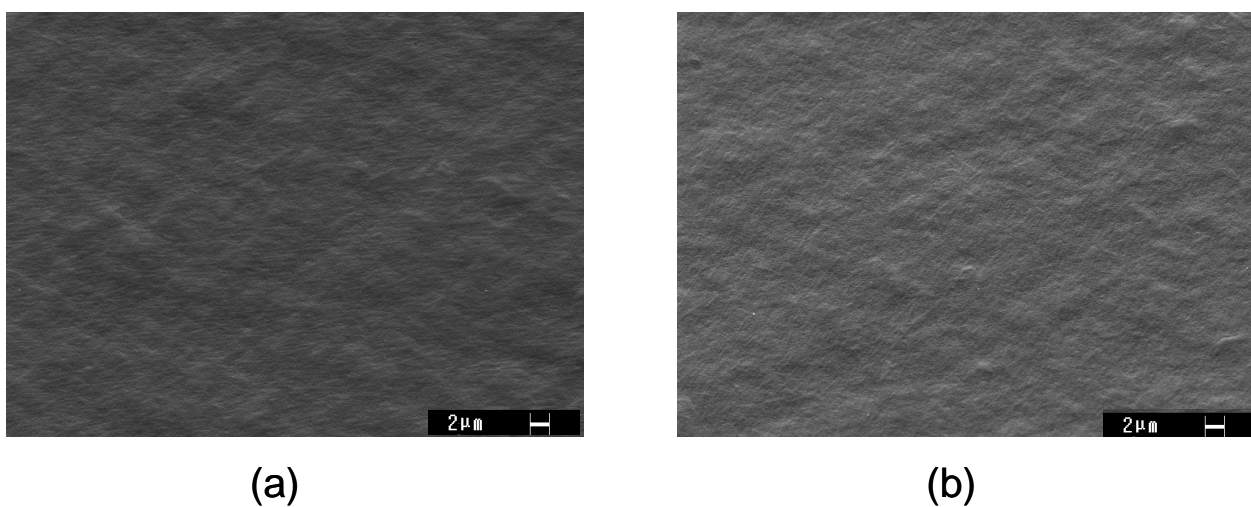


**Figure II.4.** Dispositif de la mesure de l'angle de contact

Les résultats de la mesure de l'angle de contact de l'eau montrent que le film de PE non traité a une valeur relativement élevée de l'ordre de 90° ( $\cos \theta = 0$ ) ce qui indique le caractère hydrophobe et la grande inertie chimique de ce matériau. En revanche après traitement par plasma d'ammoniac cette valeur atteint  $54^\circ \pm 2^\circ$  ( $\cos \theta > 0,59$ ) ce qui révèle le caractère hydrophile de la surface dû à la présence des groupements polaires greffés sur la surface traitée par plasma.

## II.2. Modifications topographiques de la surface du film de PE

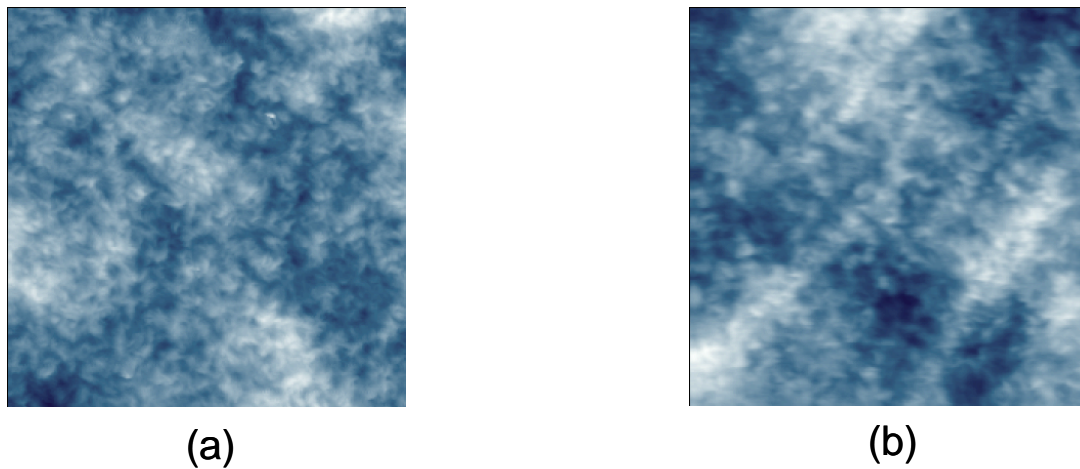
L'analyse par MEB a été réalisée au laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques (LISE, université Pierre et Marie Curie). La description de cette technique d'analyse figure en annexe A.4. Les figures II-5 a et b représentent respectivement les micrographies MEB d'une surface de PE non traité et d'une surface traitée par plasma NH<sub>3</sub>. La comparaison des photos a et b souligne que la morphologie de la surface n'a pas été modifiée de façon remarquable, même si l'on croît discerner une légère augmentation de la rugosité.



**Figure II.5.** Micrographies MEB d'une surface de (a) PE non traité et (b) PE traité par plasma hors équilibre ( $Q_{\text{NH}_3} = 175$  sccm,  $P_w = 40$  W,  $P = 1,5$  mbar,  $t = 2$  s)

Pour essayer de préciser l'observation par MEB, nous avons aussi effectué une analyse par microscopie à force atomique (AFM) afin de visualiser l'état de surface et d'éventuellement mettre en évidence une évolution de la rugosité (Figure II.6). Les images ont été effectuées par un appareil NT-MDT (Smena Head, Solver electronics) équipé d'un cantilever standard de silicium et une fréquence de résonance de 150 Hz en mode de semi contact (Institute of Health and Consumer Protection, Ispra, Italie). Le détail de cette analyse est présenté en annexe A.3. Entre ces images a et

b, la microscopie par force atomique ne révèle pas de modifications topographiques importantes de la surface des films de PE.



**Figure II.6.** Images AFM de la surface de (a) PE non traité et (b) PE traité par plasma hors équilibre (échelle 10  $\mu\text{m}$  / 10  $\mu\text{m}$ ) ( $Q_{\text{NH}_3} = 175$  sccm,  $P_w = 40$  W,  $P = 1,5$  mbar,  $t = 2$  s)

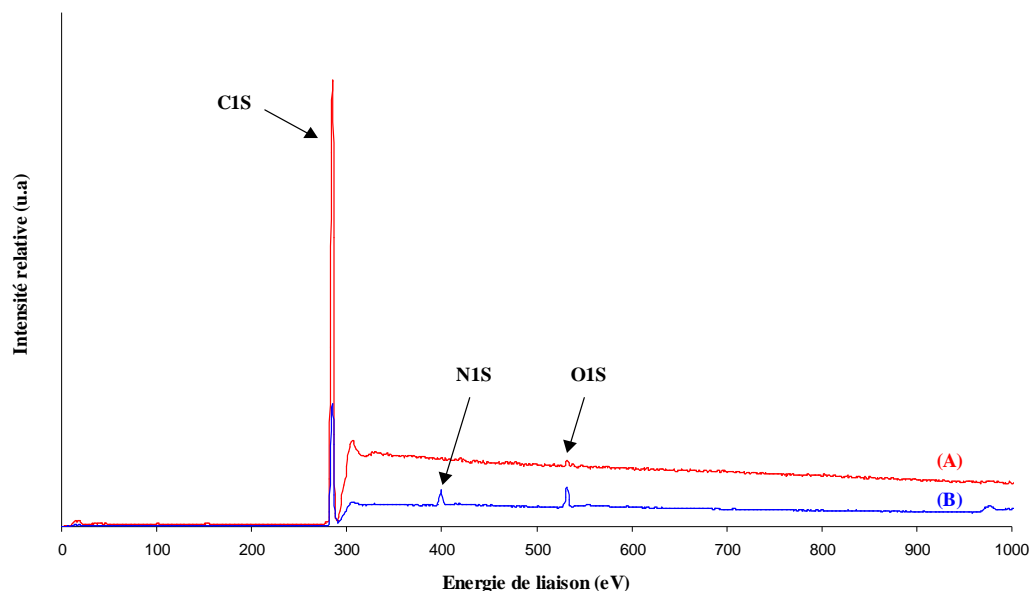
### II.3. Mise en évidence des modifications chimiques de la surface du film de PE par spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

En dehors de l'aspect énergétique et topographique lié à la modification de surface, il est nécessaire de déterminer la nature des groupements chimiques présents à la surface du PE. Pour ce faire, nous avons utilisé la spectroscopie de photoélectrons X (XPS). Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes (ITODYS, Université Paris 7). Le dispositif expérimental est un spectromètre Thermo VG ESCALAB 250 avec une source monochromatique Al K $\alpha$  ( $h\nu=1486,6$  selon un angle de 90° par rapport à la surface (annexe A.2.).

La quantification des données XPS est effectuée à partir de la surface des pics des photoélectrons et des facteurs de sensibilité pour le carbone (1,0), l'azote (1,80) et l'oxygène (2,93). La largeur à mi-hauteur a été choisie de façon qu'elle soit la même pour tous les pics d'un même élément. Les lignes de base employées sont de type linéaire. Les spectres sont calibrés par rapport au pic C<sub>1s</sub> à 285,0 eV.

La Figure II.7 présente le spectre général analysé entre 0 et 1000 eV de la surface de PE non traité (A) et traité (B) par plasma d'ammoniac hors équilibre. On détecte sur le spectre des films de

PE traité l'incorporation d'azote (N<sub>1S</sub> à 400 eV) et d'oxygène (O<sub>1S</sub> à 532 eV) traduisant la fonctionnalisation de la surface par le traitement.



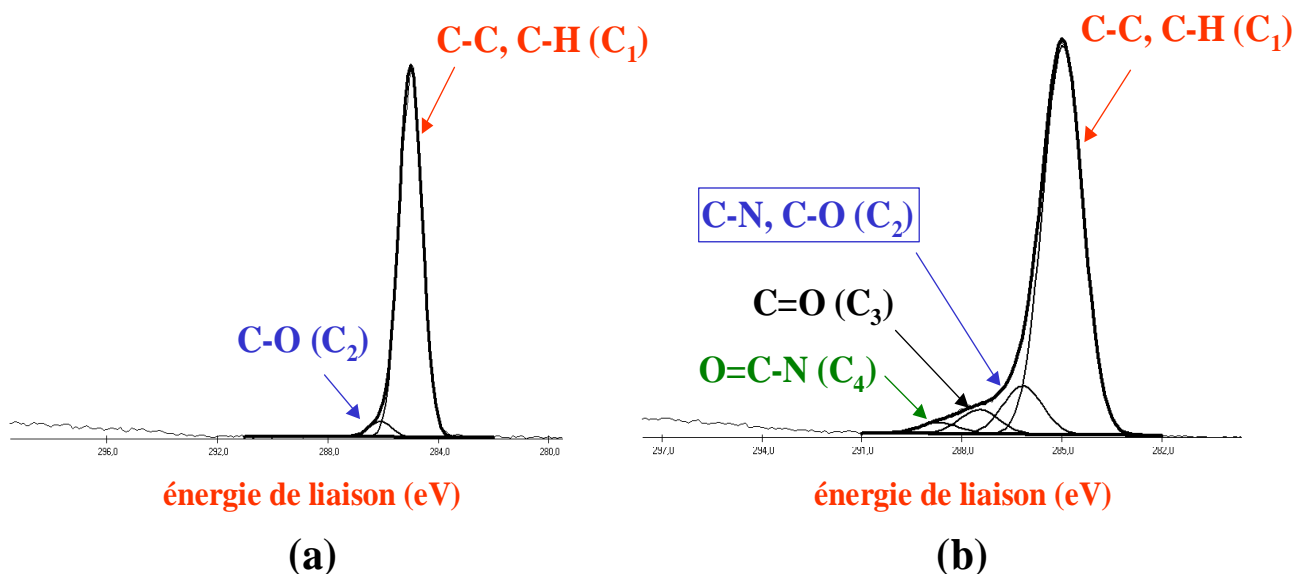
**Figure II.7.** Spectre XPS de la surface de PE non traité (A) et PE traité par plasma d'ammoniac hors équilibre (B): ( $Q_{\text{NH}_3} = 175$  sccm,  $P_w = 40$  W,  $P = 1,5$  mbar,  $t = 2$  s)

La présence d'oxygène à la surface du PE, provient soit de la réaction directe sur le PE de l'oxygène résiduel du réacteur après excitation par la décharge, soit de réactions entre les nouvelles espèces chimiques greffées sur la surface traitée et l'oxygène ambiant au moment de la remise à l'air (post oxydation) des échantillons <sup>[10]</sup>. Le PE non traité présente un faible pourcentage d'oxygène ( $O/C = 0,007$ ) dû à des contaminations extérieures ou à la migration vers la surface d'additifs résiduels. Ce pourcentage augmente significativement, jusqu'à 0,064, après le traitement.

La déconvolution de chaque spectre permet d'effectuer une analyse plus fine des liaisons chimiques incorporées à la surface. Le spectre des photoélectrons C<sub>1S</sub> du carbone après un traitement plasma indique l'apparition de nouveaux pics autres que ceux correspondant aux liaisons C-C ou C-H (C<sub>1</sub> à 285 eV). On observe la formation de groupements amines, nitriles, alcools ou éthers (C<sub>2</sub> à 286,2 eV), ainsi que des groupements imines, cétones, aldéhydes (C<sub>3</sub> à 287,5 eV) et des groupements amides (C<sub>4</sub> à 288,7 eV).

Notons que l'écart d'énergie entre les liaisons C=N et C=O ne permet pas de les distinguer l'une de l'autre. Cependant les résultats présentés dans la littérature montrent que dans un plasma

ammoniac, on observe rarement des fonctions imine <sup>[45,46]</sup>. En conséquence, le pic C<sub>3</sub> correspond vraisemblablement à des groupements C=O.



**Figure II.8.** Spectre XPS des électrons C<sub>1S</sub> de la surface de PE non traité (a) et PE traité par plasma NH<sub>3</sub> hors équilibre (b) (Q<sub>NH3</sub> = 175 sccm, P<sub>w</sub> = 40 W, P = 1,5 mbar, t = 2 s)

L'évolution de ces composantes (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>) est représentée dans le tableau suivant:

	O / C	N / C	285,0 eV C <sub>1</sub> (%)	286,2 eV C <sub>2</sub> (%)	287,5 eV C <sub>3</sub> (%)	288,7 eV C <sub>4</sub> (%)
PE non traité	7.10 <sup>-3</sup>	0	96	4	0	0
PE traité	0,064	0,12	82,4	10,2	5,1	2,3

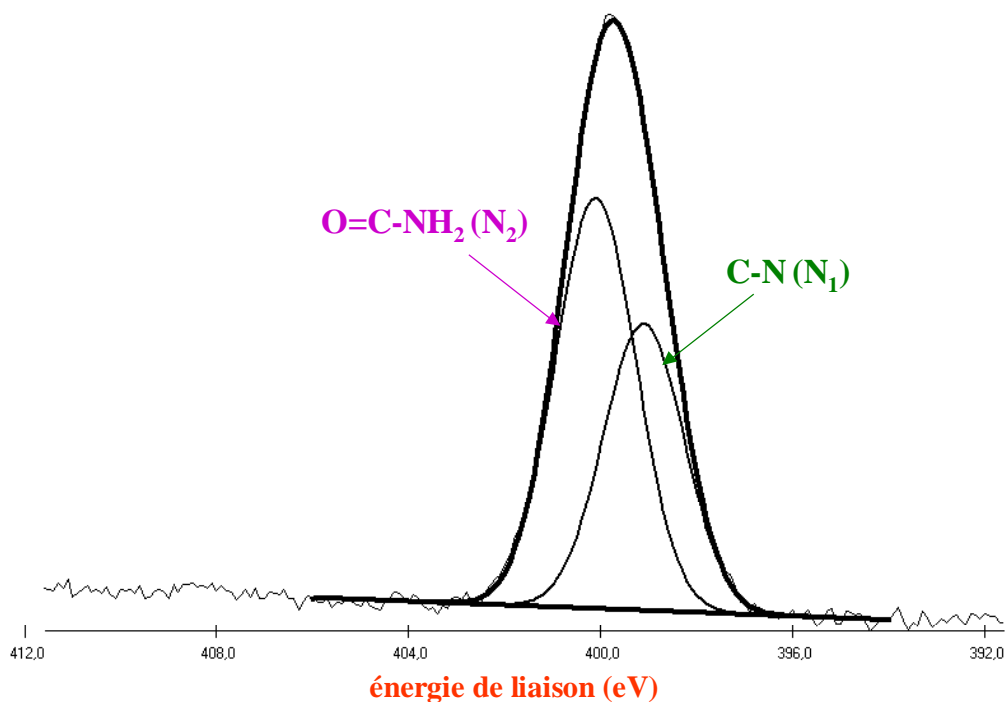
**Tableau II.3.** Répartition de l'aire des composantes du pic C<sub>1S</sub> (PE traité et non traité)

A l'issu du traitement plasma, on constate que l'aire de la composante C<sub>1</sub> décroît, alors que l'aire des composantes C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub> augmente, du fait de l'apparition de nouvelles fonctions. L'aire de la composante C<sub>2</sub> qui engloberait des fonctions amines est toujours supérieure à celles du C<sub>3</sub> et du C<sub>4</sub>. Il est à noter que l'écart d'énergie entre les liaisons C-N et C-O (C<sub>2</sub>) n'est pas suffisant pour les distinguer l'une de l'autre.

Le spectre de N<sub>1S</sub> (Figure II.9.) montre sans ambiguïté la présence de fonctions amines (N<sub>1</sub> à 399,1 eV) et amides (N<sub>2</sub> à 400,1 eV) sur la surface du PE traité. D'après les résultats, le pourcentage des fonctions amides (59 %) est plus élevé en comparaison des amines (41 %). Cela signifie



l'importance du rôle joué par l'oxygène dans le traitement de la surface de PE. Cependant, l'analyse XPS ne nous a pas permis de séparer clairement les différentes fonctions amines selon leur classe, primaire, secondaire ou tertiaire.



**Figure II.9.** Spectre XPS de l'azote  $\text{N}_{1s}$  à la surface du PE traité par plasma  $\text{NH}_3$  hors équilibre ( $Q_{\text{NH}_3} = 175$  sccm,  $P_w = 40$  W,  $P = 1,5$  mbar,  $t = 2$  s)

Afin de quantifier le nombre de fonctions amines en surface et de préciser leur classe nous décrirons dans le prochain paragraphe différentes méthodes de dérivation chimique et comparerons les résultats obtenus avec celles nous ayant paru les mieux adaptées à notre sujet.

## **II.4. Quantification des fonctions amines greffées à la surface des films de PE traités par plasma NH<sub>3</sub> hors équilibre**

L'objectif final de la fonctionnalisation de la surface de films de polyéthylène par voie plasma est l'immobilisation de biomolécules via des liaisons covalentes. Or, si les mesures par XPS montrent clairement une transformation de la surface par incorporation de fonctions azotées, elles ne donnent qu'une valeur relative de l'abondance de ces fonctions et, de plus, ne permettent pas de faire la distinction entre amines primaires, secondaires et tertiaires. Il est donc important de quantifier la concentration surfacique des amines greffées pour valider ce facteur en terme d'efficacité d'immobilisation de biomolécules.

### **II.4.1. Principe de la dérivation chimique pour l'identification des fonctions amines greffées**

De nombreuses méthodes sont décrites dans la littérature pour doser les amines primaires, secondaires ou tertiaires à la surface de matériaux. Ce sont généralement des méthodes de dérivation chimique dans lesquelles on utilise des sondes chimiques qui, dans une première étape (étape 1), réagissent spécifiquement avec certaines fonctions à la surface. Une ou plusieurs étapes de rinçage doivent permettre d'éliminer les sondes n'ayant pas réagi. Ensuite, deux types de stratégies peuvent être suivies : (I) la sonde est libérée par coupure de la liaison formée dans l'étape 1 et il s'agit alors de doser directement la sonde en solution ; (II) la sonde est quantifiée en restant fixée à la surface : dans certains cas (IIa) la surface est observée directement, ce qui conduit généralement à des estimations semi-quantitatives ; dans d'autres cas (IIb), elle se comporte comme une espèce réactive pouvant transformer un autre composé en solution ; le produit de cette dernière réaction est alors quantifié.

Les différentes sondes chimiques présentées dans la littérature pour le dosage des fonctions amines sont regroupées dans le tableau suivant II.4.

Ainsi, les sondes testées dans la littérature sont souvent choisies en fonction de leurs propriétés spectrophotométriques permettant un dosage précis et sensible (absorption UV-visible, fluorescence).

Dans la voie (IIb) où une mesure quantitative est possible, les réactions mises en œuvre avec la surface sont généralement choisies pour faciliter la détection et la mesure d'un produit de réaction, par spectrophotométrie.

Voie	Fluorescence	XPS	UV-visible	Classes d'amines
I	–	–	trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) <sup>[11]</sup> 4-nitrobenzaldehyde (NBZ) <sup>[12]</sup>	primaires
I	–	–	acide orange II <sup>[13,14]</sup> bleu de bromophénol (BPB) <sup>[15]</sup>	primaires, secondaires, tertiaires
IIa	fluorescamine <sup>[16,17]</sup> (2-furoyl) quinoline-2-carboxyaldehyde (Atto Tag FQ) <sup>[18]</sup>	trifluoromethyl benzaldehyde (TFBA) <sup>[19,20]</sup> pentafluorobenzaldehyde <sup>[21]</sup>	–	primaires
IIa		Trifluoroacetic anhydride (TFAA) <sup>[19,20]</sup>	–	primaires, secondaires
IIa	Fluoresceine-isothiocyanate (FITC) <sup>[22]</sup> 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES) <sup>[23]</sup> 2-cyanoethyl triethoxysilane (CETES) <sup>[23]</sup> difluoro-dimethyl-bora-diaza-s-indacene-propionic acid (D2183) <sup>[24]</sup>	Chloro trifluoromethyl benzaldehyde (CTFMBA) <sup>[25]</sup> bromosalicylaldehyde <sup>[26]</sup> chlorobenzaldehyde <sup>[26]</sup>	–	primaires, secondaires, tertiaires
IIb	–	–	sulfo-LC-SPDP <sup>[27]</sup> ITL / BCA <sup>[28]</sup>	primaires
IIb	–	–	sulfo-SHPP / BCA <sup>[28]</sup>	primaires, secondaires

**Tableau II.4.** Différentes sondes chimiques pour la détection des fonctions amines sur la surface

La grande majorité des travaux publiés concernent le dosage des amines primaires, sur des surfaces fonctionnalisées de silice ou de verre, sur des films ou des billes de polymères recouverts d'un dépôt de polymère aminé. Nous n'avons trouvé que peu de données concernant des polymères traités par plasma NH<sub>3</sub>.

De plus, une difficulté est apparue très vite dans nos premières expériences du fait des natures différentes des deux faces de nos échantillons: les mesures d'énergie de surface déjà présentées, montrent bien une face non traitée hydrophobe et une face traitée hydrophile. Il s'est

donc avéré très important de sélectionner des sondes n'engageant pas de liaisons non-spécifiques (par physi-sorption par exemple) avec les surfaces, en particulier avec la face non traitée.

## **II.4.2. Détermination quantitative des amines (primaires, secondaires et tertiaires) greffées à la surface de films de PE**

### **II.4.2.1. Dosage des amines primaires**

Afin de mesurer la densité surfacique des amines primaires greffées les trois méthodes décrites dans la littérature ont été testées:

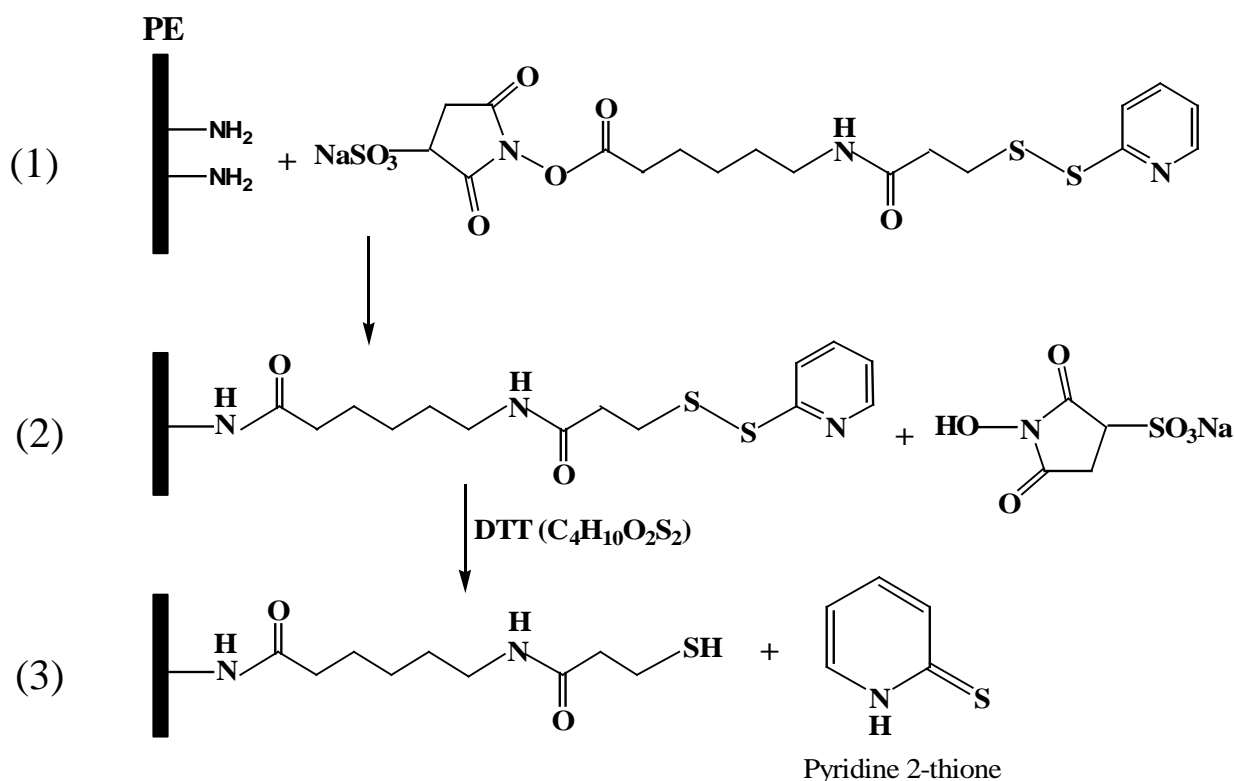
Une méthode de type (I) utilisant le nitrobenzaldéhyde (NBZ),

Deux méthodes de type (IIb) associant d'une part, le sulfosuccinimidyl 6-[3'-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoate (sulfo-LC-SPDP) et le dithiothreitol (DTT) et d'autre part, le 2-iminothiolane (ITL) avec l'acide bicinchoninic (méthode ITL/BCA).

## II.4.2.1.1. Méthode de dosage à base du réactif sulfo-LC-SPDP

## a) Principe

La réaction (1) du sulfosuccinimidyl 6-[3'-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoate (sulfo-LC-SPDP) <sup>[27]</sup> est spécifique aux sites greffés par des amines primaires en formant une liaison amide. Cette liaison est hydrolysable en présence de dithiothreitol (DTT); (2) le 2-pyridylthiol (forme tautomère de la pyridine 2-thione) (3) libéré est alors déterminé par spectroscopie UV visible.



**Figure II.10.** Principe de la quantification des amines primaires par la méthode au sulfo-LC-SPDP

## b) Protocole opératoire

Les disques de PE ont été activés selon le protocole suivant :

- Incubation des échantillons dans une solution aqueuse 10 mM de sulfo-LC-SPDP pendant 60 minutes à la température ambiante
- Immersion / rinçage des disques dans l'eau distillée (3 fois)
- Séchage à l'air

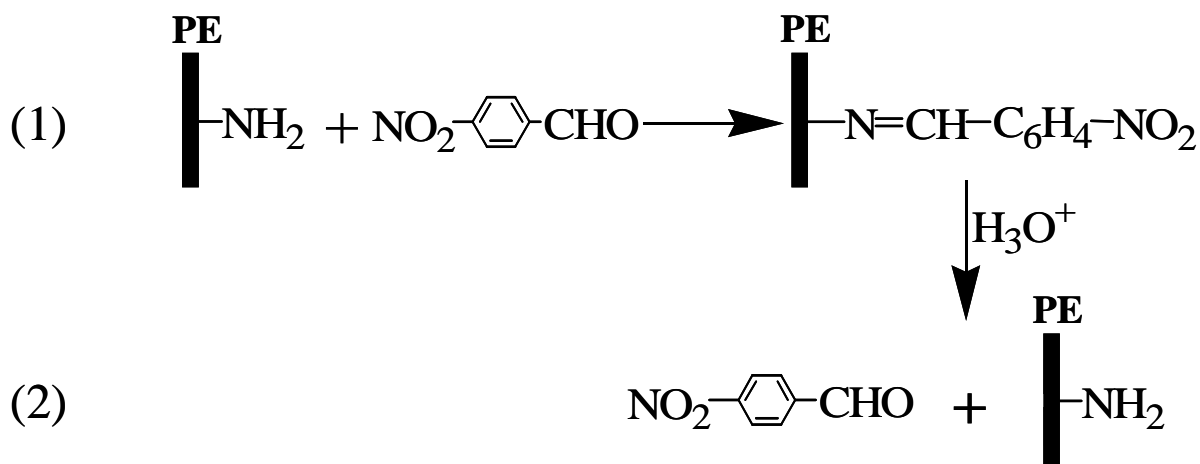
- Préparation de la solution de dithiothreitol à 20 mM dans l'eau
- Incubation des échantillons dans cette solution pendant 30 min
- Mesure de la densité optique (DO) à 343 nm correspondant à l'absorption de la pyridine 2-thione

Les disques de PE non traité par plasma sont pris comme tests de contrôle pour estimer les adsorptions non spécifiques. Notons que le coefficient d'extinction de la pyridine 2-thione donné par Pierce est 8080 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

#### II.4.2.1.2. Méthode de dosage à partir du réactif NBZ (nitrobenzaldéhyde)

##### a) Principe

Dans une première étape (1), on fait réagir le nitrobenzaldéhyde (NBZ) avec les amines primaires en formant une imine stable. Cette fonction est hydrolysable en présence de l'acide acétique (2) et le NBZ relargué est mesuré par UV visible. Notons que cette méthode de dérivation a été déjà utilisée sur des wafers de silicium activés par aminosilanisation [29].



**Figure II.11.** Réaction entre les amines primaires et NBZ

##### b) Protocole opératoire

Les étapes présentées ci-dessous suivent un protocole décrit par ailleurs [30] :

- Préparation de 25 ml de méthanol anhydre contenant 10 mg de NBZ, 0,02 ml d'acide acétique et 1g de tamis moléculaire (4 Å) conservé sous argon

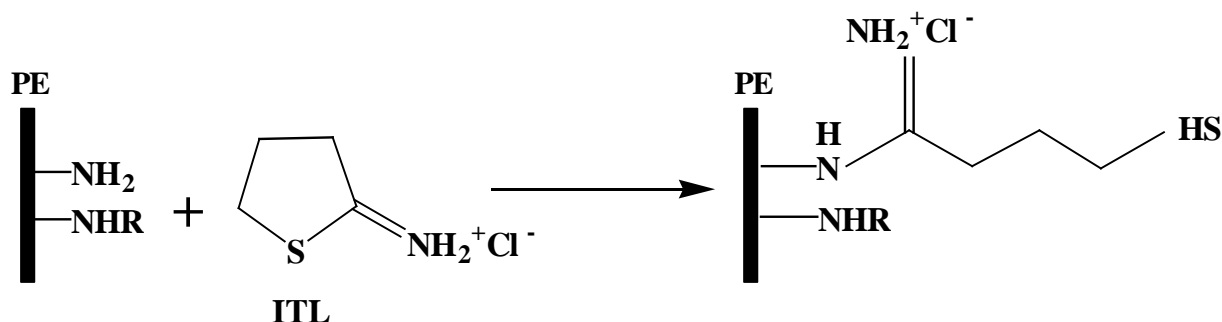
- Immersion des échantillons dans cette solution à 50°C et pendant 3 heures
- Lavage au méthanol absolu dans un bain à ultra-sons et puis séchage à l'air
- Immersion des disques dans 15 ml de l'eau distillée contenant 0,02 ml d'acide acétique pendant 1 heure à 30°C
- Séparation des disques de cette solution après 1 heure
- Mesure de la densité optique par spectroscopie UV/visible

La courbe d'étalonnage a été déterminée à chaque expérience à l'aide de solutions standards de NBZ suivant le protocole décrit ci-dessus: solvant eau:acide acétique (15:0,02 v/v); 1h à 30°C avant mesure.

#### II.4.2.1.3. Méthode de dosage à l'aide du réactif 2-iminothiolane (ITL)/acide bicinchoninic (BCA)

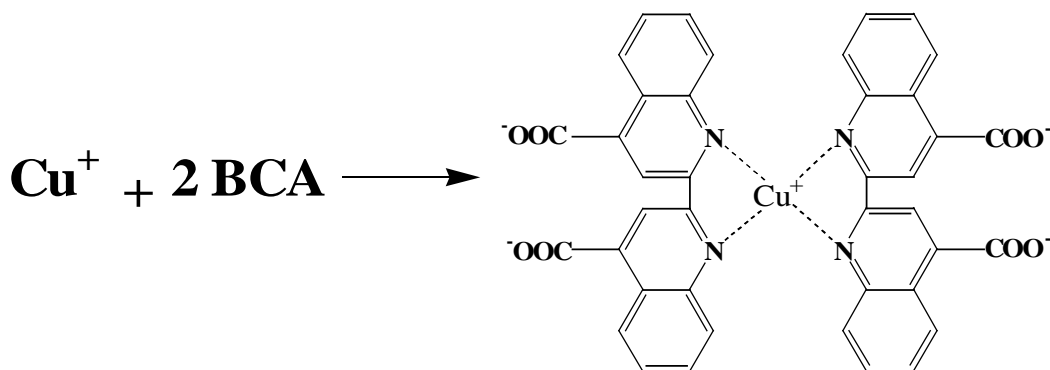
##### a) Principe

Dans une première étape, le 2-iminothiolane (ITL) réagit sur la surface du film de PE spécifiquement avec les amines primaires, avec formation d'une liaison covalente (Figure II. 12). Il se forme alors un chlorure d'iminium possédant une extrémité réductrice HS (sulphydryl).



**Figure II.12.** Schéma réactionnel du 2-iminothiolane (ITL) avec les amines primaires

Dans la seconde étape de la dérivation, on utilise cette propriété réductrice de la surface pour réduire de façon quantitative l'ion cuivrique Cu<sup>2+</sup> en ion cuivreux Cu<sup>+</sup>. Ce dernier est dosé ensuite par réaction avec l'acide bicinchoninic (BCA) qui forme un complexe coloré (bleu-violet intense).



**Figure II.13.** Réaction entre l'acide bicinchoninic (BCA) et les ions cuivreux ( $\text{Cu}^+$ )

b) Protocole opératoire

La méthode au BCA permettant de mesurer la densité des amines primaires en utilisant le réactif ITL <sup>[28]</sup> est présentée ci-dessous:

- Préparation de la solution de 2-iminothiolane (ITL) (20 mM) / 4-diméthylaminopyridine (DMAP) (20 mM) dans un tampon bicarbonate de sodium à 0,1 M (pH=8,5) contenant 3 % (v/v) de Triton X-100
- Ajout de 1 ml de cette solution dans les réacteurs: flacons de verre munis d'un bouchon à vis
- Immersion des échantillons dans cette solution pendant 1 heure à la température ambiante sur une table d'agitation (les réacteurs sont fermés hermétiquement pendant l'incubation)
- Rinçage des échantillons à l'eau distillée (2 fois) et à l'éthanol absolu (2 fois); utilisation de la table agitante
- Préparation de la solution de DL-dithiothreitol (DTT) 1 mM dans l'eau
- Incubation des disques dans cette solution, puis rinçage à l'éthanol absolu (2 fois)
- Rinçage final avec un tampon carbonate de sodium 0,25 M, pH 10-11 (3 fois)
- Séchage à l'air

On prépare ensuite la solution de BCA avec le mélange de 50 ml du réactif A (BCA et tartrate de sodium - tampon carbonate) et de 1 ml du réactif B ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  4%) juste avant utilisation. Un mélange de 2 ml de la solution de BCA et 100  $\mu\text{l}$  de tampon carbonate de sodium 0,25 M, pH 10-11 sont ajoutés dans le réacteur contenant le disque de PE. Les réacteurs sont ensuite fermés et incubés dans un bain marie pendant 1 h à 60°C, puis refroidis à la température ambiante. L'absorbance des solutions violettes est ensuite mesurée à 562 nm.



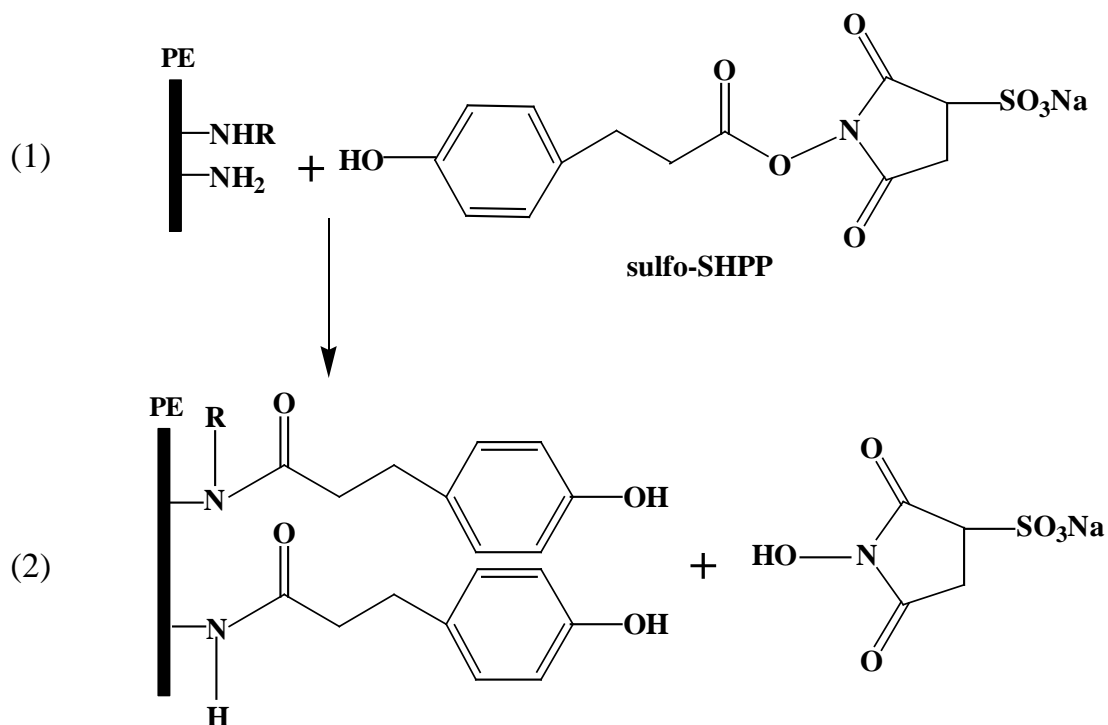
Afin d'estimer l'équivalent en amines primaires présentes sur la surface ayant réagi avec ITL, nous avons préparé des solutions standards de cystéine entre 0 et 0,025 mM. Les mélanges de 100 µl de ces solutions et 2 ml de la solution BCA sont incubés sous les mêmes conditions que celles présentées précédemment (1 heure à 60°C). Nous avons choisi pour références les disques de PE non traité. Des tests de contrôle ont également été effectués sur les disques de PE traité suivant le même protocole mais sans l'étape d'activation par ITL, pour mettre en évidence d'éventuelles adsorptions non spécifiques.

### II.4.2.2. Dosage des amines primaires et secondaires

La méthode de dosage mettant en jeu les réactifs sulfo-SHPP et l'acide bicinchoninic (BCA) a été choisie pour la détermination des amines primaires et secondaires sur la surface de disques de PE traité par plasma NH<sub>3</sub> hors équilibre.

#### a) Principe

Le sulfosuccinimidyl-3-[4-hydroxyphenyl] propionate (sulfo-SHPP) réagit du côté de sa fonction succinimide avec les amines primaires et secondaires de surface pour donner une liaison amide, tandis que son extrémité réductrice (hydroxyphenyl) reste libre à la surface (1).



**Figure II.14.** Schéma réactionnel du sulfo-SHPP avec les amines primaires et secondaires

La seconde étape (2) repose sur la réduction quantitative des ions cuivriques Cu<sup>2+</sup> par la fonction hydroxyphenyl. Les ions cuivreux Cu<sup>+</sup> ainsi formés sont alors titrés par le réactif BCA comme décrit précédemment (Figure II.13).

#### b) Protocole opératoire

Les disques de PE traités sont activés par le sulfo-SHPP <sup>[28]</sup> selon le protocole d'activation ci-dessous:

- Préparation de la solution de sulfo-SHPP (20 mM) dans le tampon bicarbonate de sodium 0,1 M (pH=8,5) contenant 3 % (v/v) de Triton X-100
- Immersion des échantillons dans 1 ml de cette solution pendant 1 heure à la température ambiante en agitant à l'aide d'un incubateur va et vient (les réacteurs sont bien fermés pendant l'incubation)
- Rinçage des échantillons à l'eau distillée (2 fois) et à l'éthanol absolu (2 fois) sous agitation (incubateur va et vient)
- Préparation d'une solution aqueuse de 1,6-diaminohexane 0,1 M; ajustement du pH à 8,5 par ajout progressif de HCl
- Immersion / lavage des disques dans cette solution
- Rinçage final avec un tampon carbonate de sodium 0,25 M, pH 10-11 (3 fois)
- Séchage à l'air

Après activation des échantillons par le sulfo-SHPP, on prépare la solution de BCA selon le protocole déjà présenté dans le cas de ITL.

Comme précédemment, nous avons choisi pour références les disques de PE non traité; et afin d'évaluer les adsorptions non spécifiques des échantillons de PE, nous avons effectué des tests de contrôle sur les disques de PE traité suivant le même protocole déjà écrit mais sans l'étape d'activation par le réactif sulfo-SHPP.

Pour déterminer l'équivalent en amines primaires et secondaires qui réagissent avec le réactif sulfo-SHPP, nous avons préparé des solutions standard de tyrosine à des concentrations comprises entre 0 et 0,025 mM. Les mélanges de 100 µl de ces solutions et 2 ml de la solution de BCA sont incubés sous les mêmes conditions que celles présentées précédemment (1heure, 60°C).

### II.4.2.3. Dosage des trois classes d'amines (primaires, secondaires, tertiaires) sur les surfaces de PE traitées par plasma NH<sub>3</sub> hors équilibre

#### a) Principe

Cette technique repose sur la réaction du bleu de bromophénol (BPB) avec les trois classes d'amines<sup>[15,31]</sup>. Le Tetrabromophenolsulfonephthalein (BPB) réagit avec les fonctions amines selon une réaction acide base pour former une liaison stable (1). Après rinçage, les échantillons sont plongés dans une solution de pipéridine dans le DMF (diméthylformamide), qui libère l'ensemble des molécules sondes en solution (2). Celles-ci sont ensuite quantifiées par spectrophotométrie UV-visible.

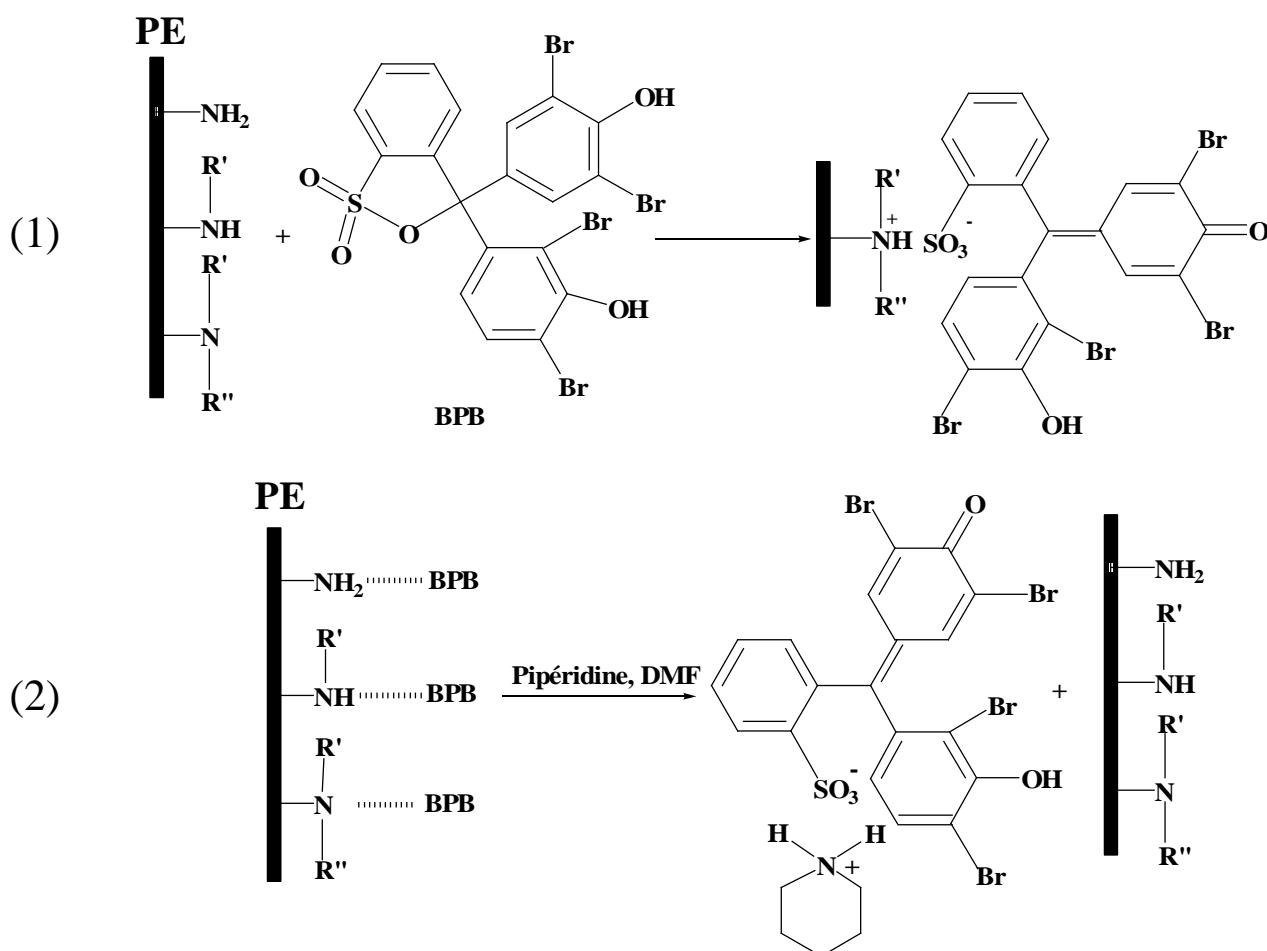


Figure II.15. Détermination des fonctions amines (trois classes) par BPB

#### b) Protocole opératoire

Après le traitement par plasma, les disques de PE sont préparés selon le protocole suivant:

- Préparation de la solution de BPB à  $3.10^{-2}$  M dans le diméthylformamide (DMF)
- Immersion des disques dans cette solution pendant 30 min
- Rinçage à l'éthanol jusqu'à la disparition de la coloration
- Séchage à l'air
- Préparation de la solution de pipéridine (20 % v/v) dans le DMF
- Mesure de la DO à 605 nm

Des solutions standard de BPB dans le milieu pipéridine / DMF sont préparées afin de mesurer le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon = 1,23 \cdot 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). A partir de l'absorbance obtenue, on peut déterminer la concentration des fonctions amines sur la surface selon la relation de Beer-Lambert.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

où:

A = absorbance

$\epsilon$  = coefficient d'extinction molaire ( $\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

l = longueur de cuve utilisée (cm)

### II.4.3. Comparaison entre les différentes méthodes choisies

Les résultats, résumés dans le tableau II.5, montrent que les différentes méthodes choisies (NBZ, ITL / BCA, sulfo-LC-SPDP, sulfo-SHPP / BCA, BPB) conduisent à des concentrations d'amines à la surface différentes suivant les molécules sondes utilisés. La détermination des amines primaires par la méthode NBZ donne une valeur de la DO très élevée pour le PE non traité en comparaison de l'échantillon traité. Ces résultats peuvent s'interpréter par l'adsorption de NBZ sur la surface de PE. Ceci expliquerait également pourquoi la valeur calculée par cette méthode pour les échantillons traités, est environ 10 fois plus grande que celles obtenues avec les deux autres méthodes testées. Les deux méthodes (BCA / ITL et sulfo-LC-SPDP) donnent quant à elles des valeurs quasi-identiques dans la limite des incertitudes, entre 1,2 et 1,4 molécules / nm<sup>2</sup> (tableau II.5). Notons que toutes les valeurs sont calculées à partir de la différence entre la DO des échantillons traités et la DO de la référence (PE non traité).

Méthode	Nombre d'essais	Nombre d'amines primaires (molécules / nm <sup>2</sup> )	Nombre d'amines primaires et secondaires (molécules / nm <sup>2</sup> )
sulfo-LC-SPDP	5	1,2 ± 0,6	–
BCA / ITL	5	1,4 ± 0,3	–
BCA / sulfo-SHPP	5	–	5,2 ± 0,4

**Tableau II.5.** Nombre d'amines primaires et secondaires déterminé par les méthodes BCA et sulfo-LC-SPDP

La dispersion de nos résultats est estimée par l'écart type n, qui correspond à des incertitudes des mesures et aussi à des incertitudes liées à la reproductibilité des échantillons:

- Différentes opérations de traitement par plasma
- Différentes localisations des échantillons découpés sur un film de PE traité, pour un même traitement plasma

En ce qui concerne le nombre total des amines (primaires, secondaires et tertiaires) obtenu par la méthode BPB, la valeur mesurée varie entre 0 et 0,9 molécules / nm<sup>2</sup>. Cette valeur est, d'une part, très variable selon les expériences : les problèmes de reproductibilité rencontrés sont plus importants que pour les méthodes précédentes et certains échantillons conduisent à des valeurs nulles; d'autre part, les valeurs maximales trouvées sont généralement plus petites que celles obtenues par les méthodes ITL / BCA ou sulfo-LC-SPDP et sulfo-SHPP; ce qui est difficilement interprétable pour une méthode sensée représenter l'ensemble des amines primaires, secondaires et tertiaires. Cette apparente sous-estimation pourrait s'interpréter par l'encombrement stérique important dû à la grande taille des molécules de BPB, qui gêneraient ainsi l'accès à l'ensemble des amines présentes en surface.

### III. Vieillissement du matériau greffé par des fonctions aminées

L'objectif de notre travail étant la mise au point d'un procédé d'immobilisation par liaison covalente après réaction avec les amines primaires générées à la surface du polymère par le traitement plasma, il est important de connaître le devenir de ces fonctions au cours du temps. En particulier, il s'agit de savoir quels sont les états intermédiaires les plus stables et quels sont les plus "fragiles" dans le processus multi étapes qui nous concerne.

Pour analyser le processus appelé "vieillissement" des matériaux traités, nous avons retenu deux conditions de stockage des disques de PE: dans l'air à température ambiante ou dans un tampon phosphate à 4°C. La méthode de dosage utilisant le BCA a été choisie pour déterminer la densité surfacique des amines primaires (ITL / BCA), en particulier du fait de la bonne précision des mesures obtenues tandis que le réactif sulfo-LC-SPDP, de sensibilité équivalente, présente un coût nettement plus onéreux.

#### III.1. Etude du vieillissement de la surface de PE traité par plasma NH<sub>3</sub> par la méthode de l'angle de contact

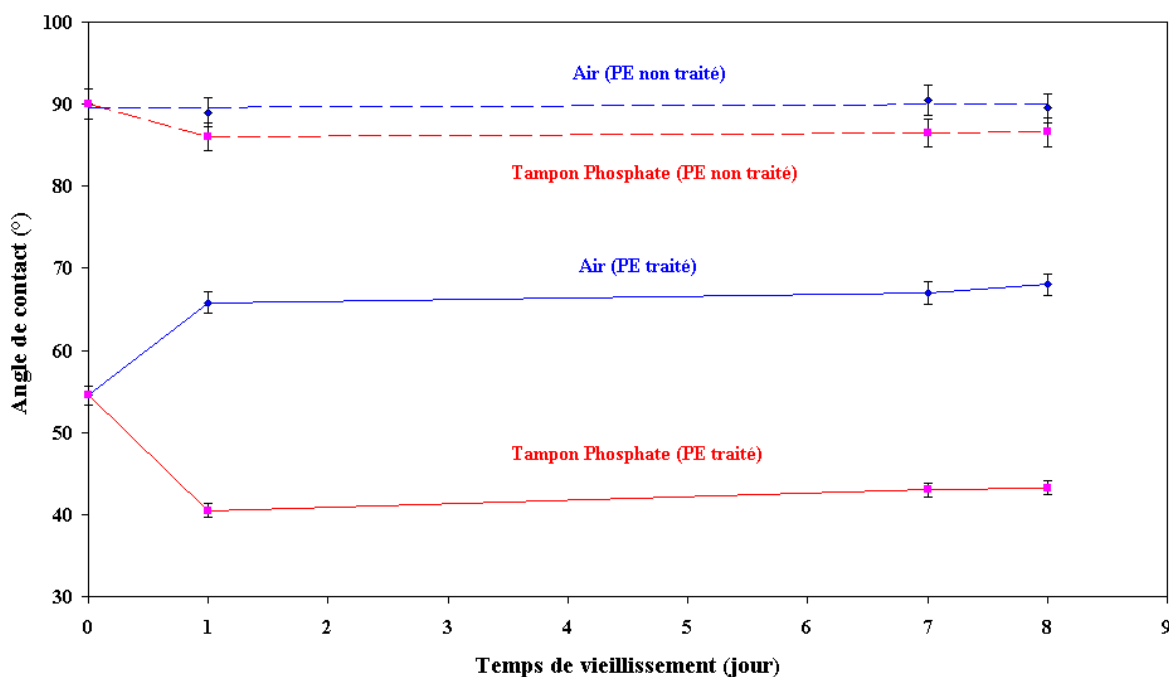
Le phénomène de vieillissement de la surface traitée par plasma provient des modifications dynamiques liées à l'évolution dans le temps des fonctions chimiques greffées. Une technique permettant de suivre cette évolution consiste à déterminer l'énergie de surface à partir de la méthode de l'angle de contact. La figure II.16 représente l'évolution avec le temps de l'angle contact sur la surface du polyéthylène traité par plasma NH<sub>3</sub> ou non traité, selon les conditions de stockage: stockage à l'air à température ambiante ou stockage dans un tampon phosphate à pH 7,6 pendant 8 jours.

Dans les deux conditions, on distingue deux parties pour les courbes relatives au PE traité:

1. La première région correspond à une évolution rapide de l'énergie de surface. Notre première mesure se situant après 1 jour de stockage, nous n'avons pas réellement accès à la cinétique de cette évolution durant les premières 24 heures. On remarque cependant que dans le cas du stockage à l'air, l'angle de contact augmente de  $54^\circ \pm 2^\circ$  à environ  $66^\circ$  pendant cette période, ce qui correspond à une diminution de l'énergie de surface du PE. En revanche, pour les disques stockés dans une solution de tampon à pH = 7,6, on constate une

augmentation de l'énergie de surface pendant le premier jour (l'angle de contact diminue de  $54^\circ \pm 2^\circ$  à  $40,5^\circ \pm 2^\circ$ ).

2. Dans les deux cas, au-delà de 1 jour, la variation de l'énergie de surface reste faible et le système semble atteindre un état stationnaire entre 1 et 8 jours.



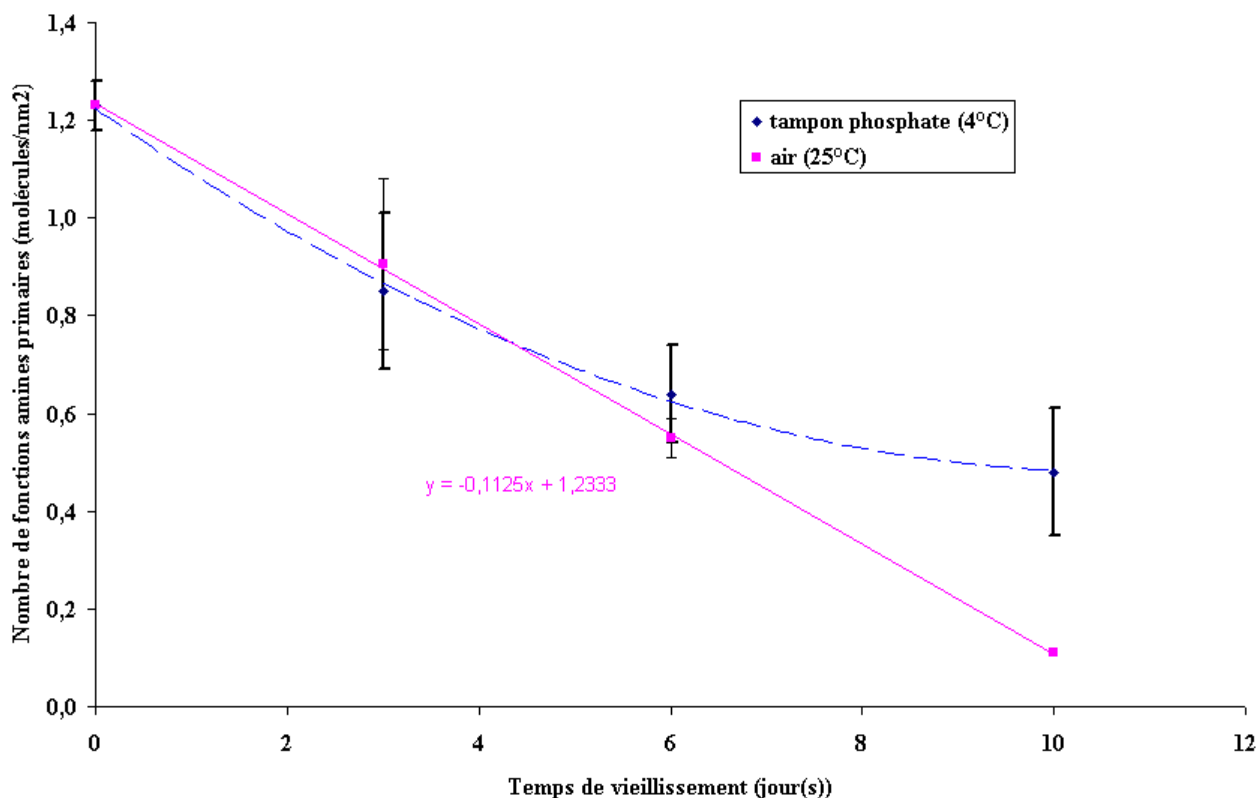
**Figure II.16.** Evolution de l'angle de contact de l'eau sur la surface de PE traité par plasma NH<sub>3</sub> en fonction du temps de vieillissement et des conditions de stockage: à l'air ou dans un tampon phosphate à pH = 7,6 (plasma NH<sub>3</sub> = 175 cm<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup>, P<sub>w</sub> = 40 W, P = 1,5 mbar, t = 2 s)

### III.2. Etude par dérivation chimique du vieillissement des fonctions amines greffées à la surface de films de PE traités par plasma NH<sub>3</sub>

La figure II.17. montre l'évolution durant dix jours de la densité des fonctions amines primaires à la surface du PE traité. Les essais ont été dupliqués, la barre d'erreur rend compte de cette variabilité.

On observe que, dans les deux conditions de stockage, la densité des amines primaires diminue au cours du temps et, compte tenu des incertitudes, on peut estimer leur demi-vie à environ 6 jours dans les deux conditions. Pour des temps de stockage plus longs, entre 6 et 10 jours, le milieu tampon phosphate 4°C semble préférable puisque la densité d'amines primaires semble se stabiliser à environ 40% de la quantité initialement mesurée. Dans l'air, la diminution observée suit un processus quasi linéaire pendant les dix jours d'observation et atteint une valeur d'environ 9% de

la quantité initiale après dix jours. On doit cependant noter que le dernier point (t=10 jours-air) n'a pas pu être doublé. Etant donné l'importance des incertitudes accompagnant ces expériences (Figure II.17), un minimum de vérifications s'imposent avant de proposer un modèle cinétique fiable.



**Figure II.17.** Evolution de la densité surfacique des amines primaires en fonction du temps de vieillissement (plasma NH<sub>3</sub> = 175 cm<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup>, P<sub>w</sub> =40 W, P = 1,5 mbar, t = 2 s)

### III.3. Interprétation des études de vieillissement de la surface traité par plasma NH<sub>3</sub>

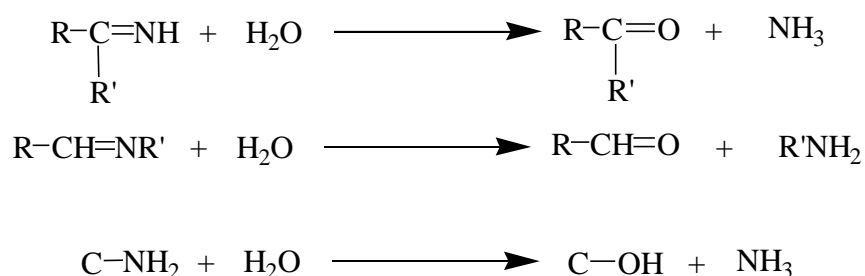
Après le traitement par plasma, la surface de polymère possède une énergie de surface élevée, ce processus étant associé à la rupture de liaisons C-C conduisant à la création de courtes chaînes oxydées en surface [32]. Par conséquent, au cours du vieillissement en présence de l'oxygène de l'air, l'énergie interfaciale de la surface tend à être minimisée par une réorientation de toutes les fonctions polaires greffées, de l'interface vers les premières couches du matériau ayant subi les réactions avec le plasma et ainsi enrichies en espèces polaires [33,34,35]. Ce processus explique la forte diminution des propriétés hydrophiles de la surface de polymère. Au delà du premier jour, nous constatons que l'angle de contact augmente beaucoup moins rapidement et reste toujours inférieur à l'angle du PE non traité. La stabilisation de l'angle de contact montre que la



réorganisation des chaînes du polymère atteint un équilibre. Morra et al. <sup>[36]</sup> ont expliqué que les liaisons hydrogènes entre les différents groupements polaires introduits sur la surface durant le traitement et les fonctions apolaires du polymère limitent l'internalisation des fonctions polaires à l'intérieur du polymère. L'équilibre entre les deux mécanismes conduit à une stabilisation de l'état superficiel du polymère au bout de quelques jours.

Un autre phénomène qui peut aussi jouer sur le vieillissement des surfaces est l'adsorption des contaminants atmosphériques par une neutralisation des fonctions aminées à caractère basique comme par exemple la contamination par le CO<sub>2</sub> <sup>[37]</sup>. L'adsorption de l'oxygène présent dans l'air semble contribuer au vieillissement par des phénomènes d'oxydation graduels de la chaîne polymère <sup>[38]</sup>.

L'effet de la remise à l'air peut conduire également, du fait de l'humidité présente, à l'hydrolyse de certaines fonctions de surface, comme les fonctions amines ou imines <sup>[38-40]</sup>:



Ces réactions conduisent à une perte d'azote en surface (R' est un fragment de faible poids moléculaire). Il est important de noter que le film de PE après un vieillissement de 8 jours conserve une hydrophilicité qui est accrue par rapport au film de PE non traité.

Le stockage des échantillons dans la solution de tampon phosphate montre une diminution de la valeur de l'angle de contact. On constate que la surface traitée devient encore plus hydrophile en comparaison avec sa valeur après la sortie du réacteur. On remarque également cette influence sur les films de PE non traité, la valeur de l'angle passant de 90° à 86° après le premier jour de stockage dans la solution de tampon. Ceci est dû à l'orientation de toutes les fonctions polaires greffées en surface vers le milieu polaire pour diminuer la tension interfaciale qui va donc empêcher leur internalisation dans le volume de polymère. Ces observations sont en accord avec les résultats présentés dans la littérature <sup>[41,42,43]</sup>.

Cependant l'évolution de la densité des amines primaires montre une chute assez rapide dès le premier jour. Ceci n'est pas en contradiction avec l'augmentation de l'énergie de surface observée dans la mesure où la valeur de l'angle de contact ne traduit pas spécifiquement la présence de

fonctions amines primaires mais correspond à la réponse globale d'une surface chimiquement complexe. Dans le cas du tampon phosphate, la diminution des amines primaires en surface ne peut pas être expliquée par leur internalisation dans le polymère. D'autres causes peuvent être évoquées:

- des réactions avec le dioxyde de carbone dissous dans le milieu: la formation de carbamates évoluant ensuite vers des carbonates ioniques a été proposée <sup>[44]</sup>
- le remplacement des amines par des fonctions amides ou hydroxyles <sup>[45]</sup>
- des réactions entre fonctions voisines portées par la surface
- un entraînement dans la phase aqueuse d'une partie de la matrice polymère (parties partiellement dégradées, oligomères) se traduisant par une perte de matière et une perte de fonctions aminées <sup>[46]</sup>

Des expériences complémentaires réalisées dans des conditions de stockage mieux définies et contrôlées (absence de CO<sub>2</sub>, atmosphère de gaz inerte sans humidité par exemple) et des analyses chimiques des surfaces et des milieux de stockage après le processus de vieillissement, seraient nécessaires pour mieux expliquer les phénomènes mis en jeu.

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons choisi le traitement par plasma d'ammoniac afin d'incorporer des fonctions polaires à la surface du polyéthylène. L'étude des surfaces traitées a montré une très nette augmentation de la mouillabilité vis à vis de l'eau, des surfaces après traitement, due à l'incorporation de fonctions azotées et oxygénées. L'analyse XPS de la surface a confirmé cette hypothèse en mettant en évidence une augmentation du pourcentage atomique d'azote et d'oxygène et une diminution du carbone. L'augmentation du pic à 286,2 eV correspondant à C-O et C-N, est bien interprétée par la formation de fonctions amines.

Pour avoir une mesure quantitative des fonctions amines greffées en surface, nous avons utilisé différentes méthodes de dérivation chimique. La quantité d'amines primaires a été mesurée par deux méthodes (sulfo-LC-SPDP et ITL / BCA) qui conduisent à une valeur semblable de l'ordre de 1,3 molécules par  $\text{nm}^2$  tandis que la densité des amines secondaires est égale à 3,9 molécules par  $\text{nm}^2$ .

Nous avons également étudié la stabilité dans le temps des fonctions chimiques greffées à la surface. Nous avons remarqué que, dans le cas d'un stockage à l'air ambiant, la mouillabilité des surfaces acquise après le traitement diminue avec le temps de vieillissement, en accord avec l'observation de la diminution rapide du nombre de fonctions amines primaires: environ 10% dès le premier jour. Pour améliorer la stabilité du dépôt, nous avons étudié l'effet du stockage dans un tampon phosphate pH 7,6 à 4°C. Contrairement à ce que l'on observe pour un stockage dans l'air ambiant, la surface traitée devient encore plus hydrophile, correspondant à une augmentation significative de son énergie de surface. Par contre, en ce qui concerne la densité des amines primaires, on constate, de façon similaire au cas de l'air, une diminution d'environ 10 % dès le premier jour de stockage. Cette diminution est cependant moins rapide au cours des 9 jours d'observation suivants et la densité des amines primaires semble se stabiliser à environ 40% de la valeur initiale en milieu tampon phosphate 4°C, tandis qu'elle semble poursuivre une décroissance linéaire dans le cas de l'air (9% de la quantité initiale à 10 jours).

En conclusion pour profiter au mieux des fonctions amines primaires introduites par le traitement plasma  $\text{NH}_3$  sur la surface et dans l'état actuel de nos connaissances sur les cinétiques de vieillissement pour différentes conditions de stockage, il y a tout intérêt à enchaîner assez rapidement les étapes post-plasma de l'immobilisation de l'enzyme, l'application qui nous intéresse.

## Références

[1] – **M. Tatoulian**

«Rôle des propriétés d'un plasma hors équilibre He et NH<sub>3</sub> dans l'amélioration de l'adhésion des films de polypropylène. Caractérisation physico-chimique des interfaces aluminium/polypropylène»  
Thèse de doctorat de l'université Paris 6, 1995, 252 pages

ou

[1] – **M. Tatoulian, F. Arefi-Khonsari, N. Shahidzadeh-Ahmadi, J. Amouroux**

«Comparison of the efficiency of N<sub>2</sub> and NH<sub>3</sub> plasma treatments to improve the adhesion of PP films to in situ deposited Al coatings. Study of ageing phenomena in terms of acid-base properties»  
International Journal of Adhesion and Adhesives, 15, 1995, p 177-84

[2] – **A. J. Martinez, S. Manolache, V. Gonzales, R. A. Young, F. Denes**

«Immobilized biomolecules on plasma functionalized Cellophan. 1. Covalently attached alpha-chymotrypsin»  
Biomaterials, 11, 4, 2000, p 415-438

[3] – **I. K. Kang, S. H. Choi, D. S. Shin, S. C. Yoon,**

«Immobilization of active  $\alpha$ -Chymotrypsin on RF-plasma-functionalized polymer surfaces»  
Journal of Applied Polymer Sciences 78, 2000, p 1783-1796

[4] – **M. J. Wang, Y. I. Chang, F. Poncin-Epaillard**

«Effects of the addition of Hydrogen in the Nitrogen cold plasma: The surface modification of polystyrene»  
Langmuir, 19, 2003, p 8325-8330

[5] – **S. Ben Rejeb, M. Tatoulian, F. Arefi Khonsari, N. Fisher-Durand, A. Martel, J. F. Lawrence, J. Amouroux, F. Le Goffic**

«Functionalization of nitrocellulose membranes using ammonia plasma for the covalent attachment of antibodies for use in membrane-based immunoassays»  
Analytica Chimica Acta, 376, 1998, p 133-138

[6] – **T. Aumann, D. Theirich, J. Engemann**

«Rapid surface modification of polyethylene in microwave and r.f.-plasma: comparative study»

Surface and Coating Technology 142-144, 2001, p 169-174

[7] – **R. Ganapathy, S. Manolache, M. Sarmadi, W. J. Simonsick, JR., F. Denes**

«Immobilization of active  $\alpha$ -Chymotrypsin on RF-plasma-functionalized polymer surfaces»

Journal of Applied Polymer Sciences 78, 2000, p 1783-1796

[8] – **F. Bretagnol, M. Tatoulian, F. Arefi-Khonsari, G. Lorang, J. Amouroux**

«Surface modification of polyethylene powder by nitrogen and ammonia low pressure plasma in a fluidized bed reactor»

Reactive & Functional Polymers, 61, 2004, p 221-232

[9] – **P. Montazer-Rahmati, F. Arefi-Khonsari, R. Borrin, A. Delacroix, J. Amouroux**

«Application of image processing system to the modification of the polymeric surface properties»

Bulletin de la Societe Chimique de France, 5, 1988, p 811-816

[10] – **E. Occhiello, M. Morra, G. Morini, F. Garbassi, P. Humphrey**

«Oxygen-plasma-treated polypropylene interfaces with air, water, and epoxy resins: part I. Air and water»

Journal of Applied Polymer Sciences 42, 1991, p 551-559

[11] – **D. A. Puleo, R. A. Kissling, M. S. Sheu**

«A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy»

Biomaterials, 23, 2002, p 2079-2087

[12] – **J. H. Moon, J. W. Shin, S. Y. Kim, J. W. Park**

«Formation of uniform aminosilane thin layers: An imine formation to measure relative surface density of the amine group»

Langmuir, 12, 1996, p 4621-4624

[13] – **E. Uchida, Y. Uyama, Y. Ikada**

«Sorption of low-molecular-weight anions into thin polycation layers grafted onto a film»

Langmuir, 9, 1993, p 1121-1124

[14] – **P. Hamerli, Th. Weigel, Th. Groth, D. Paul**

«Surface properties of and cell adhesion onto allylamine-plasma-coated polyethylenterephthalat membranes»

Biomaterials, 24, 2003, p 3989-3999

[15] – **A. Akkoyun, U. Bilitewski**

«Optimisation of glass surfaces for optical immunosensors»

Biosensors, 17, 2002, p 655-664

[16] – **S. Alvarez, S. Manolache, F. Denes**

«Synthesis of polyaniline using horseradish peroxidase immobilized on plasma-functionalized polyethylene surfaces as initiator»

Journal of Applied Polymer Sciences, 88, 2003, p 369-379

[17] – **R. Ganapathy, S. Manolache, M. Sarmadi, F. Denes**

«Immobilization of papain on cold-plasma functionalized polyethylene and glass surfaces»

Journal of Biomaterial Science Polymer Edition, 12, 2001, p 1027-1049

[18] – **M. Müller, C. Oehr**

«Plasma aminofunctionalisation of PVDF microfiltration membranes: comparison of the in plasma modifications with grafting method using ESCA and an amino-selective fluorescent probe»

Surface and Coatings Technology, 116-119, 1999, p 802-807

[19] – **A. Choukourov, J. Kousal, D. Slavínská, H. Biederman, E. R. Fuoco, S. Tepavcevic, J. Saucedo, L. Hanley**

«Growth of primary and secondary amine films from polyatomic ion deposition»

Vacuum, 75, 2004, p 195-205

[20] – **A. A. Meyer-Plath, K. Schröder, B. Finke, A. Ohl**

«Current trends in biomaterial surface functionalization-nitrogen-containing plasma assisted processes with enhanced selectivity»

Vacuum, 71, 2003, p 391-406

[21] – **R. N. S. Sodhi, V. P. Sahi, M. W. Mittelman**

«Application of electron spectroscopy and surface modification techniques in the development of anti-microbial coatings for medical devices»

Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 121, 2001, p 249-264

[22] – **C. Gessner, V. Bartels, T. Betker, U. Matucha, C. Penache, C. P. Klages**

«Surface modification for biomedical purposes utilizing dielectric barrier discharges at atmospheric pressure»

Thin Solid Films, 459, 2004, p 118-121

[23] – **J. R. Wayment, J. M. Harris**

«Controlling binding site densities on glass surfaces»

Analytical Chemistry, 78, 2006, p 7841-7849

[24] – **Y. Xing, E. Borguet**

«Specificity and sensitivity of fluorescence labelling of surface species»

Langmuir, 23, 2007, p 684-688

[25] – **T. K. Markkula, J. A. Hunt, F. R. Pu, R. L. Williams**

«Surface chemical derivatization of plasma-treated PET and PTFE»

Surface and Interface analysis 34, 2002, p 583-587

[26] – **P. Chevallier, M. Castonguay, S. Turgeon, N. Dubrulle, D. Mantovani, P. H. Mc Breen, J. C. Wittmann, G. Laroche**

«Ammonia RF-plasma on PTFE surfaces: Chemical characterization of the species created on the surface by vapour-phase chemical derivatization»

Journal of Physical Chemistry B, 105, 2001, p 12490-12497

[27] – **T. Nakagawa, T. Tanaka, D. Niwa, T. Osaka, H. Takeyama, T. Matsunaga**

«Fabrication of amino silane-coated microchip for DNA extraction from whole blood»

Journal of Biotechnology, 116, 2005, p 105-111

[28] – **S. E. Kakabakos, P. E. Tyllianakis, G. P. Evangelatos, D. S. Ithakissios**

«Colorimetric determination of reactive solid-supported primary and secondary amino groups»

Biomaterials, 15, 4, 1994, p 289-297

[29] – **C. O. Kim, S. J. Cho, J. W. Park**

«Hyperbranching polymerization of aziridine on silica solid substrates leading to a surface of highly dense reactive amine groups»

Journal of Colloid and Interface Science, 260, 2003, p 374-378

[30] – **J. Kim, H. K. Shon, D. Jung, D. W. Moon, S. Y. Han, T. G. Lee**

«Quantitative chemical derivatization technique in time-of-flight secondary ion mass spectrometry for surface amine groups on plasma-polymerized ethylenediamine film»

Analytical Chemistry, 77, 13, 2005, p 4137-4141

[31] – **M. Tatoulian, F. Brétagne, F. Arefi-Khonsari, J. Amouroux, O. Bouloussa, F. Rondelez, A. J. Paul, R. Mitchell**

«Plasma deposition of allylamine on polymer powders in a fluidized bed reactor»

Plasma Processes and Polymers, 2, 1, 2005, p 38-88

[32] – **K. S. Siow, L. Britcher, S. Kumar, H. J. Griesser**

«Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization-A Review»

Plasma Processes and polymers, 3, 2006, p 392-418

[33] – **H. Yasuda, A. K. Sharma, T. Yasuda**

«Effect of orientation and mobility of polymer molecules at surfaces on contact angle and its hysteresis»

Journal of Polymer Science, Polymer Physics Edition, 19, 9, 1981, p 1285-1291

[34] – **R. C. Chatelier, X. Xie, T. R. Gengenbach, H. J. Griesser**

«Quantitative analysis of polymer surface restructuring»

Langmuir, 11, 7, 1995, p 2576-2584

[35] – **R. C. Chatelier, X. Xie, T. R. Gengenbach, H. J. Griesser**

«Effects of plasma modification conditions on surface restructuring»

Langmuir, 11, 7, 1995, p 1285-2591

[36] – **M. Morra, E. Ochiello, F. Garbassi**



«Dynamics of plasma treated polymer surfaces: mechanisms and effects»

Polymer-solid Interfaces, Proceedings of the First International Conference, Namur, Belgium, 2-6 September, 1991, p 407-428

[37] – **N. Shahidzadeh**

«Corrélation entre les propriétés acido-basiques des films de polypropylène traités par plasma hors équilibre et les mécanismes d'adhésion»

Thèse de l'Université Pierre et Marie Curie, 1996, 242 pages

ou

[37] – **N. Shahidzadeh-Ahmadi F. Arefi-Khonsari, J. Amouroux**

«Characterization of the acid-base properties of NH<sub>3</sub> or O<sub>2</sub> plasma-treated polypropylene films and the effects of aging

Journal of Materials Chemistry, 5, 1995, p 229-236

[38] – **S. O'kell, T. Henshaw, G. Farrow, M. Aindow, C. Jones**

«Effects of low-power plasma treatment on polyethylene surfaces»

Surface and Interface Analysis, 23, 5, 1995, p 319-327

[39] – **J. Li, K. Oh, H. Yu**

«Surface rearrangements of oxygen plasma treated polystyrene: Surface dynamics and humidity effect»

Chinese Journal of Polymer Science, 23, 2, 2005, p 187-196

[40] – **R. Förch, Z. Zhang, W. Knoll**

«Soft plasma treated surfaces: Tailoring of structure and properties for biomaterial applications»

Plasma Processes and polymers, 2, 2005, p 351-372

[41] – **D. J. Wilson, R. L. Williams, R. C. Pond**

«Plasma modification of PTFE surfaces. Part II: Plasma-treated surfaces following storage in air or PBS»

Surface and interface analysis, 31, 2001, p 397-408

[42] – **Z. Zhang, Q. Chen, W. Knoll, R. Förch**

«Effect of aqueous solution on functional plasma polymerized films»

Surface and coatings technology, 174-175, 2003, p 588-590

[43] – **D. J. Wilson, R. L. Williams, R. C. Pond**

«Plasma modification of PTFE surfaces. Part I: Surfaces immediately following plasma treatment»

Surface and interface analysis, 31, 2001, p 385-396

[44] – **D. E. Penny, T. J. Ritter**

«Kinetic study of the reaction between carbon dioxide and primary amines»

Journal of the chemical society, Faraday Transactions 1, 79, 1983, p 2103-2109

[45] – **N. Inagaki, K. Narushim, N. Tuchia, K. Miyazaki**

«Surface characterization of plasma-modified poly(ethyleneterephthalate) film surfaces»

Journal of Polymer Science Part B, 42, 2004, p 3727-3740

[46] – **J. E. Klemberg-Sapieha, O. M. Küttel, L. Martinu, M. R. Wertheimer**

«Dual-frequency N<sub>2</sub> and NH<sub>3</sub> plasma modification of polyethylene and polyimide»

American Vacuum Society A, 9, 1991, p 2975-2981

## **Chapitre III**

**Etude de l'immobilisation d'une  
enzyme sur la surface de  
polyéthylène activé par plasma**

## **Introduction**

### **I. Validation de la fixation du bras espaceur**

I.1. Choix du bras espaceur

I.2. Protocole de fixation du bras espaceur

I.3. Caractérisation physico-chimique de la surface greffée par le glutaraldéhyde

I.3.1. Topographie par MEB de la surface du PE traité et activé par le glutaraldéhyde (GA)

I.3.2. Caractérisation par XPS de la surface fonctionnalisée par le glutaraldéhyde (GA)

I.3.3. Etude par XPS de la quantité de GA fixée en surface en fonction de la concentration de la solution réactionnelle

I.3.4. Dérivation chimique des fonctions aldéhyde greffées à la surface du PE après la fixation de GA

I.3.4.1. Dosage des fonctions aldéhyde de la surface par la méthode tyramine / BCA

I.3.4.2. Dosage des fonctions aldéhyde de la surface par la méthode phénol-acide sulfurique (PAS)

I.3.4.3. Résultats, comparaison entre les deux méthodes de dosage et discussion

I.4. Etude de l'évolution de la concentration de GA en surface en fonction du temps de vieillissement

### **II. Validation de l'immobilisation d'une enzyme – exemple de la trypsine**

II.1. Choix de la trypsine

II.2. Protocole d'immobilisation de la trypsine

II.3. Etude de l'immobilisation de la trypsine

II.3.1. Modification topographique de la trypsine immobilisée

II.3.2. Caractérisation physico-chimique par XPS de la surface après l'immobilisation

II.3.3. Etude par XPS de la quantité de trypsine immobilisée en surface en fonction de la concentration de cette enzyme dans la solution d'incubation

II.3.4. Dosage de la trypsine immobilisée sur la surface par la méthode au BCA

## **Conclusion**

## **Références**

## Introduction

L'immobilisation de protéines et en particulier d'enzymes est à l'origine d'un grand nombre d'applications dans les domaines biomédical, environnemental et industriel.

Nous avons montré précédemment que le plasma d'ammoniac permet d'incorporer des fonctions amines à la surface du polyéthylène. Ces fonctions sont ensuite utilisées afin de lier un composé bi-fonctionnel, servant de bras espaceur, au support. Enfin, la dernière étape consiste en l'immobilisation covalente d'une enzyme via la réaction de l'extrémité libre du bras avec certains groupements fonctionnels portés par l'enzyme.

Le présent chapitre a pour but d'étudier ces deux étapes et comportera deux parties:

Dans un premier temps, l'étude proposée consistera à développer un protocole d'activation des fonctions amines primaires incorporées par le traitement plasma, en utilisant le glutaraldéhyde (GA), qui jouera le rôle de bras espaceur. Afin de connaître la concentration des fonctions aldéhyde de la surface après cette activation, nous présenterons deux méthodes de dérivations chimiques permettant leur dosage. Puis, nous étudierons l'évolution de leur concentration en fonction du temps de vieillissement. Dans une deuxième partie, nous présenterons le protocole utilisé pour lier l'enzyme au bras espaceur. Nous déterminerons ensuite la concentration de protéine immobilisée sur la surface.

La surface sera caractérisée aux différents stades de traitement par microscopie électronique à balayage (MEB), microscopie à force atomique (AFM) et spectroscopie de photoélectrons X (XPS).

Ceci devrait permettre de mieux comprendre les modifications de surface accompagnant les deux étapes réactionnelles de liaison du bras espaceur au support puis de l'enzyme au bras espaceur.

## **I. Validation de la fixation du bras espaceur**

### **I. 1. Choix du bras espaceur**

Selon une modalité de mise en œuvre du procédé d'immobilisation par liaison covalente, lorsque les supports comprennent des groupes réactifs constitués de groupes amines, ceux-ci sont activés par un activateur bi-fonctionnel approprié réagissant avec les amines primaires comme par exemple le glutaraldéhyde ( $\text{CHO}-(\text{CH}_2)_3\text{-CHO}$ ), le bromure de cyanogène, un carbodiimide comme par exemple le 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide.

Ces composés permettent de fixer l'enzyme tout en la maintenant à une certaine distance du support. Le choix du bras espaceur, en particulier en fonction de sa taille, est très important pour réaliser une immobilisation qui conserve l'activité de l'enzyme <sup>[1]</sup>. La mobilité et la stabilité assurées par un bras de longueur suffisant favorisent le maintien d'une forte activité au cours d'utilisations successives. Parmi ces agents, le glutaraldéhyde est souvent utilisé pour l'immobilisation et la stabilisation des protéines <sup>[2,3]</sup>. La condensation d'une fonction aldéhyde et d'une fonction amine primaire conduit à une base de schiff (liaison imine) <sup>[4]</sup>. La formation de cette liaison imine (Figure III.1.) est facile à réaliser dans un large domaine de pH, de force ionique et de température <sup>[5]</sup>. Elle présente cependant l'inconvénient de ne pas être très stable; en particulier elle s'hydrolyse en milieu acide en redonnant l'amine primaire et l'aldéhyde de départ. On remédie généralement à ce défaut en réduisant l'imine en une amine secondaire beaucoup plus stable.

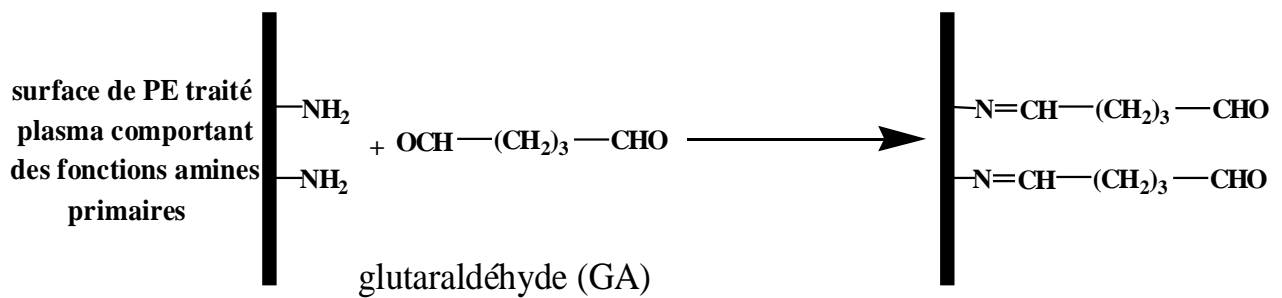
### **I. 2. Protocole de fixation du glutaraldéhyde**

La concentration de la solution de GA utilisée pour la fixation a été choisie à 5 % et le temps d'incubation des échantillons (disques de PE de diamètre 2,4 cm) à 3 heures. En effet il a été montré <sup>[6]</sup> que la quantité d'enzyme immobilisée sur une surface de nylon 66 en utilisant le glutaraldéhyde comme agent d'activation des amines est maximale pour une concentration de glutaraldéhyde supérieure à 2,5 %.

De plus selon Ruckenstein et son équipe <sup>[7]</sup>, l'activité enzymatique immobilisée dépend du temps de la réaction du glutaraldéhyde (GA) avec le support aminé. Ils ont observé une augmentation de l'activité enzymatique avec la durée de la réaction GA + support (jusqu'à 3 h). Au delà de 3 h, l'activité enzymatique reste plus au moins stable. Nous avons donc choisi, par la suite, d'immerger les échantillons dans la solution de GA à 5 % pendant 3 heures.

Ainsi, nous avons utilisé le protocole suivant pour la fixation du glutaraldéhyde sur le support:

- Préparation d'une solution de GA à 5 % à partir d'une solution aqueuse 25 % m/m: 1 ml GA 25 % + 4 ml éthanol absolu <sup>[8]</sup>
- Immersion des échantillons dans 4 ml de cette solution pendant 3 heures à la température ambiante, en agitant à l'aide d'un incubateur va et vient
- Rinçage à l'éthanol (2 fois) et à l'eau (1 fois)



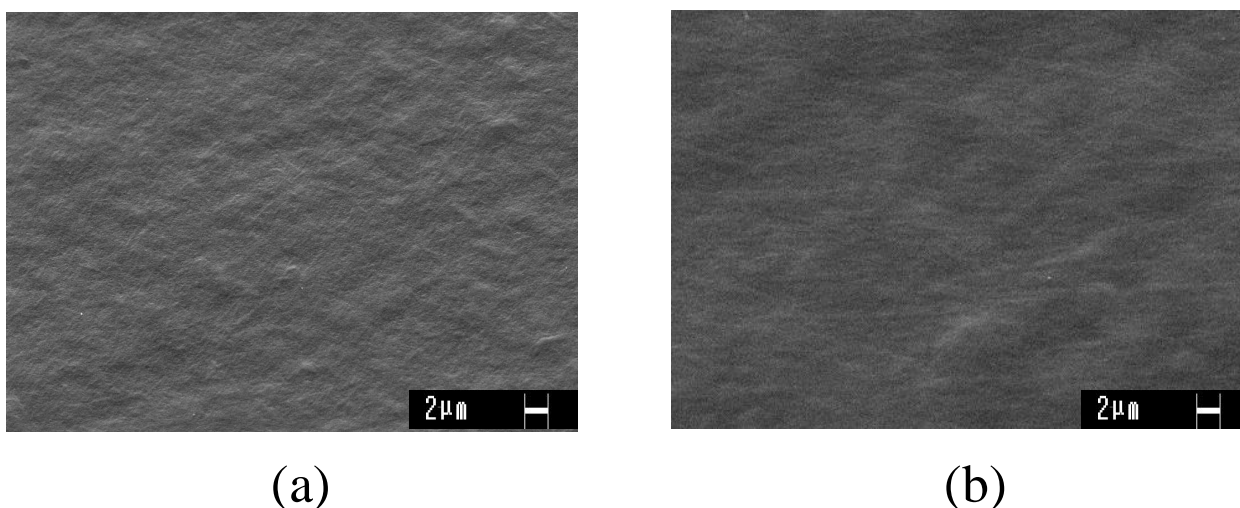
**Figure III.1.** Activation des amines primaires par le glutaraldéhyde (GA)

### I.3. Caractérisation physico-chimique de la surface greffée par le glutaraldéhyde

Le but poursuivi par les analyses XPS et MEB afin de qualifier les modifications physico-chimiques produites après la fixation du glutaraldéhyde. Par la suite, cette étude sera complétée par la détermination quantitative de la densité de surface des fonctions aldéhyde, à l'aide de deux méthodes de dérivation chimiques qui seront comparées.

#### I.3.1. Topographie par MEB de la surface du PE traité et activé par le glutaraldéhyde (GA)

L'observation de la surface activée par GA ne permet pas de repérer une différence entre la surface traitée par plasma et la surface activée par le glutaraldéhyde. Ces résultats qualitatifs nécessitent d'autres techniques de caractérisation de la surface.



**Figure III.2.** Micrographies MEB de la surface traitée plasma (a) et traitée plasma et activée par le glutaraldéhyde (b)

#### I.3.2. Caractérisation par XPS de la surface fonctionnalisée par le glutaraldéhyde (GA)

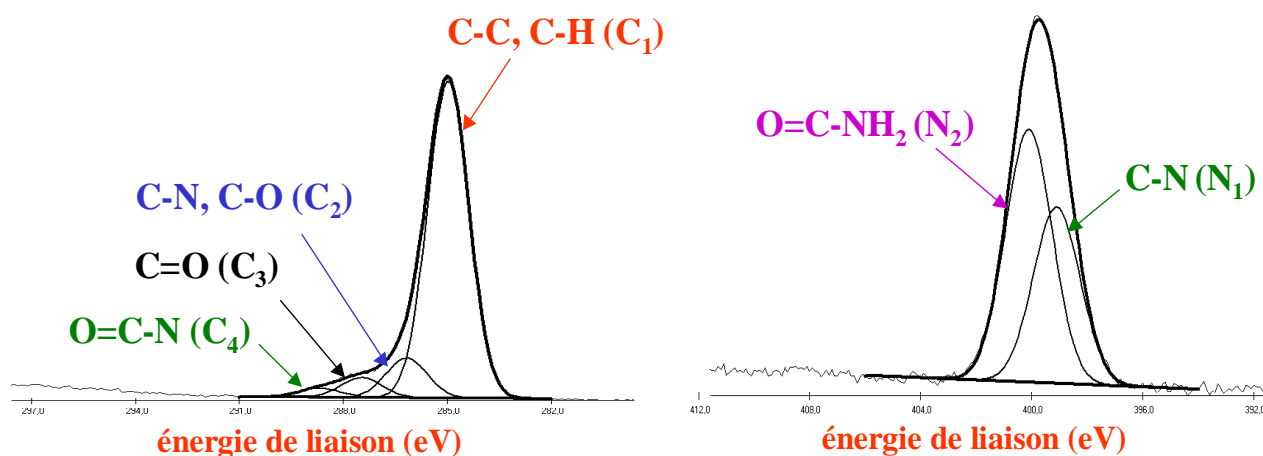
L'analyse XPS permet de qualifier l'efficacité de l'étape de fixation du glutaraldéhyde en terme de fonctions incorporées à la surface. Le rapport atomique N / C passe de 0,11 pour le PE traité par plasma à 0,058 après la fixation de GA, ce qui pourrait être interprété comme un masquage partiel des fonctions aminées de la surface. Parallèlement, le rapport atomique O / C



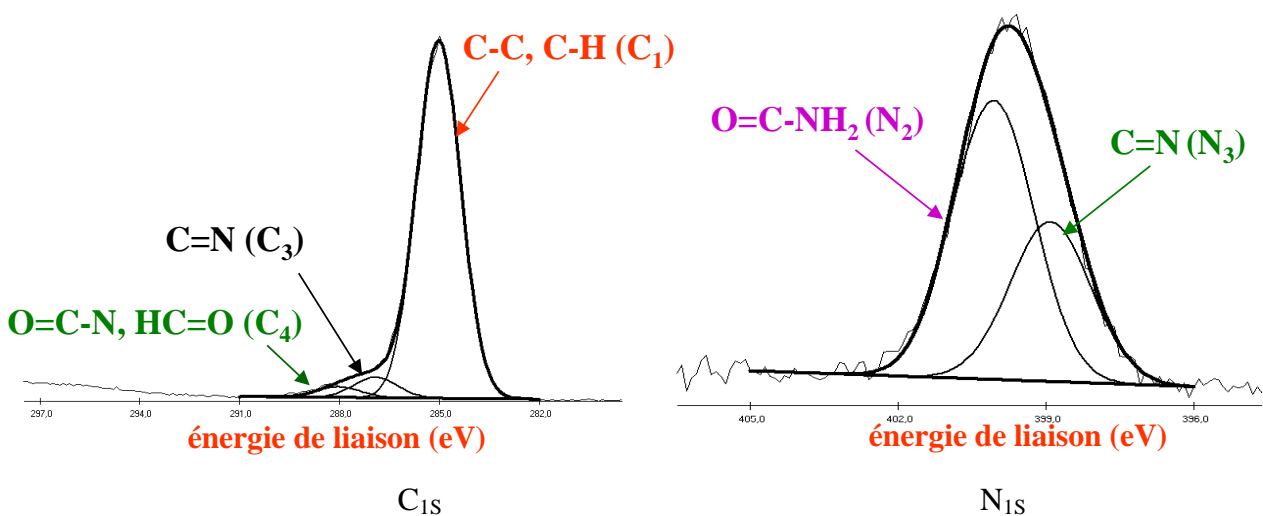
prend une valeur égale au rapport N / C, pour le disque fonctionnalisé par le GA. Cette égalité entre les deux rapports est en accord avec l'égalité des proportions N / C et O / C théorique dans le GA fixé (-N=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CHO) même si on n'atteint pas la valeur théorique de N / C = 0,2.

La déconvolution du spectre C<sub>1s</sub> voit la disparition du pic C<sub>2</sub>: C-O, C-N (286,2 eV) observé après le traitement par plasma. Le pic C<sub>3</sub> peut être attribué aux fonctions imine (C=N) à 287,0 eV [8], liant le GA au PE et le pic C<sub>4</sub> à 288,0 eV correspond aux fonctions aldéhydes (HC=O) libres portées par le GA, comme illustré à la figure III.3. Cette attribution des pics C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub> s'appuie sur le fait que les fonctions aldéhydes sont caractérisées par une énergie supérieure à celle des fonctions imines. L'évolution des pourcentages des différentes fonctions présentes dans le spectre C<sub>1s</sub> est regroupée dans le tableau III.1. Notons que la largeur à mi-hauteur (FWMH) est fixée à 1,50 eV.

(A)



(B)



**Figure III.3.** Déconvolution des pics C<sub>1s</sub> et N<sub>1s</sub> du PE (A) traité par plasma NH<sub>3</sub> et (B) traité par plasma et activé par le glutaraldéhyde (GA)

Après l'activation de la surface traitée par GA, on constate que le pourcentage de la composante  $C_1$  qui peut être due à la contribution de la chaîne  $-(CH_2)_3-$  de GA, augmente. Par ailleurs, l'apparition des pics imines  $C=N$  ( $C_3$ ) et aldéhyde  $HC=O$  ( $C_4$ ) est en accord avec la disparition du pic  $C_2$  amines totales (réaction entre le GA et les amines primaires).

Nom	O / C	N / C	$C_1$ (%)	$C_2$ (%)	$C_3$ (%)	$C_4$ (%)
PE traité	0,061	0,11	82,4±2	10,2±2	5,1±2 C=O	2,3±2
PE traité+GA	0,058	0,058	92±2	0±2	5±2 C=N	3±2

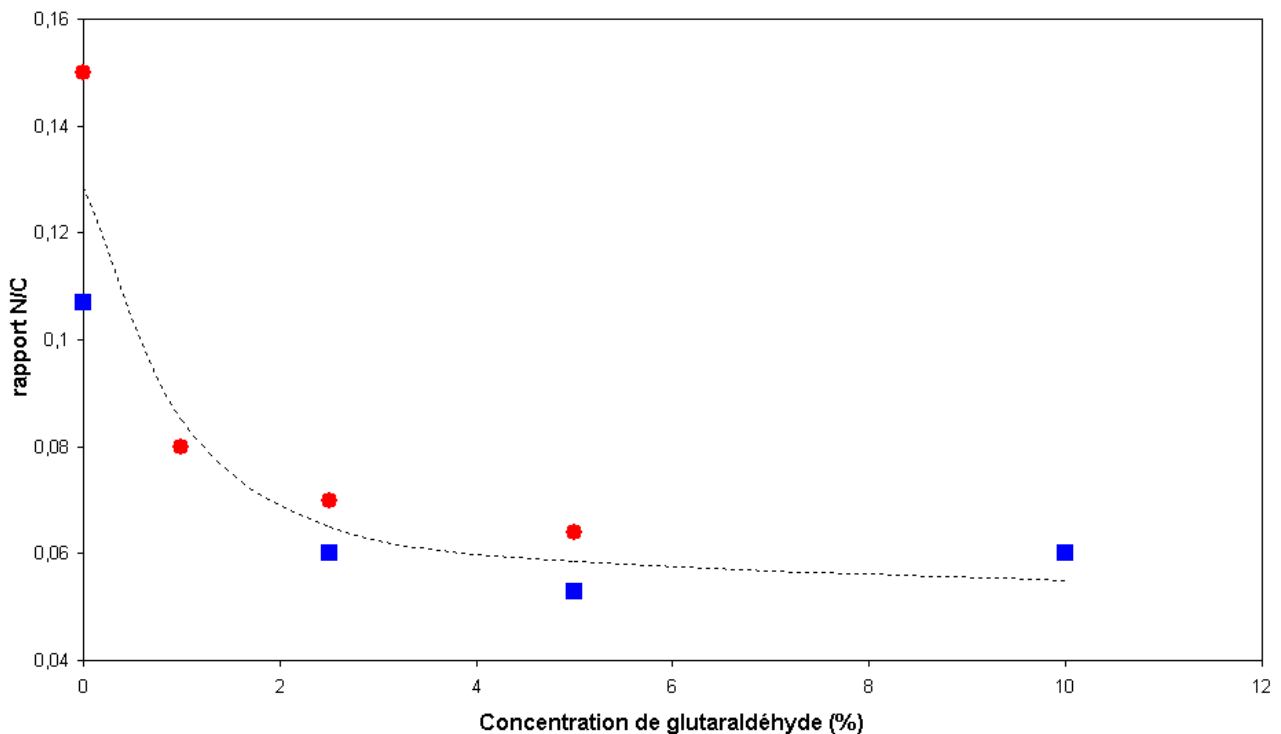
**Tableau III.1.** Evolution des pourcentages des différentes contributions du spectre  $C_{1s}$

Concernant le pic  $N_{1s}$  après la fixation de GA, on constate que le pourcentage de fonctions imine ( $N_3$ : 37,5 %) est proche de celui des fonctions amines observé après traitement plasma ( $N_1$ : 41 %), ce qui est en accord avec la transformation des amines primaires en imines après réaction avec GA. On observe parallèlement la disparition du pic  $N_1$  des amines.

L'interprétation de l'évolution du pic des amides ( $N_2$ ) est plus difficile dans la mesure où leur pourcentage passe de 59 % après plasma à 62,5 % après fixation de GA, alors qu'on pouvait s'attendre à un masquage des amides de la surface. On doit cependant noter que la sensibilité de la réponse attribuée à la déconvolution du pic  $N_{1s}$  est faible ( $\pm 4$  %).

### I.3.3. Etude par XPS de la quantité de GA fixée en surface en fonction de la concentration de la solution réactionnelle

Dans ce qui suit, nous avons fait varier la concentration des solutions de GA en vue de définir la concentration optimale de la solution de GA pour sa fixation. Les résultats XPS montrent que le rapport N / C après le traitement par plasma (point zéro) se situe entre 0,12 et 0,15. Après la fixation de GA pour différentes concentrations de la solution d'incubation (1 %, 2,5 %, 5 % et 10 %), le rapport N / C diminue progressivement jusqu'à l'apparition d'un palier pour les concentrations supérieures de 2,5 %. Cette concentration optimale est en bon accord avec celles observée par Isgrove et son équipe sur la surface de nylon 66 <sup>[6]</sup>. On conforte ainsi, a posteriori, le choix de la concentration de la solution d'incubation à 5 % de GA.



**Figure III.4.** Rapport N/C de la quantité de GA fixée à la surface en fonction de différentes concentrations de GA en solution (l'analyse XPS est effectuée deux fois (différentes couleurs) sur les films de PE traités par plasma)

### I.3.4. Dérivation chimique des fonctions aldéhydes greffées à la surface du PE après la fixation de GA

Comme on l'a dit dans les paragraphes précédents, le glutaraldéhyde a pour vocation de fixer de manière solide, via des liaisons covalentes, l'enzyme au support de PE, tout en la maintenant un peu écartée du support, afin de favoriser l'accessibilité des substrats à son site actif. A ce stade du processus d'immobilisation, il est donc important de vérifier que le greffage du GA sur la surface aminée a été correctement réalisé, c'est à dire que l'on dispose maintenant de fonctions aldéhydes réactives à la surface du PE. La quantification précise de la concentration surfacique des fonctions aldéhyde permettra:

- de qualifier et éventuellement d'optimiser la méthode d'activation des fonctions amines par le GA,
- d'avoir un éclairage sur les mécanismes réactionnels mis en oeuvre; en particulier à propos du "risque" existant de voir réagir une même molécule de GA par ses deux fonctions, avec les amines de surface; on obtiendrait dans ce dernier cas des molécules de GA "pontées" inefficaces pour lier ultérieurement l'enzyme de façon covalente,
- de corrélérer et optimiser la concentration surfacique de GA en terme d'efficacité d'immobilisation de biomolécule et d'activité enzymatique.

Parmi les techniques présentées dans la littérature pour le dosage d'aldéhydes, il existe très peu de méthodes de quantification des groupements aldéhydes à la surface des matériaux et la plupart des tests ont été développés afin de déterminer la fonction aldéhyde en solution <sup>[9,10,11,12]</sup>. Des exemples de détection des fonctions aldéhydes en surface sont donnés dans le tableau III.2: il s'agit de méthodes de détermination directe par fluorescence, sur la surface, ou bien de méthodes colorimétriques effectuées après libération de sondes moléculaires en solution (spectrophotométrie UV-visible).

Fluorescence	UV-visible
dansyl hydrazine <sup>[13]</sup>	<i>p</i> -anisaldehyde <sup>[14]</sup>
4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionic acid, hydrazide (D2371) <sup>[15]</sup>	4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (Purpald) <sup>[16]</sup>
–	2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH) <sup>[17]</sup>
–	tyramine ou cystéine / BCA <sup>[18]</sup>

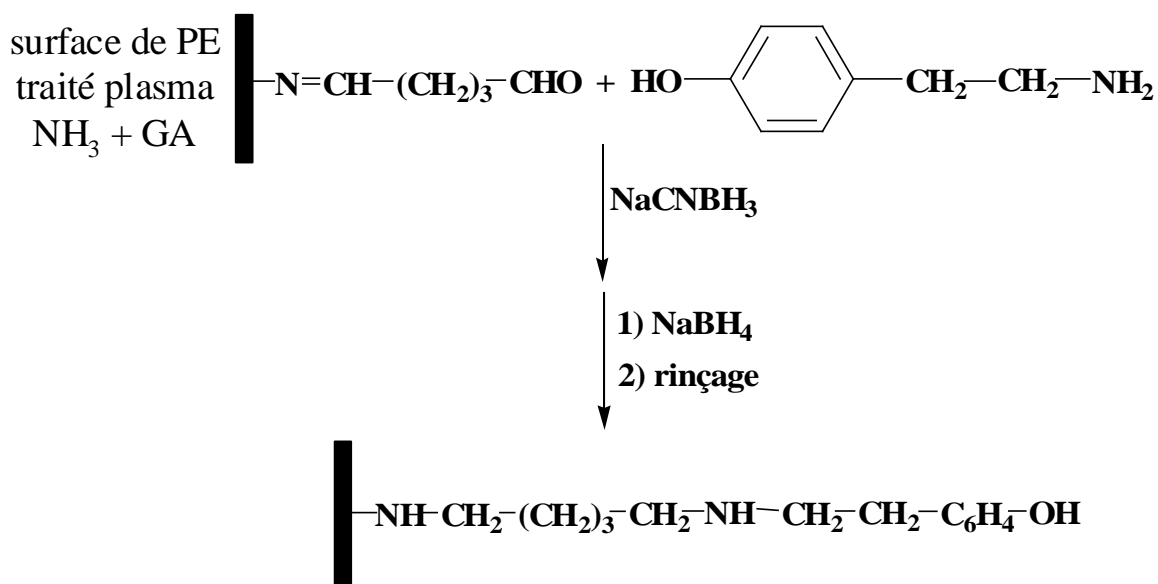
**Tableau III.2.** Différents exemples de sondes chimiques pour la détection des fonctions aldéhyde sur la surface

Une difficulté dans le choix d'une méthode adaptée à notre cahier des charges provient - comme dans le cas précédent du dosage des amines - de la nécessité d'éviter les sondes engageant des interactions non spécifiques avec les échantillons, en particulier par physi-sorption avec la face non traitée du PE.

Nous rapporterons dans le paragraphe suivant les résultats obtenus à l'aide de deux méthodes de dérivation chimique, suivie d'une détermination spectrophotométrique: tyramine / BCA et phénol-acide sulfurique (PAS).

### I.3.4.1. Dosage des fonctions aldéhyde de la surface par la méthode tyramine / BCA

Afin de titrer les fonctions aldéhydes, nous avons utilisé la méthode développée par S. E. Kakabakos faisant intervenir la molécule de tyramine ( $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{OH}$ ) en présence de la solution de BCA <sup>[18]</sup>. Le principe de ce dosage repose sur la réaction de la tyramine en présence de  $\text{NaCNBH}_3$  avec les fonctions aldéhydes. Cette réaction conduit à une formation d'imines, réduites immédiatement en amines secondaires par  $\text{NaCNBH}_3$ , avec une extrémité réductrice (hydroxyphenyl) à la surface (Figure III.5).



**Figure III.5.** Principe de la réaction entre les fonctions aldéhydes et la tyramine

Après cette réaction, on fait réagir les réactifs de la méthode au BCA avec les fonctions réductrices de la surface. Le principe de cette étape a déjà été expliqué dans le chapitre II. Le protocole expérimental de cette méthode est mentionné ci-dessous:

- Préparation de la solution de tyramine à 200 mM dans un tampon phosphate de sodium à 0,1 M (pH=6,5)
- Préparation de la solution de NaCNBH<sub>3</sub> dans l'eau (1 M)
- Ajout de 1 ml de la solution de tyramine et 50 µl de la solution de NaCNBH<sub>3</sub> dans les réacteurs à base clous vissés contenant les disques de PE
- Agitation pendant la nuit à la température ambiante
- Ajout de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jusqu'à obtenir un pH=10
- Ajout de 20 mg de NaBH<sub>4</sub>
- Agitation pendant 2 heures
- Lavage des disques avec le tampon phosphate 0,1 M (3 fois) puis avec le tampon carbonate 0,25 M (pH~11) (3 fois)

Comme il a été dit précédemment, le réactif NaCNBH<sub>3</sub> permet de réduire les liaisons imine peu stables en amines secondaires. Quant à NaBH<sub>4</sub> il est ajouté afin de réduire les éventuelles fonctions aldéhydes n'ayant pas réagi (CHO) en fonctions alcools (CH<sub>2</sub>OH) afin d'éviter des réactions parasites avec l'étape suivante (BCA) <sup>[18]</sup>.

Par le même protocole que celui déjà décrit précédemment pour le dosage ITL/BCA ou sulfo-SHPP/BCA, nous avons déterminé la concentration de fonctions aldéhyde en faisant la différence entre le signal (absorbance) des échantillons étudiés et celui de la référence (PE non traité par plasma mais ayant subi l'étape d'incubation avec le GA). Cette référence se veut un modèle de la face non traitée plasma de nos échantillons. Des contrôles ont également été réalisés en effectuant l'ensemble du protocole de dosage sur des échantillons traités plasma mais n'ayant pas subi l'étape de fixation du GA; ou encore en utilisant des échantillons traités plasma, incubés avec GA, mais en omettant l'étape de réaction avec la tyramine: ces contrôles ont pour but de déceler d'éventuels signaux provenant d'espèces chimiques superficielles qui n'auraient pas complètement réagi lors des étapes d'incubation successives et qui seraient une source d'artefacts.

Une gamme d'étalonnage consistant en des solutions standards de tyramine (0-0,025 mM) a été préparée dans un tampon de carbonate de sodium à 0,25 M. Les fonctions aldéhydes sont ainsi quantifiées en supposant le pouvoir réducteur de la fonction hydroxyphényl de surface équivalente à la tyramine en solution.

D'autres molécules sondes réductrices comme la cystéine (HSCH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH) ou la tyrosine HOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH ont été testées afin de quantifier la fonction aldéhyde. Dans le cas de la cystéine, nous n'avons pas obtenu le complexe coloré (bleu-violet intense)

caractéristique de la méthode au BCA, alors qu'elle réagit en solution. Ceci peut être dû, soit au fait qu'elle ne réagit pas avec les aldéhydes de surface et ainsi ne se fixe pas; soit au fait que, une fois fixée sur la surface, elle ne soit pas capable de réduire les ions  $\text{Cu}^{++}$ , première étape de la méthode. Quant à la tyrosine, nous n'avons pas pu l'utiliser en raison de ses fortes interactions non spécifiques avec les échantillons référence. Les premiers résultats montrent que, soit ces sondes sont incapables de produire le complexe coloré (bleu-violet intense) de BCA, soit elles donnent une adsorption assez importante pour les références. Par la suite, seule la tyramine a été sélectionnée pour cette méthode de dosage.

#### **I.3.4.2. Dosage des fonctions aldéhydes de la surface par la méthode phénol-acide sulfurique (PAS)**

Cette méthode a été mise au point par J. Boratyński et son équipe <sup>[19]</sup> afin de déterminer la quantité de GA en solution. Ce dosage est basé sur la réaction de GA avec le phénol en présence d'acide sulfurique, qui conduit à la formation d'un composé coloré jaune-brun (Figure III.6.). En 1991, une autre équipe <sup>[20]</sup> a appliqué cette méthode sur des sphères de nylon 66 activé par le GA. L'utilisation d'acide sulfurique permet la libération du GA par hydrolyse, ce dernier étant ensuite dosé par le phénol, en solution.

Nous avons mis en œuvre cette méthode en utilisant l'acide sulfurique (mélange réactionnel 2,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) pour hydrolyser les fonctions imine liant GA à la surface de PE traité. La seconde étape repose sur la réaction du GA relargué par l'hydrolyse avec le phénol (solution 0,078 M) en présence d'acide sulfurique concentré (mélange réactionnel 12 M). Le Tétrakisphénol <sup>[21,22]</sup> formé est ensuite déterminé par spectrophotométrie UV-visible.

Une adaptation du protocole décrit dans la littérature à notre sujet a dû être réalisée au préalable. Nous avons ainsi essayé d'optimiser à la fois les concentrations de réactifs ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) et les temps de réaction pour définir un protocole de dosage précis et reproductible.

##### **a) Etape de réaction avec le phénol**

On a réalisé cette étape en conduisant le dosage sur des solutions standard de GA [0 M -  $3.10^{-5}$  M] afin de construire une droite d'étalonnage. Le titre du mélange réactionnel en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ayant été fixé à 12M seul le temps de réaction est étudié. On s'aperçoit qu'une droite d'étalonnage de pente relativement stable  $1,4.10^4$  est trouvée de façon reproductible pour des temps compris entre 11 et 22 minutes.

Pour des temps plus courts ou plus longs (essais menés pour 7 et 36 minutes) les pentes obtenues ont tendance à devenir inférieures, correspondant à une perte de sensibilité du dosage. Nous n'avons pas d'explication pour la diminution de la pente pour les temps plus longs ( $t > 36$ ) mais, par la suite, nous avons fixé le temps de réaction à 16 minutes.

#### b) Etape d'hydrolyse

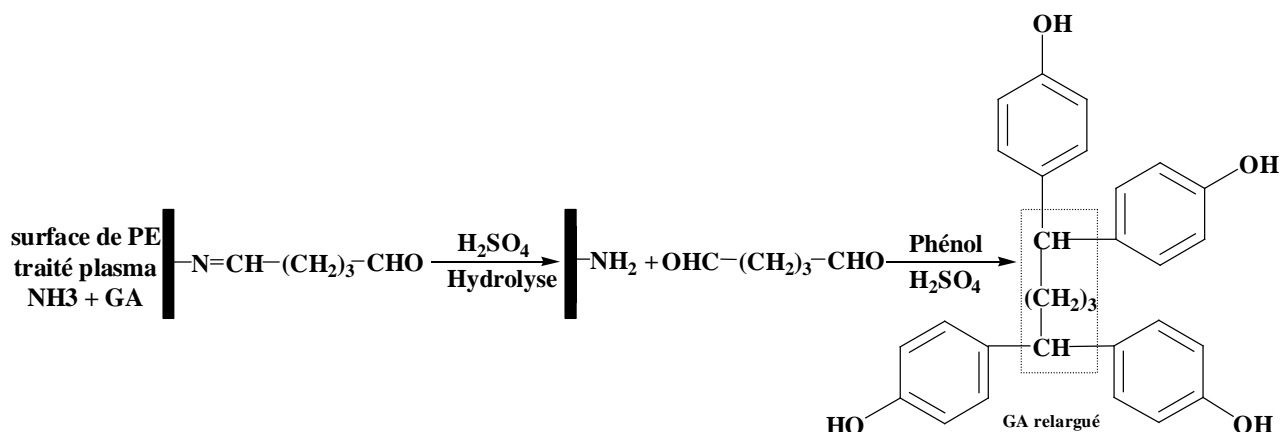
On a utilisé les conditions de réaction définies ci-dessus (12 M  $H_2SO_4$ , 16 minutes) pour comparer les résultats obtenus selon différents protocoles d'hydrolyse.

Ainsi, des compositions de mélanges d'hydrolyse de molarité 0,1 M, 1M, 2M et 3M en acide sulfurique ont été testées pour des temps d'hydrolyse de 5, 10, 15 et 30 minutes. Les résultats obtenus montrent que pour une concentration d'acide trop faible (0,1M) la libération du GA ne se fait pas ou se fait incomplètement, même pour les longues durées (jusqu'à 100 minutes d'hydrolyse pour un essai). D'autre part, pour des concentrations trop fortes en acide (3M), des difficultés provenant de réactions avec le polyéthylène - qui peut jaunir - se produisent, même pour des temps courts de 5 minutes. Ces réactions peu reproductibles ne se produisent pas à chaque expérience, ce qu'on peut expliquer par le fait qu'on ne contrôle pas la température, qui peut varier de façon importante du fait de la forte exothermicité observée lorsqu'on ajoute l'acide. Des améliorations dans le protocole d'ajout des différents réactifs et dans le contrôle de la température auraient pu être entreprises, mais dans la mesure où des résultats satisfaisants ont été obtenus pour des concentrations plus faibles (1 M - 2,5 M) et des temps relativement courts (10 à 15 minutes) nous n'avons pas cherché à poursuivre plus loin ce début d'optimisation.

Nous avons donc choisi le protocole décrit ci-dessous:

- Immersion des échantillons dans la solution d'acide sulfurique (100  $\mu$ l d'acide sulfurique 95 % dans 600  $\mu$ l d'eau distillée)
- Agitation pendant 10 min par ultra-sons
- Séparation des échantillons de cette solution
- Préparation de la solution de phénol à 20 % (w/v) dans l'éthanol absolu
- Ajout de 1,4 ml d'acide sulfurique et 80  $\mu$ l de la solution de phénol
- Agitation de cette solution à la température ambiante et mesure de la DO à 482 nm après  $16 \pm 5$  min de réaction





**Figure III.6.** Réaction du GA relargué avec le phénol en présence d'acide sulfurique et formation du Tétrakisphénol

La courbe d'étalonnage a été obtenue à partir de solutions standards de différentes concentrations de glutaraldéhyde ayant subi le protocole décrit ci-dessus pour les échantillons «conditions d'hydrolyse = 10 min, réaction = 16 min».

L'optimum du temps de réaction nécessaire pour la formation tetrakisphénol a été évalué par une variation de temps de réaction en choisissant les solutions standard de GA. D'après les résultats, la réaction est stable à partir de 16 min jusqu'à 30 min.

Afin de mettre en évidence et d'évaluer d'éventuelles adsorptions non spécifiques, nous avons effectué des tests de contrôle sur des disques de PE traité plasma ayant subi le même protocole que celui défini au préalable pour le dosage mais sans l'étape d'activation par le GA.

### I.3.4.3. Résultats, comparaison entre les deux méthodes de dosage et discussion

Les nombres de fonctions aldéhyde déterminés par les deux méthodes (tyramine / BCA et phénol-acide sulfurique) sont présentés dans le tableau III.3. Ils sont compris entre 1,2 et 1,4 molécules / nm<sup>2</sup> (cinq essais répétitifs pour chaque méthode). D'après ces résultats les deux méthodes choisies donnent des valeurs quasi identiques. La dispersion des résultats est estimée par l'écart type n. Comme on l'a dit précédemment, toutes les valeurs sont calculées à partir de la différence entre le PE traité plasma + GA et le PE non traité + GA (référence). D'autre part, les tests de contrôles effectués pour les deux méthodes n'ont pas mis en évidence de signaux parasites significatifs, les réponses obtenues (absorbances) étant voisines de la valeur de la référence.

La limite de détection observée par la méthode BCA / tyramine est de l'ordre de 0,1-0,2 molécules / nm<sup>2</sup>, celle de la méthode PAS étant de l'ordre de 0,2-0,3 molécules / nm<sup>2</sup>.

Méthode	Nombre d'essais (n)	Nombre d'aldéhyde (molécules / nm <sup>2</sup> )
Phénol-acide sulfurique	5	1,4 ± 0,6
Tyramine / BCA	5	1,2 ± 0,2

**Tableau III.3.** Nombres de fonctions aldéhyde déterminés par les méthodes BCA / tyramine et PAS

La quasi identité des résultats obtenus par chacune des deux méthodes PAS et tyramine/BCA est encourageante à deux titres :

- d'une part, sans constituer une preuve absolue, c'est un élément qui conforte la validité des dosages et la confiance que l'on peut porter aux résultats annoncés;

- d'autre part, cela suggère que pas ou peu de molécules de glutaraldéhyde se trouvent "pontées" entre deux amines primaires de surface. En effet, la méthode tyramine/BCA prend normalement en compte uniquement les groupes aldéhydes libres de la surface, susceptibles de réagir avec la tyramine et non les molécules pontées qui sont engagées dans deux liaisons imine. Alors que, du fait de la première étape d'hydrolyse acide, la méthode PAS est capable de dénombrer toutes les molécules de glutaraldéhyde présentes en surface, y compris les GA pontés. Les résultats similaires donnés par les deux méthodes tendent donc à indiquer que le nombre de GA pontés est négligeable, ou tout au moins non significatif, ce qui correspond à l'effet recherché lors de l'incubation de la surface traitée plasma avec une concentration de GA en large excès par rapport à la concentration équivalente d'amines de surface : saturation rapide des sites afin de minimiser les doubles réactions sur un même GA.

Une autre remarque doit être faite concernant la quasi égalité du nombre de fonctions amines primaires dénombrées dans le chapitre précédent avec le nombre de fonctions aldéhyde rapporté ci-dessus: on trouve dans les deux cas en moyenne 1,3 molécules NH<sub>2</sub> / nm<sup>2</sup>. Cette observation nous fournit deux indications:

- d'une part la méthode d'incubation de la surface traitée avec la solution de GA est efficace puisqu'apparemment chaque amine primaire réagit avec une molécule de GA : réaction mole à mole, comme souhaité.

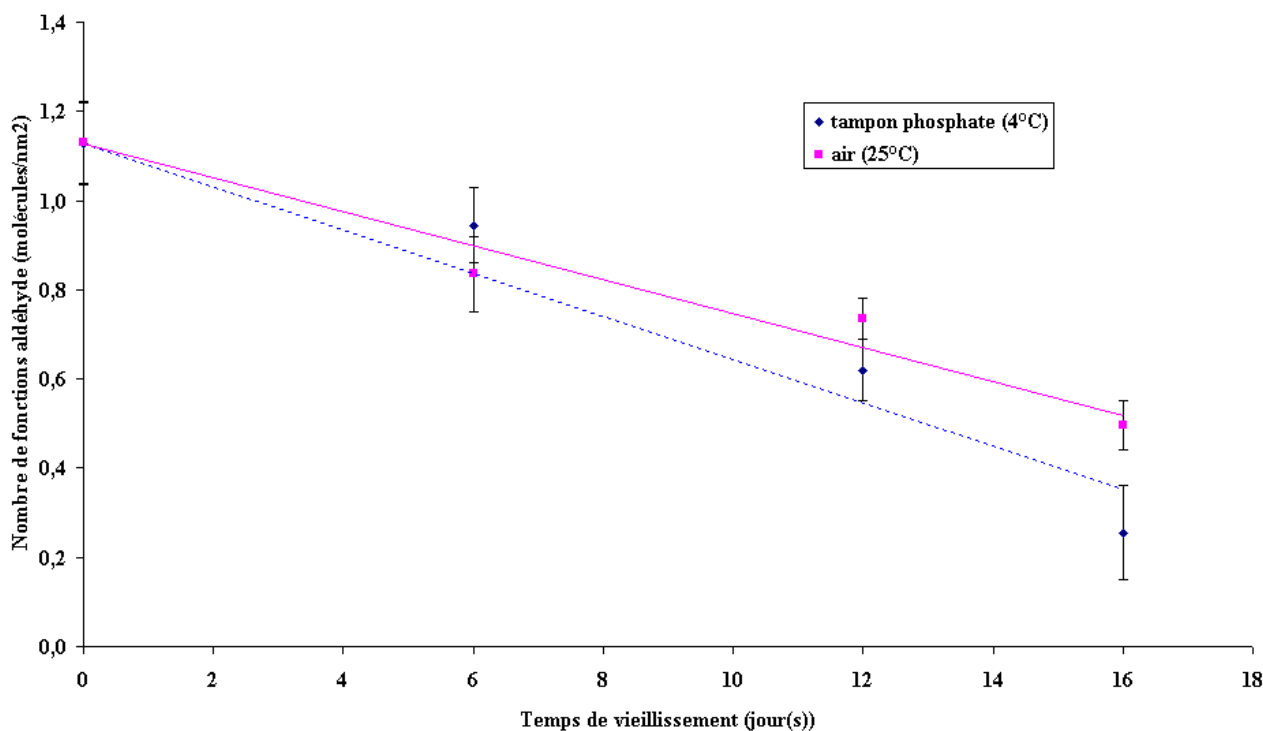
- d'autre part, les amines secondaires et tertiaires ne réagissent pas avec le bras espaceur. Ceci est en accord avec le fait i) que les amines secondaires présentes sur le PE ne réagissent pas avec GA pour former des liaisons énamines (-C=C-N-) dans nos conditions d'incubation dans une solution aqueuse de GA à pH 5 <sup>[23,24,25]</sup>. D'après la littérature la formation d'énamines par réaction d'une amine secondaire avec un aldéhyde doit être réalisée en milieu organique, avec un catalyseur acide par exemple, ii) que les amines tertiaires ne réagissent pas avec les aldéhydes <sup>[26]</sup>.

## I.4. Etude de l'évolution de la concentration de GA en surface en fonction du temps de vieillissement

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'étude du vieillissement des polymères après un traitement plasma [27,28]. En revanche, nous n'avons trouvé aucun résultat dans la littérature décrivant le vieillissement des fonctions aldéhyde greffées sur une surface aminée obtenue par traitement plasma ou autre.

De même que pour les fonctions amines primaires, l'optimisation du protocole d'immobilisation nécessite de connaître l'évolution de la densité des fonctions aldéhyde au cours du temps. Les deux conditions de stockage choisies précédemment, c'est à dire dans l'air à température ambiante ou dans un tampon phosphate à 4°C (0,1 M, pH=7,6) ont été à nouveau étudiées et comparées. Notons que la méthode tyramine / BCA a été sélectionnée pour réaliser les quantifications grâce à sa bonne précision et à sa sûreté de mise en oeuvre.

La Figure III.7. représente l'évolution du nombre de fonctions aldéhyde incorporées à la surface après la fixation de GA. Il est à noter que tous les points représentés correspondent à des expériences qui ont été doublées, parfois triplées.



**Figure III.7.** Evolution de la densité des fonctions aldéhyde en fonction du temps de vieillissement (16 jours)

On observe que la densité des fonctions aldéhyde dans les deux conditions de stockage diminue progressivement.

On peut évaluer leur demi-vie à 15 jours dans le cas du stockage dans l'air à la température ambiante et à environ à 12 jours en milieu phosphate à 4°C. On voit ainsi que pour les fonctions aldéhyde, contrairement aux amines primaires, le stockage à l'air après la fixation de GA est légèrement favorable à un stockage en milieu tampon 4°C. Beaucoup plus important est le résultat de la comparaison entre le vieillissement des amines primaires et des fonctions aldéhyde: on avait montré au chapitre II la sensibilité relativement forte des amines primaires au vieillissement, avec une demi-vie de l'ordre de 6 jours ou encore une perte de 9% de la densité initiale dès les premières 24 heures. Les fonctions aldéhyde se montrent beaucoup moins sensibles avec une demi-vie au moins deux fois supérieure: leur décroissance au bout d'un jour vaut 3% dans le cas d'un stockage à l'air, température ambiante, et de 4% dans le tampon phosphate à 4°C.

La conduite du processus d'immobilisation devrait donc préférer un enchaînement rapide des étapes traitement plasma  $\text{NH}_3$  et réaction avec GA, quitte à ménager quelques délais avant l'étape finale d'immobilisation de l'enzyme, si nécessaire.

On doit également remarquer que l'étude présente de dénombrement des fonctions réactives, amine primaire et aldéhyde, mériterait d'être validée en terme "d'efficacité finale", c'est à dire par la mesure comparative de l'activité enzymatique immobilisée en fin de processus. A ce stade de l'étude, on ne sait pas quelle incidence ont les densités d'amines primaires ou d'aldéhyde sur l'activité enzymatique finale ou sur sa stabilité au cours du temps.

## II. Validation de l'immobilisation d'une enzyme - exemple de la trypsine

### II. 1. Choix de la trypsine

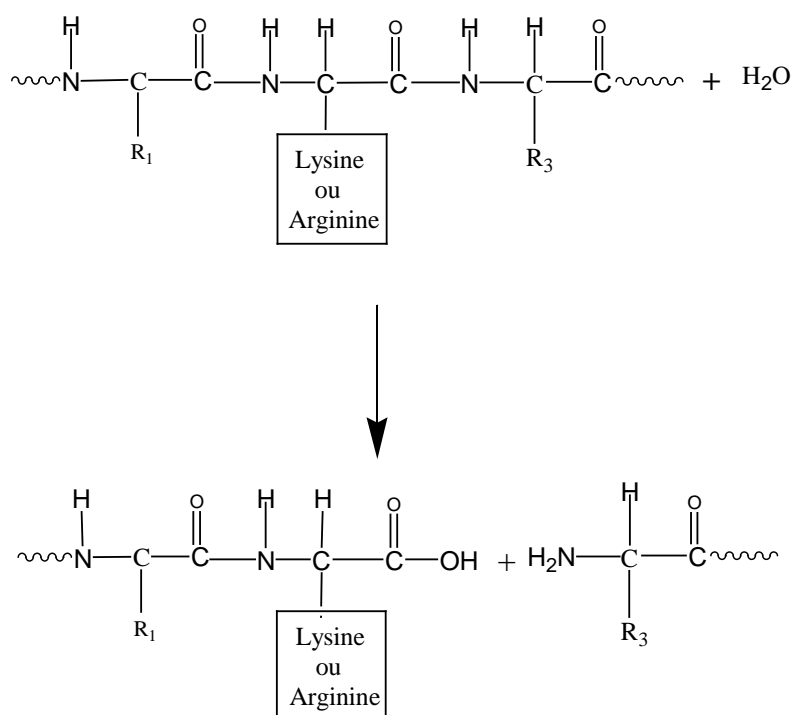
On a mentionné dans le Chapitre I que les enzymes étaient des protéines qui catalysaient un grand nombre de réactions chimiques. On a vu certains des avantages et inconvénients prêtés généralement à l'immobilisation des enzymes par liaison covalente ainsi que des exemples d'applications: réacteurs enzymatiques industriels, dégradation de bactéries <sup>[29]</sup>, amélioration de la compatibilité vis à vis du sang (caractère anti-thrombogène) <sup>[30]</sup>, développement de biocapteurs <sup>[31]</sup>. La trypsine immobilisée est utilisée dans l'objectif d'identifier les protéines <sup>[32]</sup> ou de cartographier les peptides <sup>[33]</sup>. Pour notre étude, le choix de la trypsine a été motivé principalement pour les raisons suivantes:

- c'est une enzyme facilement disponible chez plusieurs fournisseurs et elle est utilisée dans différentes applications industrielles ou de laboratoire,
- il existe des substrats synthétiques couramment commercialisés permettant une mesure simple et précise de son activité enzymatique à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible,
- elle est souvent citée dans la littérature, ce qui facilite la comparaison de nos résultats avec ceux obtenus avec d'autres techniques d'immobilisation,
- sa structure comme les mécanismes de son activité sont bien connus,
- elle constitue un bon modèle de la large classe des protéases, dont le marché, en tonnage et en diversité d'applications, est très important.

La trypsine (EC.3.4.21.4) fait partie du groupe des protéases à sérine qui comporte également la chymotrypsine, l'élastase et la subtilisine <sup>[34]</sup>. Son précurseur inactif, le trypsinogène, est produit dans le pancréas et est sécrété dans l'intestin. Il y est activé en trypsine active en subissant une coupure protéolytique effectuée par l'enzyme enterokinase. On peut noter que les trypsines déjà présentes dans l'intestin peuvent réaliser la coupure sur le trypsinogène et former ainsi de nouvelles trypsines (processus d'autocatalyse). Le rôle physiologique de la trypsine est alors de participer au processus de digestion: hydrolyse des protéines alimentaires en petits peptides ou acides aminés assimilables.

La trypsine possède une forte spécificité en cela qu'elle ne coupe que les liaisons peptidiques situées du côté carboxyl - c'est à dire «à droite» dans la convention habituelle de représentation d'une séquence protéique - des résidus lysine ou arginine (Figure III.8.). C'est d'ailleurs cette spécificité qui en fait un outil de choix pour la cartographie des protéines <sup>[33]</sup>.

Elle contient 223 acides aminés (tableau III.4.), 6 ponts disulfures (S-S) reliant deux à deux les 12 cystéines, avec une masse moléculaire de 23,3 kDa. Sa structure tri-dimensionnelle est présentée dans la figure III.9. Le tableau III.4. donne des informations à propos de la nature et du nombre des acides aminés de la trypsine. Sa séquence est présentée en annexe A.5.

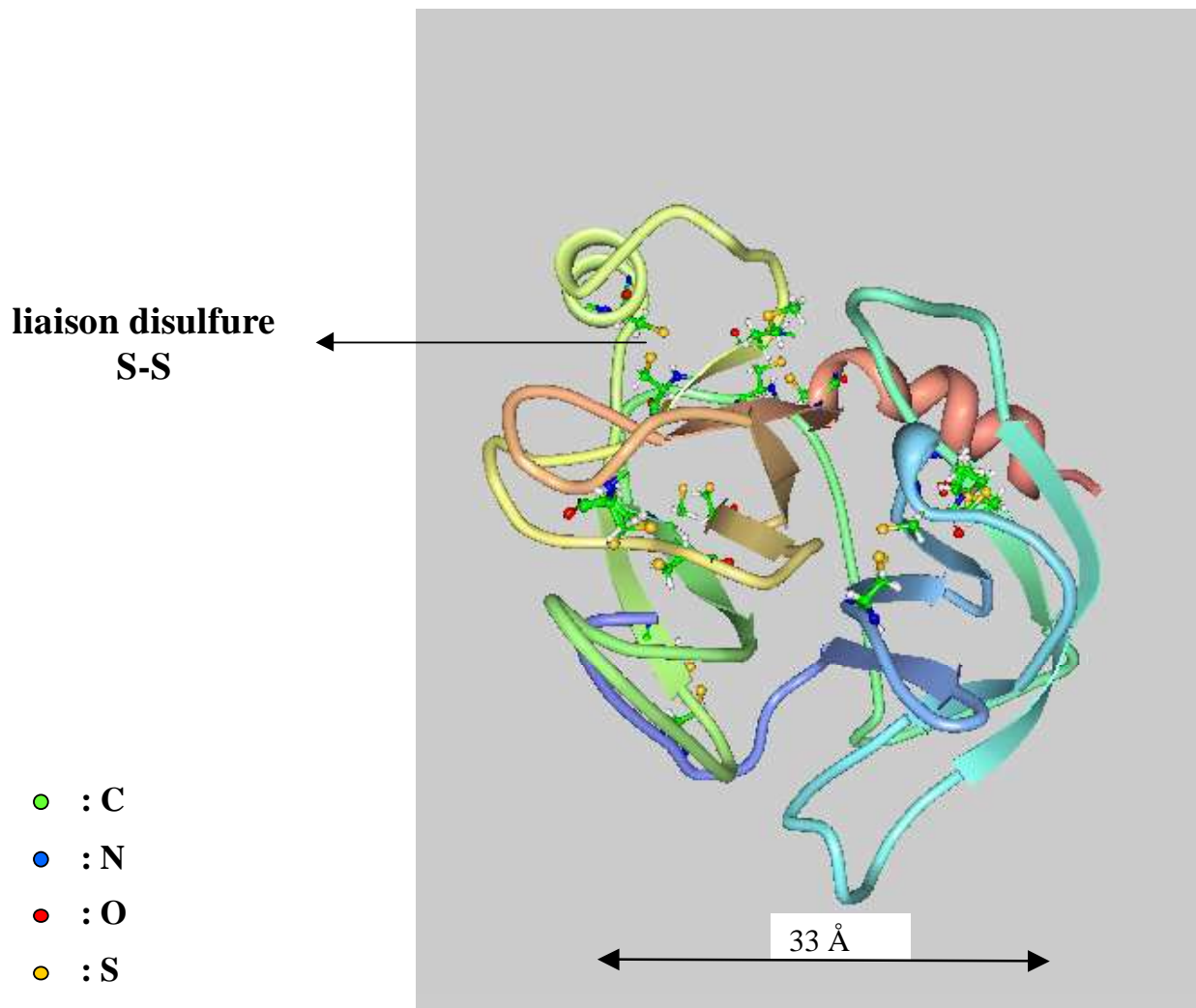


**Figure III.8.** Liaison peptidique de la protéine en présence de la trypsine

Nom de l'acide aminé	Symbole	Formule	Masse moléculaire (M)	Nombre de résidus présents dans la trypsine
Alanine	A	NC <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	89	14
Arginine	R	N <sub>4</sub> H <sub>14</sub> C <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	174	2
Asparagine	N	N <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	132	16
Acide aspartique	D	NC <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	132	6
Cystéine	C	NC <sub>3</sub> O <sub>2</sub> H <sub>7</sub> S	121	12
Glutamine	Q	N <sub>2</sub> C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	146	10
Acide glutamique	E	NC <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	146	4
Glycine	G	NC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	75	25
Histidine	H	N <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	155	3
Isoleucine	I	N <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	131	15
Leucine	L	NC <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub>	131	14
Lysine	K	N <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	146	14
Méthionine	M	NC <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> S	149	2
Phénylalanine	F	NC <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	165	3
Proline	P	NC <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	115	8
Sérine	S	NC <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	105	34
Thréonine	T	NC <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>	119	10
Tryptophane	W	N <sub>2</sub> C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	204	4
Tyrosine	Y	NC <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub>	181	10
Valine	V	NC <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	117	17

**Tableau III.4.** Présentation des acides aminés (symbole, formule, masse molaire, nombre) <sup>[34]</sup> présents dans la séquence de la trypsine





**Figure III.9.** Structure 3 D de la trypsine; les 12 résidus cystéine et les 2 méthionine contenant chacun un atome de soufre sont représentés sous forme développée; référence: 1UTO Protein Data Bank <sup>[35]</sup>

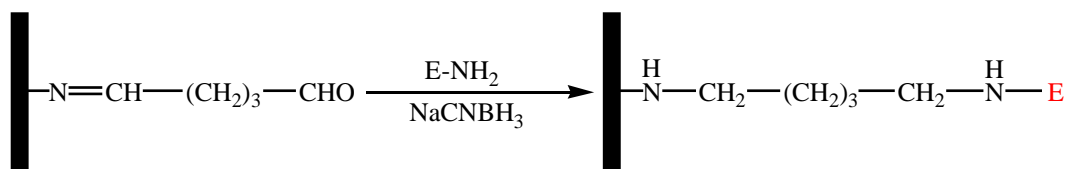
On verra dans les paragraphes suivants que la présence des nombreuses liaisons peptidiques (fonctions amides), liant entre eux chacun des résidus d'acides aminés, ainsi que l'existence des liaisons S-S et C-S, constituent les meilleures signatures de la présence de la trypsine sur les surfaces de PE lors des analyses par XPS.

## II. 2. Protocole d'immobilisation de la trypsine

La dernière étape de l'immobilisation consiste à faire réagir les échantillons de PE traités plasma + GA avec une solution nouvellement préparée de trypsine à 1 g/l <sup>[6,36]</sup> dans un tampon phosphate 0,1 M (pH=7,6) selon le protocole suivant:

- ☞ Prélever 1,20 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pour 100 ml de la solution tampon. Le pH de cette solution est de l'ordre de 4,4 et on ajoute progressivement la solution de soude jusqu'à obtenir une solution de pH=7,60
- ☞ Préparation de 0,1 g de trypsine dans 100 ml de la solution tampon à pH=7,60

Les échantillons de PE sont ensuite immergés dans 4 ml de la solution finale à 4°C et disposés sur une table d'agitation. Afin de réduire la fonction imine en amine secondaire, on ajoute à t = 35 min, dans certaines expériences, 0,1 M de cyanoborohydrure de sodium NaCNBH<sub>3</sub> <sup>[37,38]</sup>. A titre de comparaison, certains échantillons ne subissent pas cette étape de réduction et conservent leurs deux liaisons imine. L'immobilisation de l'enzyme est réalisée en laissant incuber les échantillons à 4°C sous agitation pendant toute la nuit.



**Figure III.10.** Réduction des imines en amines secondaires en présence de NaCNBH<sub>3</sub>

Il est important de souligner que les deux réducteurs, NaBH<sub>4</sub> et NaCNBH<sub>3</sub>, sont beaucoup cités dans la littérature; l'utilisation de NaCNBH<sub>3</sub> semble cependant préférable <sup>[39]</sup>.

Après 15 heures d'incubation, on rince tous les échantillons en trois étapes:

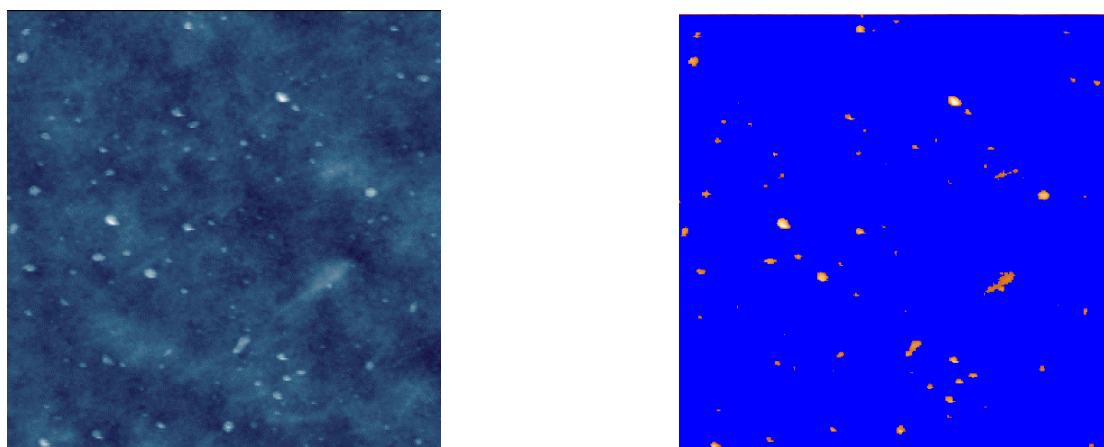
1. Tampon phosphate 0,1 M (pH=7,6) pendant environ une heure
2. Lavage des échantillons avec le tampon phosphate (0,1 M, pH=7,6) pendant 10 min en agitant
3. Rinçage final de tous les échantillons à la solution tampon pendant 15 min
4. Séchage à l'air

## II.3. Etude de l'immobilisation de la trypsine

Comme dans les étapes précédentes, nous étudions les modifications physico-chimiques de la surface après l'immobilisation de la trypsine par des analyses XPS, MEB et AFM. Les quantités de protéines totales immobilisées à la surface ont été déterminées par la méthode BCA.

### II.3.1. Modification topographique de la trypsine immobilisée

L'analyse MEB de la surface incubée avec l'enzyme montre ce qui semble être des agrégats de quelques micromètres déposés sur une surface présentant la même topographie que celle des étapes précédentes. Une analyse par EDX focalisée sur certains agrégats (2 essais sur des échantillons provenant de 2 séries d'immobilisations indépendantes), montre la présence de soufre. Dans la mesure où les agrégats ne ressemblent en rien à une contamination microbienne on peut supposer que le soufre observé est la preuve de la présence de protéine. Par AFM, on observe l'apparition de petits nodules (clusters) sur la surface après l'immobilisation de la trypsine, comme on peut le voir sur la figure ci-dessous:



**Figure III.11.** Image AFM de la surface après incubation avec la trypsine (échelle 30  $\mu\text{m}$  / 30  $\mu\text{m}$ )

On remarque que ces points sont dispersés de façon homogène sur la surface. Cette observation est identique à celle présentée par K. Saal et son équipe<sup>[40]</sup>. On doit cependant faire deux remarques:

- cette image d'une surface comportant des agrégats de grande taille (quelques micromètres) par rapport à une molécule de trypsine dont le «diamètre» moyen est de l'ordre de 40 Å, fait penser

à des dépôts de précipité de protéine, distribués de façon éparse. De tels précipités risquent de ne pas posséder d'activité enzymatique, alors que l'on souhaitait fixer une couche continue de trypsine active, sur la surface.

- les deux techniques, MEB et AFM, utilisées dans ce travail ne permettent cependant pas de conclure car leur sensibilité n'est pas suffisante pour visualiser la présence éventuelle d'une telle couche monomoléculaire de trypsine.

Par la suite, afin de déterminer la nature des groupements chimiques présents sur la surface incubée avec l'enzyme, nous avons fait appel à l'analyse XPS.

### II.3.2. Caractérisation physico-chimique par XPS de la surface après l'immobilisation

L'immobilisation covalente de la trypsine sur la surface de PE a été vérifiée à l'aide de l'analyse XPS. Le spectre général met en évidence l'existence d'un nouveau pic de soufre ( $S_{2P}$  à 163 eV), traduisant la présence des acides aminés sulfurés cystéine et méthionine de la trypsine (Tableau III.4.). Ce pic peut être déconvoluer en quatre pics dont la largeur à mi-hauteur (FWHM) a été fixée à entre 1,6 et 2 eV (le facteur de sensibilité pour le soufre vaut 1,67).

On doit remarquer (M. Chehimi, ITODYS, communication personnelle) que les électrons  $S_{2P}$  correspondant à un état chimique apparaissent sous forme de doublet, d'énergies de liaison différentes:  $S_{2P\ 3/2}$  et  $S_{2P\ 1/2}$ , selon le spin des électrons. L'écart d'énergie entre les deux pics du doublet est d'environ 1,2 à 1,3 eV et l'aire du pic  $S_{2P\ 3/2}$  est double de celle de  $S_{2P\ 1/2}$ . Nous avons ainsi déconvoluer les spectres en tenant compte de ces contraintes.

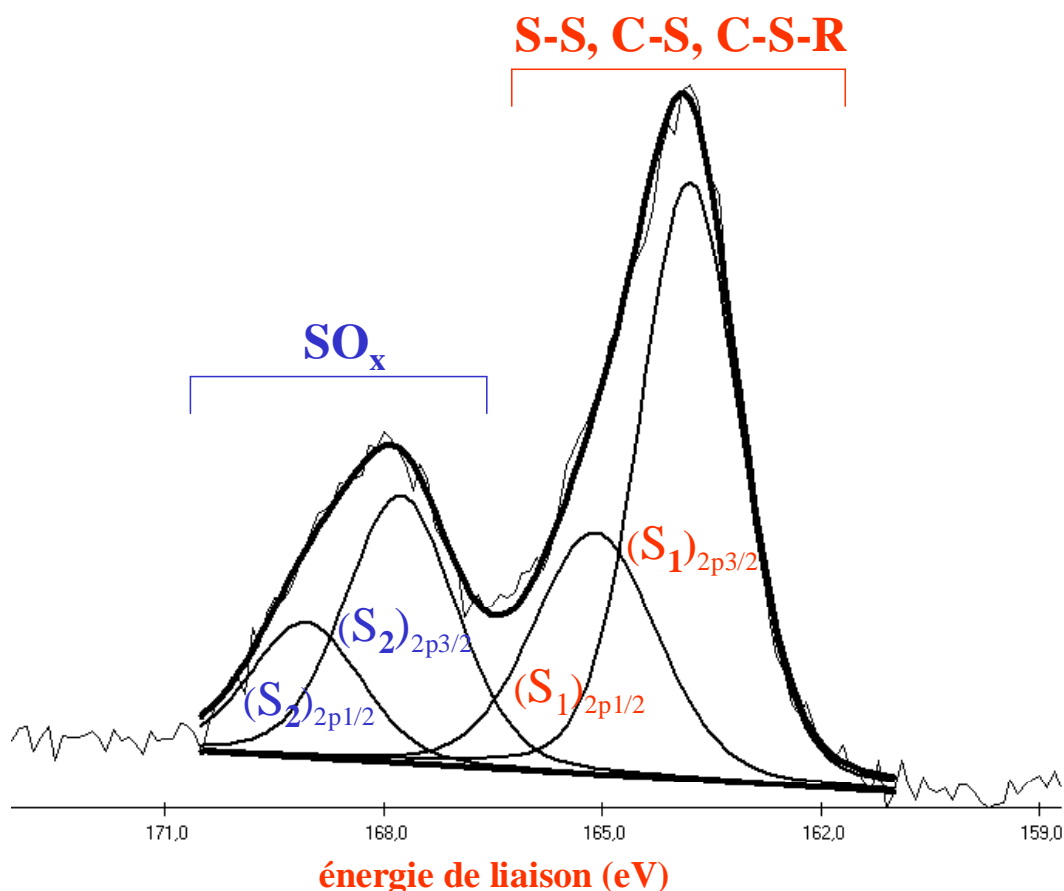
L'analyse XPS du spectre  $S_{2P}$  comprend ainsi deux parties: une région composée par les deux pics à 163,8 eV ( $(S_1)_{2p\ 3/2}$ ) et à 165,2 eV ( $(S_1)_{2p\ 1/2}$ ) et une autre région de deux pics à 167,8 eV ( $(S_2)_{2p\ 3/2}$ ) et à 169,1 eV ( $(S_2)_{2p\ 1/2}$ ). La littérature ne fournit pas beaucoup de données sur la déconvolution des pics  $S_{2P}$  pour une protéine immobilisée. Les pics de plus haute énergie ( $(S_2)_{2p\ 3/2}$  et ( $(S_2)_{2p\ 1/2}$ ) correspondent à des fonctions oxydées du soufre: pour  $S_{2P\ 3/2}$  les tables de données à notre disposition <sup>[41]</sup> ne mentionnent pas spécifiquement les valeurs des énergies  $S_{2P\ 1/2}$ . L'énergie des électrons  $S_{2P}$  mentionnée pour les espèces  $S^{IV}$  (sulfites,  $SO_2$ ,  $HSO_3^-$ , ..) est comprise entre 166,7 et 168,0 eV, tandis que  $S^{VI}$  (celle correspondant à sulfates) est généralement supérieure (167,4-169,0 eV). Dans notre cas, le pic enveloppe du doublet  $S_2$  compris entre 167,8 et 169,1 eV semble plutôt correspondre aux sulfates. De tels résultats ont déjà été rapportés dans la littérature, les différents auteurs attribuant ces pics à la présence d'impuretés <sup>[42]</sup> provenant soit de l'oxydation du soufre à l'air <sup>[43]</sup> soit de l'utilisation d'une solution alcaline pour le rinçage des échantillons <sup>[44]</sup>.

Au cours de notre étude par XPS, nous avons recherché la présence de soufre sur différents échantillons (PE nu, PE traité plasma, PE traité + GA, PE traité + GA + trypsine) et nous avons utilisé différents protocoles pour le rinçage final, avant analyse XPS; en particulier nous avons utilisé de l'eau pure ou bien le tampon phosphate habituel (0,1 M, pH 7,6).

On a remarqué que les pics de faible énergie,  $(S_1)_{2p\ 3/2}$  et  $(S_1)_{2p\ 1/2}$ , sont présents uniquement pour les échantillons ayant subi l'étape d'incubation avec la trypsine, alors que  $(S_2)_{2p\ 3/2}$  et  $(S_2)_{2p\ 1/2}$  peuvent être observés pour des échantillons n'ayant pas été mis en contact avec la protéine. Ceci conforte l'attribution des pics  $(S_2)_{2p\ 3/2}$  et  $(S_2)_{2p\ 1/2}$  à des impuretés, en accord avec la littérature; tandis que  $(S_1)_{2p\ 3/2}$  et  $(S_1)_{2p\ 1/2}$  seraient la signature de la trypsine immobilisée.

Comme leur dénomination l'indique, on ne connaît pas précisément la nature des "impuretés" observées, mais on note que le sel  $NaH_2PO_4$  utilisé pour préparer la solution de rinçage (tampon phosphate) contient de faibles quantités d'ion sulfate  $SO_4^{2-}$  (0,003 % à 0,005 % masse par masse de sel).

Le pic correspondant de façon la plus évidente à la protéine est  $(S_1)_{2p\ 3/2}$  puisque les liaisons S-S disulfure, C-S de la cystéine, ou C-S-R de la méthionine sont répertoriées à 163,8 eV <sup>[45]</sup>.



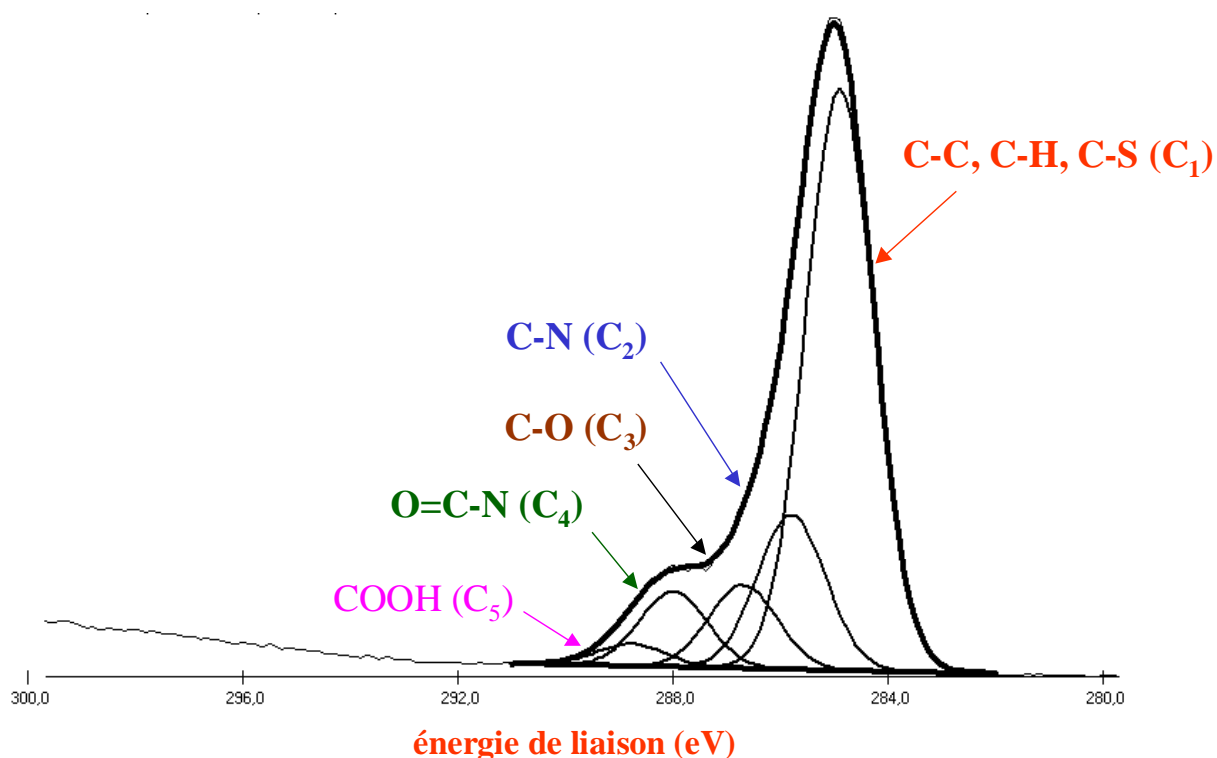
**Figure III.12.** Déconvolution du pic  $S_{2P}$  de la trypsine immobilisée sur la surface de PE (échantillon PE traité par plasma + GA + Enzyme +  $NaCNBH_3$ )

On constate que l'aire de la composante  $(S_1)_{2p\ 3/2}$  représente 45 % de l'aire totale et qu'elle est bien environ le double de celle du pic  $(S_1)_{2p\ 1/2}$  (22 %). Les pics attribués aux sulfates suivant également la loi précédente:  $S_{2p\ 3/2} = 22\ \% = 2 * S_{2p\ 1/2} = 2 * (11\ \%)$ . La part de la protéine immobilisée sur la surface représente ainsi 67 % contre 33 % pour les fonctions oxydées du soufre.

La déconvolution du spectre  $C_{1s}$  du carbone montre également clairement la présence de l'enzyme à la surface. En effet, par rapport à l'étape GA, on voit apparaître de nouvelles fonctions correspondant aux:

- amides N-C=O des liaisons peptidiques à 288 eV ( $C_4$ )
- aux liaisons C-S (cystéines, méthionines) à 285 eV, incluses avec les C-C et C-H dans le pic  $C_1$
- amines C-N à 285,8 eV ( $C_2$ ) pouvant correspondre aux résidus d'acides aminés lysine, arginine, histidine, tryptophane
- alcools C-O à 286,7 eV ( $C_3$ ) pouvant signaler les résidus sérine, tyrosine, thréonine
- acides carboxyliques COOH à 288,8 eV ( $C_5$ ) pour les résidus acide aspartique et acide glutamique de la trypsine

Les énergies de ces différents pics sont en bon accord avec celles observées dans la littérature sur l'analyse XPS des protéines <sup>[44,46-49]</sup>.



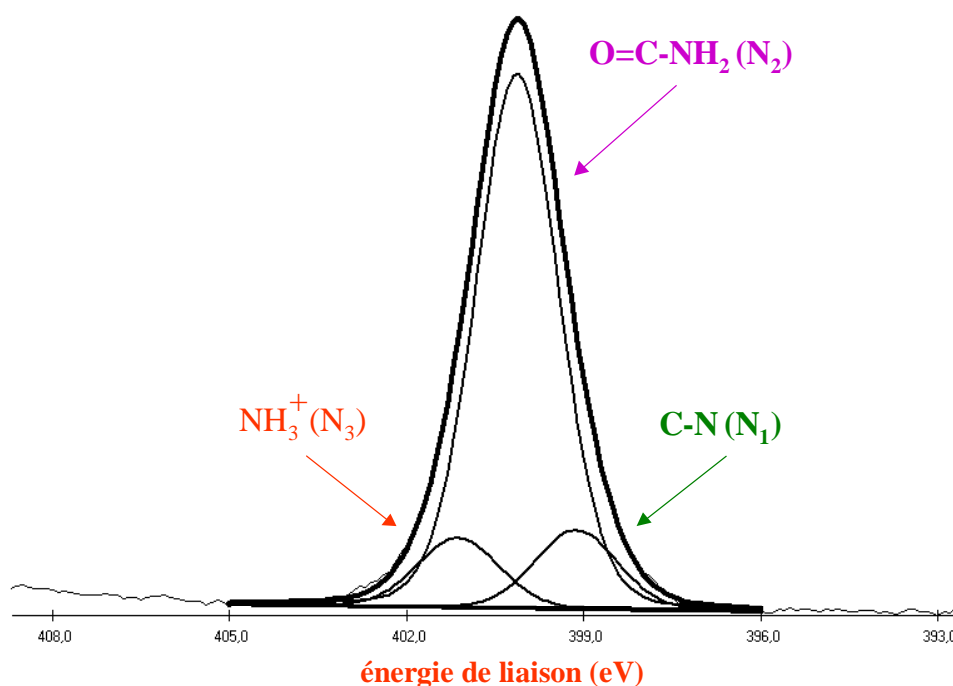
**Figure III.13.** Spectre XPS du carbone  $C_{1s}$  de la trypsine immobilisée sur la surface de PE (échantillon PE traité par plasma + GA + Enzyme +  $NaCNBH_3$ )

La répartition des fonctions représentées sur le spectre  $C_{1S}$  après l'immobilisation de la trypsine est présentée dans le tableau III.5. Le pourcentage des composantes  $C_2$ ,  $C_3$  et  $C_4$  après l'immobilisation est nettement supérieur à celles des étapes précédentes déjà présentées dans le tableau III.1. après l'activation de la surface traitée plasma par le GA.

Nom	$C_1$ (%)	$C_2$ (%)	$C_3$ (%)	$C_4$ (%)	$C_5$ (%)
PE traité+GA+E	64±2	17±2	9±2	8±2	2±2

**Tableau III.5.** Pourcentages des différentes contributions du spectre  $C_{1S}$  après l'immobilisation de la trypsine

Le spectre  $N_{1S}$  permet d'identifier la présence d'un nouveau pic à 401,1 eV autre que ceux les étapes précédentes. Il s'agit du pic  $NH_3^+$  ( $N_3$ ) des résidus d'acides aminés lysine de la trypsine à pH=7,6. Ceci montre qu'un certain nombre de résidus lysine restent libres, sans engager de liaison avec GA. Les deux autres fonctions correspondent aux amines ( $N_1$ ) à 399,1 eV et aux amides ( $N_2$ ) à 400,1 eV.



**Figure III.14.** Spectre XPS  $N_{1S}$  de la trypsine immobilisée sur la surface de PE (échantillon PE traité par plasma + GA + Enzyme +  $NaCNBH_3$ )

Il est important de noter que le pourcentage de la composante  $N_2$  (78%) est supérieur à celui de  $N_1$  (11%) et  $N_3$  (11%).

La comparaison de la variation des rapports N / C et O / C après chaque étape confirme qu'après l'immobilisation de l'enzyme sur la surface les rapports N / C et O / C augmentent à nouveau et s'approchent des valeurs calculées théoriquement à partir de la formule brute de la trypsine (Tableau III.6.), témoignant de la fixation d'une quantité significative d'enzyme.

Le fait que les valeurs expérimentales des rapports N / C et O / C restent inférieures aux valeurs théoriques correspondant à l'enzyme (tableau III.6.) peut s'interpréter par la nature du recouvrement de la surface de PE par l'enzyme: soit il s'agit d'une couche monomoléculaire, laissant les espèces sous-jacentes, GA et PE, contribuer également au signal mesuré, qui ne correspond donc pas à la composition de la trypsine seule; soit parce que l'enzyme ne recouvre pas complètement la surface de façon homogène <sup>[50]</sup>.

Nom	O / C	N / C	S / C	S / N
PE traité	0,061	0,11	–	–
PE traité+GA	0,058	0,058	–	–
PE traité+GA+E (exp.)	0,22	0,12	0,0085	0,071
E (théo.)	0,320	0,276	0,014	0,0502

**Tableau III.6.** Comparaison des rapports N / C et O / C sur la surface de PE après chaque étape de greffage (GA = glutaraldéhyde, E = enzyme trypsine)



### II.3.3. Etude par XPS de la quantité de trypsine immobilisée en surface en fonction de la concentration de cette enzyme dans la solution d'incubation

Afin d'évaluer l'influence de la concentration de trypsine dans la solution d'incubation sur l'immobilisation, nous avons effectué en parallèle des analyses par XPS de différents échantillons. L'évolution des fonctions observées sur les spectres  $C_{1S}$ ,  $N_{1S}$  et  $S_{2P}$  est regroupée dans le tableau suivant:

Concentration (g/l)	$C_2$ (%)	$C_4$ (%)	$N_2$ (%)	$N_3$ (%)	$S_1$ (%)
0	0,11	2	37,7	0	0
0,01	0,13	5,53	70	9,9	37
0,1	0,12	5,12	71	12	42,5
0,5	0,18	10	81	10,5	69
1	0,16	8	78	10	67

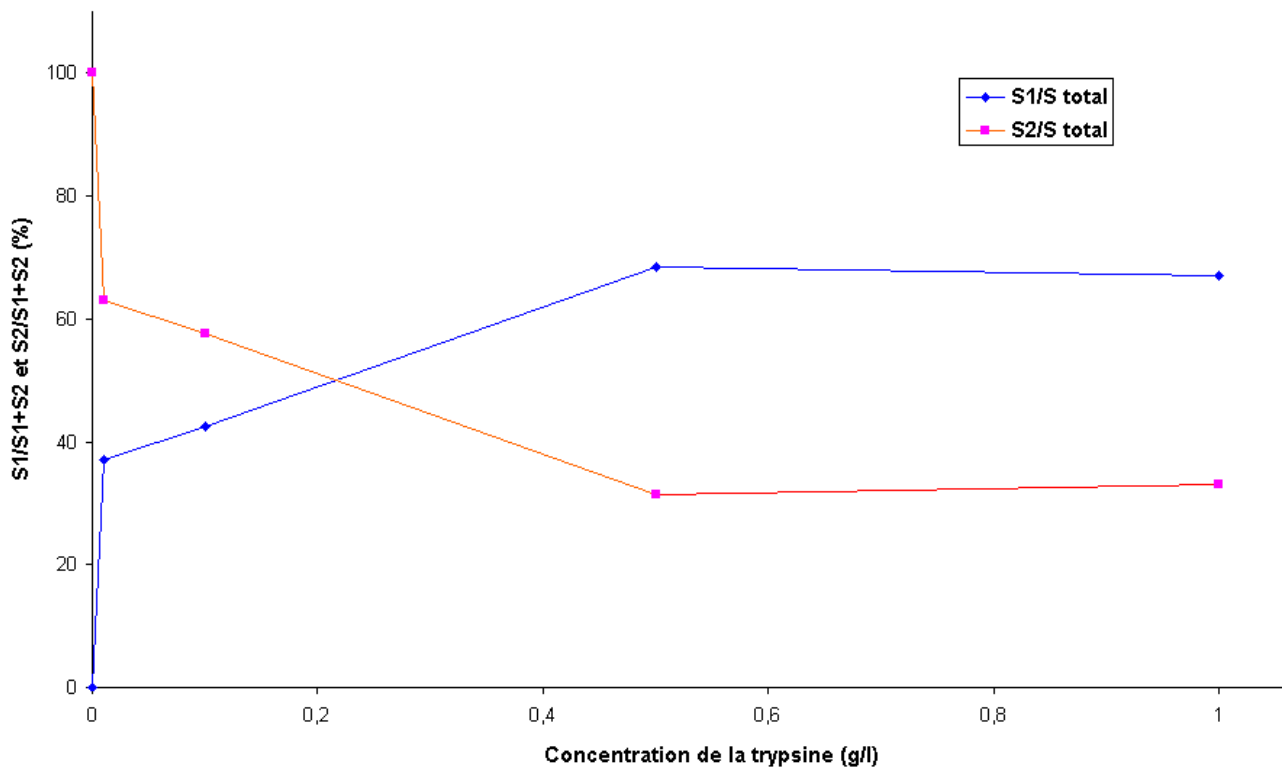
**Tableau III.7.** Evolution des pourcentages des différentes contributions des spectres  $C_{1S}$ ,  $N_{1S}$ ,  $S_{2P}$  en fonction de la concentration de la trypsine dans la solution d'incubation

En ce qui concerne les composantes relatives aux spectres  $C_{1S}$  et  $N_{1S}$ , leurs variations en fonction de la concentration de la trypsine sont difficiles à interpréter. En revanche, la déconvolution du pic  $S_{2P}$  montre qu'il est le meilleur élément marqueur qui nous permette de corréler le pourcentage de ces fonctions chimiques en fonction de la concentration de la trypsine immobilisée sur la surface.

Nous avons calculé le rapport de la somme des aires des pics  $S_1(2p_{3/2}, 2p_{1/2})$  d'une part, et  $S_2(2p_{3/2}, 2p_{1/2})$  d'autre part, sur la somme des aires de tous les pics de S ( $S_1+S_2$ ) pour des concentrations de trypsine variant de 0 à 1 g/l. Le pourcentage de la composante  $S_1$  (S-S, C-S, C-S-R) augmente alors que pour des concentrations supérieures à 0,5 g/l, on observe un palier correspondant à la composante  $S_1$  à environ 68 %. Pour ces fortes concentrations, le pic  $S_2$  correspondant au soufre oxydé reste plus au moins stable (entre 31-33 %).

On remarque par contre que ( $S_2$ ) diminue progressivement lors de l'augmentation de la concentration de la trypsine. Ceci peut être interprété par le recouvrement, par l'enzyme, de la surface de PE et de ses impuretés soufrées oxydées qui apparaissent comme relativement indépendantes de la quantité d'enzyme à la surface.

Pour assurer la saturation des sites, la concentration de la trypsine en solution a été fixée à 1 g/l pour la suite de notre étude.



**Figure III.15.** Evolution des rapports d'aires  $S_1 / S_1+S_2$  et  $S_2 / S_1+S_2$  en fonction de la concentration de trypsine dans la solution d'incubation

### II.3.4. Dosage de la trypsine immobilisée sur la surface par la méthode au BCA

La concentration en protéines totales fixées sur la surface a été déterminée à l'aide d'un Kit BCA (Micro BCA protein assay kit, Pierce) suivant le protocole présenté par Pierce. Comme il a été dit précédemment pour les dosages des amines et du glutaraldéhyde, le principe de la méthode est la mesure par spectrophotométrie à 562 nm du complexe coloré formé par l'acide bicinchoninique (BCA) et les ions cuivreux  $\text{Cu}^+$ . Dans le cas présent, on met à profit les propriétés réductrices de la protéine qui réagit avec  $\text{Cu}^{2+}$  en milieu basique pour donner  $\text{Cu}^+$  <sup>[51,52]</sup> qui est dosé dans la deuxième étape. Des gammes étalons ont été réalisées avec la sérum albumine bovine (BSA) qui est la protéine standard la plus couramment utilisée, et la trypsine.

Les avantages de cette méthode parmi d'autres comme celles de Lowry et celle de Bradford <sup>[53,54]</sup> sont:

- compatibilité de cette méthode en présence de tensio-actifs
- faible variation de la densité optique d'une protéine à l'autre
- simplicité
- sensibilité (0,5 - 25  $\mu\text{g} / \text{ml}$  de protéine).

La concentration en protéines totales immobilisées sur la surface de PE a été trouvée égale à 2,3  $\mu\text{g} / \text{cm}^2$  équivalent BSA ou encore 1,7  $\mu\text{g} / \text{cm}^2$  de trypsine, en utilisant comme référence un échantillon de PE non traité, incubé avec la trypsine.

Le tableau III.8. présente différents résultats de densités surfaciques d'enzymes, immobilisées par différentes méthodes. On remarque que, mis à part pour les films constituant une matrice dans laquelle les enzymes sont incluses <sup>[61]</sup>, les valeurs apparaissant dans le tableau sont comprises entre 0,5 et 50  $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ . Du point de vue de la comparaison entre méthodes de fonctionnalisation par voie chimique ou par voie plasma, il est intéressant de considérer les résultats de Goddard et al. <sup>[55]</sup> qui ont trouvé 6  $\mu\text{g} / \text{cm}^2$  de lactase sur un film de PE activé par voie chimique en utilisant le GA comme bras espaceur. Nos résultats sont du même ordre de grandeur, bien que plus petits en terme de masse immobilisée. Les résultats donnés sur les surfaces de PE greffées par des copolymères sont à rapprocher du procédé de polymérisation par plasma (par exemple allylamine) dans lequel un dépôt est réalisé. Deux remarques doivent également être faites à propos des chiffres donnés dans le tableau:

- Certains auteurs <sup>[56]</sup> ont montré que l'augmentation de la densité d'enzymes pouvait nuire à l'activité globale de la surface du fait de l'encombrement stérique, du blocage de sites actifs ou de dénaturations.

- la détermination des quantités immobilisées est réalisée par des méthodes très variables. Par exemple ces derniers auteurs <sup>[56]</sup> mesurent, par bilan, la quantité de bras espaceur (CMC) fixée et en déduisent une densité d'enzyme immobilisée. D'autres <sup>[57]</sup> estiment, à partir de l'activité enzymatique de la surface, une masse équivalente d'enzyme en solution.

Si l'on considère la trypsine ( $M=23,3 \cdot 10^3$  g) comme une sphère d'environ 40 Å de diamètre, qui occuperait sur le support sa surface projetée ( $\pi D^2/4 \approx 12,6 \text{ nm}^2$ ), on trouve que les  $1,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  mesurés dans nos expériences correspondent à environ 0,44 molécules de trypsine / $\text{nm}^2$  soit une occupation de  $5,5 \text{ nm}^2$  d'enzyme /  $\text{nm}^2$  de PE. Ce qui signifierait l'existence de plusieurs "couches" d'enzymes, sous une forme qu'on ne connaît pas : recouvrement homogène ou par agrégats, .... Cette déduction irait dans le même sens que les observations de clusters et agrégats faites par MEB et AFM.

Enzyme	Support	Immobilisation	Densité $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Référence
Trypsine	Polyéthylène	Plasma $\text{NH}_3$ + glutaraldéhyde	$1,7 \pm 0,1$	Présent Travail
Lactase	Polyéthylène	Activation chimique +polyéthylèneimine + glutaraldéhyde	6	Goddard et al. 2007 <sup>[55]</sup>
Trypsine	Polyéthylène	Covalente (1) PE-g-PAA + CMC	15 - 53	Yamada et al. 2003 <sup>[56]</sup>
Trypsine	PAN ou PPY (2)	Covalente AAc + WSC (2)	0,5 (éq. enzyme libre)	Loh et al. 1996 <sup>[57]</sup>
Trypsine	Silice	Photoimmobilisation covalente	15,8	Bossi et al. 2004 <sup>[33]</sup>
Alcool déshydrogénase	Nylon	Glutaraldehyde	35	Roig et al. 1991 <sup>[58]</sup>
Catalase	Poly(HEMA)-CB-Fe (3)	Adsorption	23,6	Arica et al. 1997 <sup>[59]</sup>
A-Amylase	Particules matière amylacée	Adsorption	1,62	Leloup et al. 1991 <sup>[60]</sup>
Lactoperoxidase	Film d'alginate réticulé	Incorporation	$0,2 - 0,7 \text{ mg}/\text{cm}^2$	Mecitoglu et al. 2007 <sup>[61]</sup>
Trypsine	Membrane PVDF activée par carboxyl (4)	Covalente incubation directe trypsine	0,9 (éq. enzyme libre)	Bienvenut et al. 1999 <sup>[62]</sup>

(1): PE-g-PAA: Polyéthylène greffé avec un polymère d'acide acrylique; liaison avec le CMC: CMC = 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoéthyl)-carbodiimide metho-*p*-toluenesulfonate

(2): PAN: Polyaniline; PPY: Polypyrrole; AAc: photopolymérisation par UV de l'acide acrylique; WSC = "Water Soluble Carbodiimide" = 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide, HCl

(3): Poly(HEMA)-CB-Fe: Poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate + Cibacron Blue + ions  $\text{Fe}^{(III)}$ )

(4): Membrane IAV, Société Immobilon tech

**Tableau III.8.** Différents résultats de densités surfaciques d'enzymes, immobilisées par différentes méthodes selon la littérature

## Conclusion

L'étude décrite dans ce chapitre a été consacrée à l'application de la surface de PE traitée par plasma d'ammoniac en vue d'immobilisation de la trypsine via des liaisons covalentes.

Nous avons développé un protocole d'activation des fonctions amines primaires utilisant le glutaraldéhyde (GA) qui joue le rôle de bras espaceur. Cette réaction conduit à une liaison imine. L'analyse XPS révèle l'apparition des nouvelles fonctions C=N (imine) et HC=O (aldéhyde) sur la surface après la fixation de GA. Cette évolution est accompagnée par une diminution du rapport N/C.

L'étude du nombre de fonctions aldéhydes à la surface a été évaluée par les deux méthodes de dérivation chimique (tyramine / BCA, phénol-acide sulfurique (PAS)). Les deux méthodes présentent des valeurs du nombre d'aldéhyde quasi identiques (entre 1,2 et 1,4 molécules / nm<sup>2</sup>). Ce résultat est en bon accord avec la quantité d'amines primaires déterminée (entre 1,2 et 1,4 molécules NH<sub>2</sub> / nm<sup>2</sup>). Ceci révèle la réaction mole à mole entre les amines primaires de la surface et la molécule de glutaraldéhyde. Nous avons également remarqué que le nombre de fonctions aldéhydes après la fixation de GA est plus stable dans le temps en comparaison avec celui des amines primaires.

Au cours de la dernière partie relative à l'immobilisation de la trypsine, les analyses XPS et AFM ont permis de suivre la présence de notre enzyme sur la surface:

- la topographie de la surface révèle une apparition de minuscules nodules (clusters) sur la surface après l'immobilisation.
- l'incorporation du soufre
- la présence des liaisons peptidiques à 288 eV et le pic  $NH_3^+$  à 401,1 eV
- l'augmentation des rapports N / C et O / C

La concentration de protéines immobilisées sur la surface de PE a été estimée d'être 2,305 µg / cm<sup>2</sup>. En conséquence la création de fonctions amines primaires fixées à la surface des films de PE permet avec les bras espaceurs de réaliser un greffage stable de fonctions enzymatiques. Cette procédure ouvre le champ à des matériaux multicouches biocompatibles tant pour des applications d'identifications des molécules en milieux aqueux, que pour des applications dans la domaine biomédical (surface décharge extracorporel).

## Références

- [1] – **R. Ganapathy, S. Manolache, M. Sarmadi, W. J. Simonsick, J. R., F. Denes**  
«Immobilization of active  $\alpha$ -chymotrypsin on RF-plasma-functionalized polymer surfaces»  
Journal of Applied Polymer Science, 78, 2000, p 1783-1796
- [2] – **C. Marquie**  
«Chemical reactions in cottonseed protein cross-linking by Formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal for the formation of protein films with enhanced mechanical properties»  
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 2001, p 4676-4681
- [3] – **J. A. Gerrard, P. K. Brown, S. E. Fayle**  
«Maillard crosslinking of food proteins I: the reaction of glutaraldehyde, formaldehyde and glyceraldehyde with ribonuclease»  
Food Chemistry, 79, 2002, p 343-349
- [4] – **M. Jaturanpinyo, A. Harada, X. Yuan, K. Kataoka**  
«Preparation of bionanoreactor based on Core-Shell structured polyion complex micelles entrapping trypsin in the core cross-linked with glutaraldehyde»  
Bioconjugate Chemistry, 15, 2004, p 344-348
- [5] – **I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, K. C. Waldron**  
«Glutaraldehyde: behaviour in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking»  
Bio Techniques, 37, 5, 2004, p 790-802
- [6] – **F.H. Isgrove, R.J.H. Williams, G.W. Niven, A.T. Andrews**  
«Enzyme immobilization on nylon-optimization and the steps used to prevent enzyme leakage from the support»  
Enzyme and Microbial Technology, 28, 2001, p 225-232
- [7] – **E. Ruckenstein, W. Guo**  
«Cellulose and glass fiber affinity membranes for the chromatographic separation of biomolecules»

Biotechnology Progress, 20, 2004, p 13-25

[8] – **M. Minier, M. Salmain, N. Yacoubi, L. Barbes, C. Méthivier, S. Zanna, C. M. Pradier**  
«Covalent immobilization of lysozyme on stainless steel. Interface spectroscopic characterization and measurement of enzymatic activity»  
Langmuir, 21, 2005, p 5957-5965

[9] – **G. Bélanger, M. Doré, F. Ménard, V. Darsigny**  
«Highly chemoselective formation of aldehyde enamines under very mild reaction conditions»  
Journal of Organic Chemistry, 71, 2006, p 7481-7484

[10] – **G. Stork, A. Brizzolara, H. Landesman, J. Szmuszkovicz, R. Terrell**  
«The enamine alkylation and acylation of carbonyl compounds»  
Journal of the American Chemical Society, 85, 1963, p 207-222

[11] – **W. A. White, H. Weingarten**  
«A versatile new enamine synthesis»  
Journal of Organic Chemistry, 32, 1967, p 213-214

[12] – **J. March**  
«The addition of amines to aldehydes and ketones»  
Advanced organic chemistry, Third edition, Willey intersciences, chapitre 6-14, p 796

[13] – **B. Yan, W. Li**  
«Rapid fluorescence determination of the absolute amount of aldehyde and ketone groups on resin supports»  
Journal of Organic Chemistry, 62, 1997, p 9354-9357

[14] – **J. Vazquez, F. Albericio**  
«A useful and sensitive color test to monitor aldehydes on solid-phase»  
Tetrahedron Letters, 42, 2001, p 6691-6693

[15] – **Y. Xing, E. Borguet**  
«Specificity and sensitivity of fluorescence labelling of surface species»



Langmuir, 23, 2007, p 684-688

[16] – **J. J. Cournoyer, T. Kshirsagar, P. P. Fantauzzi, G. M. Figliozi, T. Makdessian, B. Yan**  
«Color test for the detection of resin-bound aldehyde in solid-phase combinatorial synthesis»  
Journal of Combinatorial Chemistry, 4, 2002, p 120-124

[17] – **S. K. Shannon, G. Barany**  
«Colorimetric monitoring of solid-phase aldehydes using 2,4-Dinitrophenylhydrazine»  
Journal of Combinatorial Chemistry, 6, 2004, p 165-170

[18] – **S. E. Kakabakos, P. E. Tyllianakis, G. P. Evangelatos, D. S. Ithakissios**  
«Measurement of the reactive and available solid-supported carboxylic, *N*-hydroxysuccinylated carboxylic, and aldehyde groups»  
Applied Biochemistry and Biotechnology, 56, 1996, p 95-109

[19] – **J. Boratyński, T. Żal**  
«Colorimetric micromethods for glutaraldehyde determination by means of phenol and sulphuric acid or phenol and perchloric acid»  
Analytical Biochemistry, 184, 1990, p 259-262

[20] – **R. Couturier, P. Michalon, MF. Hacques, G. Favre-Bonvin, L. Grasset, C. Marion**  
«Determination of aldehyde groups bound to nylon»  
Analysis, 19, 1991, p 315-318

[21] – **M. C. Lee, T. H. Ho, C. S. Wang**  
«Synthesis of tetrafunctional epoxy resins and their modification with polydimethylsiloxane for electronic application»  
Journal of Applied Polymer Science, 62, 1996, p 217-225

[22] – **T. Sato, H. Suzuki**  
«Preparation of tetrakisphenol derivatives by condensation of phenols with dialdehydes»  
Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 11080060, 1999, Heisei

[23] – **G. E. Anthon, D. M. Barrett**

«Comparaison of three colorimetric reagents in the determination of methanol with alcohol oxidase. Application to the assay of pectin methylesterase»

Journal of agricultural and food chemistry, 52, 2004, p 3749-3753

[24] – **R. Peters, J. Hellenbrand, Y. Mengerink, Sj. Van der Wal**

«On-line determination of carboxylic acids, aldehydes, and ketones by high-performance liquid chromatography-diode array detection-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry after derivatization with 2-nitrophenylhydrazine»

Journal of Chromatography A, 1031, 2004, p 35-50

[25] – **G. Zurek, U. Karst**

«Microplate photometric determination of aldehydes in disinfectant solutions»

Analytica Chimica Acta, 351, 1997, p 247-257

[26] – **G. Avigad**

«A simple spectrophotometric determination of formaldehyde and other aldehydes: Application to periodate-oxidized glycol systems»

Analytical Biochemistry, 134, 1983, p 499-504

[27] – **K. S. Siow, L. Britcher, S. Kumar, H. J. Griesser**

«Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization-A review»

Plasma Processes and polymers, 3, 2006, p 392-418

[28] – **F. Arefi-Khonsari, M. Tatoulian, N. Shahidzadeh, J. Amouroux**

«Study of the plasma treated polymers and the stability of the surface properties»

R. d'Agostino, Plasma Processing of Polymers, 1997, Kluwer Academic Publishers, Printed in the Netherlands, p 165-207

[29] – **P. Appendini, J. H. Hotchkiss**

«Immobilization of lysozyme on food contact polymers as potential antimicrobial films»

Packaging Technology and Science, 10, 1997, p 271-279

[30] – **K. Muramatsu, T. Masuoka, A. Fujisawa**

«In vitro evaluation of the heparin-coated Gyro C1E3 blood pump»

Artificial Organs, 25, 2001, p 585-590

[31] – **S. Alvarez-Blanco, S. Manolache, F. Denes**

«Synthesis of polyaniline using horseradish peroxidase immobilized on plasma-functionalized polyethylene surfaces as initiator»

Journal of Applied Polymer Sciences, 88, 2003, p 369-379

[32] – **Y. C. Tyan, J. D. Liao, S. B. Jong, P. C. Liao, M. H. Yang, Y. W. Chang, R. Klauser, M. Himmelhaus, M. Grunze**

«Characterization of trypsin immobilized on the functionable alkylthiolate self-assembled monolayers: A preliminary application for trypsin digestion chip on protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry»

Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 16, 2005, 135-142

[33] – **A. Bossi, L. Guizzardi, M. R. D'Acunto, P. G. Righetti**

«Controlled enzyme-immobilisation on capillaries for microreactors for peptide mapping»

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378, 2004, p 1722-1728

[34] – **L. Stryer**

«Biochemistry»

International Student Edition, Third Edition, 1988

[35] – <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do>

[36] – **E. T. Kang, K. L. Tan, K. Kato, Y. Uyama, Y. Ikada**

«Surface modification and functionalization of polytetrafluoroethylene films»

Macromolecules, 29, 1996, p 6872-6879

[37] – **Q. Chen, L. Dai, M. Gao, S. Huang, A. Mau**

«Plasma activation of carbon nanotubes for chemical modification»

Journal of Physical Chemistry B, 105, 2001, p 618-622

[38] – **B. Olander, A. Wirsén, A. C. Albertsson**

«Silicone elastomer surface functionalized with primary amines and subsequently coupled with heparin »

Biomacromolecules, 4, 2003, p 145-148

[39] – **N. Jentoft, D. G. Dearborn**

«Labelling of proteins by reductive methylation using sodium cyanoborhydride»

Journal of Biological Chemistry, 254, 1979, p 4359-4365

[40] – **K. Saal, V. Sammelseg, A. Löhmus, E. Kuusk, G. Raidaru, T. Rken, A. Rinken**

«Characterization of glucose oxidase immobilization onto mica carrier by atomic force microscopy and kinetic studies»

Biomolecular Engineering, 19, 2002, p 195-199

[41] – <http://www.lasurface.com>

[42] – **O. Cavalleri, G. Gonella, S. Terreni, M. Vignolo, P. Pelori, L. Floreano, A. Morgante, M. Canepa, R. Rolandi**

«High resolution XPS of the S<sub>2p</sub> core level region of the L-cysteine / gold interface»

Journal of Physics: Condensed Matter, 16, 2004, p S2477-S2482

[43] – **T. M. Willey, A. L. Vance, T. Van, Buuren, C. Bostedt, L. J. Terminello, C. S. Fadley**

«Rapid degradation of alkanethiol-based self-assembled monolayers on gold in ambient laboratory conditions»

Surface Science, 576, 2005, p 188-196

[44] – **N. Brack, R. Lamb, D. Pham, P. Turner**

«XPS and SIMS investigation of covalently bound lipid on the wool fibre surface»

Surface and Interface Analysis, 24, 1996, p 704-710

[45] – **D. Zerulla, T. Chassé**

«X-ray induced damage of self-assembled alkanethiols on gold and indium phosphide»

Langmuir, 15, 1999, p 5285-5294

[46] – **C. C. Barrias, M. C. L. Martins, M. C. Sá Miranda, M. A. Barbosa**

«Adsorption of a therapeutic enzyme to self-assembled monolayers: effect of surface chemistry and solution pH on the amount and activity of adsorbed enzyme»

Biomaterials, 26, 2005, p 2695-2704

[47] – **T. M. Blättler, S. Pasche, M. Textor, H. J. Griesser**

«High salt stability and protein resistance of poly (L-lysine)-g-poly (ethylene glycol) copolymers covalently immobilized via aldehyde plasma polymer interlayers on inorganic and polymeric substrates»

Langmuir, 22, 2006, p 5760-5769

[48] – **Y. C. Tyan, J. D. Liao, S. B. Jong, P. C. Liao, M. H. Yang, Y. W. Chang, R. Klauser, M. Himmelhaus, M. Grunze**

«Characterization of trypsin immobilized on the functionable alkylthiolate self-assembled monolayers: A preliminary application for trypsin digestion chip on protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry »

Journal of Materials in Medicine, 16, 2005, p 135-142

[49] – **F. Yi, Q. Li, Z. X. Guo, J. Yu**

«Immobilization of soluble eggshell membrane protein on polyethylene film surface: effect on the culture of NIH3T3 in vitro»

Journal of Applied Polymer Science, 99, 2006, p 1340-1345

[50] – **H. Gappa-Fahlenkamp, X. Duan, R. S. Lewis**

«Analysis of immobilized L-cysteine on polymers»

Journal of Biomedical Materials Research, Part A, 71, 2004, p 519-527

[51] – **A. K. Singh, A. W. Flounders, J. V. Volponi, C. S. Ashley, K. Wally, J. S. Schoeniger**

«Development of sensors for direct detection of organophosphates. Part I: Immobilization, characterization and stabilization of acetylcholinesterase and organophosphate hydrolase on silica supports»

Biosensors & Bioelectronics, 14, 1999, p 703-713

[52] – **M. Nouaimi, K. Möschel, H. Bisswanger**

«Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers»

Enzyme and Microbial Technology, 29, 2001, p 567-574

[53] – **H. H. P. Yiu, P. A. Wright, N. P. Botting**

«Enzyme immobilisation using siliceous mesoporous molecular sieves»

Microporous and Mesoporous Materials, 44-45, 2001, p 763-768

[54] – **A. M. Azevedo, V. Vojinović, J. M. S. Cabral, T. D. Gibson, L. P. Fonseca**

«Operational stability of immobilised horseradish peroxidase in mini-packed bed bioreactors»

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 28, 2004, p 121-128

[55] – **J. M. Goddard, J. N. Talbert, J. H. Hotchkiss**

«Covalent attachment of lactase to low-density polyethylene films»

Journal of Food Science, 72, 2007, p E36-E41

[56] – **K. Yamada, T. Nakasone, R. Nagano, M. Hirata**

«Retention and reusability of trypsin activity by covalent immobilization onto grafted polyethylene plates»

Journal of Applied Polymer Science, 89, 2003, p 3574-3581

[57] – **F. C. Loh, K. L. Tan, E. T. Kang, K. Kato, Y. Uyama, Y. Ikada**

«XPS characterization of surface functionalized electroactive polymers»

Surface and Interface Analysis, 24, 1996, p 597-604

[58] – **M. G. Roig, J. B. Bello, C. Decelis, J. M. Cachaza**

«Liver alcohol-dehydrogenase immobilized in nylon tubing – (substrate) kinetic-behavior»

Polymer International, 25, 1991, p 185-196

[59] – **M. Yakup Arica, A. Denizli, B. Salih, E. Piskin, V. Hasirci**

«Catalase adsorption onto cibacron blue F3GA and Fe (III)-derivatized poly(hydroxyethyl methacrylate) membranes and application to a continuous system»

Journal of Membrane Science, 129, 1997, p 65-76

[60] – **V. M. Leloup, P. Colonna, S. G. Ring**

« $\alpha$ -Amylase adsorption on starch crystallites»

Biotechnology and Bioengineering, 38, 1991, p 127-134

[61] – **C. Mecitoğlu, A. Yemenicioğlu**

«Partial purification and preparation of bovine lactoperoxidase and characterization of kinetic properties of its immobilized form incorporated into cross-linked alginate films»

Food Chemistry, 104, 2007, p 726-733

[62] – **W. V. Bienvenut, J. C. Sanchez, A. Karmime, V. Rouge, K. Rose, P. A. Binz, D. F. Hochstrasser**

«Toward a clinical molecular scanner for proteome research: Parallel protein chemical processing before and during western blot»

Analytical Chemistry, 71, 1999, p 4800-4807

## **Chapitre IV**

**Validation de l'immobilisation covalente de  
l'enzyme par mesure de l'activité  
enzymatique**



## **Introduction**

### **I. Trypsine**

I. 1. Immobilisation et activité

I. 2. Mesure de l'activité enzymatique en phase homogène

I. 3. Etude de l'influence des conditions de réaction sur la cinétique d'hydrolyse du BAEE par la trypsine

I.3.1. Effet de la concentration de substrat

I.3.2. Effet de la température sur l'activité enzymatique

I.3.3. Effet du pH sur l'activité enzymatique

### **II. Immobilisation de la trypsine sur des surfaces de PE traité par différents plasma et mesure de son activité enzymatique**

II. 1. Dispositif expérimental utilisé pour le traitement de la surface par plasma RF basse pression

II. 2. Mesure de l'activité enzymatique de la trypsine immobilisée sur la surface de PE

II.2.1. Immobilisation de la trypsine et mesure de son activité

II.2.2. Mise au point d'un protocole de rinçage des échantillons après l'immobilisation

II.2.3. Comparaison des activités enzymatiques obtenues par différents traitements plasmas

II.2.3.1. Activité enzymatique de surfaces traitées par plasma NH<sub>3</sub>

II.2.3.2. Activité enzymatique de surfaces traitées par le mélange N<sub>2</sub>+H<sub>2</sub> plasma

II.2.3.3. Activité enzymatique de surfaces traitées par plasma allylamine

### **III. Activité enzymatique de la trypsine immobilisée sur des surfaces de PE traité par plasma NH<sub>3</sub>**

III.1. Evaluation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de la trypsine dans la solution d'incubation

III.2. Evaluation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de GA

III.3. Stabilité de l'activité enzymatique au cours des essais répétitifs

## **Conclusion**

## **Références**

## Introduction

Nous avons développé précédemment un protocole de fonctionnalisation de la surface de polyéthylène (PE) afin d'assurer l'immobilisation covalente de la trypsine:

- Introduction de fonctions amines primaires en utilisant un plasma  $\text{NH}_3$  hors équilibre
- Liaison d'un composé bifonctionnel jouant le rôle de bras espaceur (glutaraldéhyde)
- Fixation covalente de la trypsine au bras espaceur

L'objectif de la présente étude est la mise en œuvre d'un test de dosage de la trypsine immobilisée sur la surface du PE et l'évaluation de la stabilité de cette immobilisation au cours du temps.

Dans ce qui suit, nous reviendrons sur certaines propriétés de la trypsine concernant son activité enzymatique. Cette étude conduira au développement d'une méthode de dosage de cette activité par spectrophotométrie d'absorption UV. Puis dans une seconde partie, on attachera une importance particulière à l'activité de la trypsine immobilisée et à sa stabilité au cours du temps. Pour cela, nous utiliserons différents types de traitements de surface par plasmas: gaz non-polymérisables ( $\text{N}_2+\text{H}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ) et gaz polymérisable (allylamine  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ) afin de comparer, à partir des sites greffés sur le PE, l'activité enzymatique en fonction du choix du traitement plasma. La surface sera caractérisée par l'analyse XPS aux différents stades de traitement. Enfin, la stabilité de l'immobilisation sera étudiée en fonction du temps et en fonction du nombre d'essais répétitifs.

## I. Trypsine

### I. 1. Immobilisation et activité

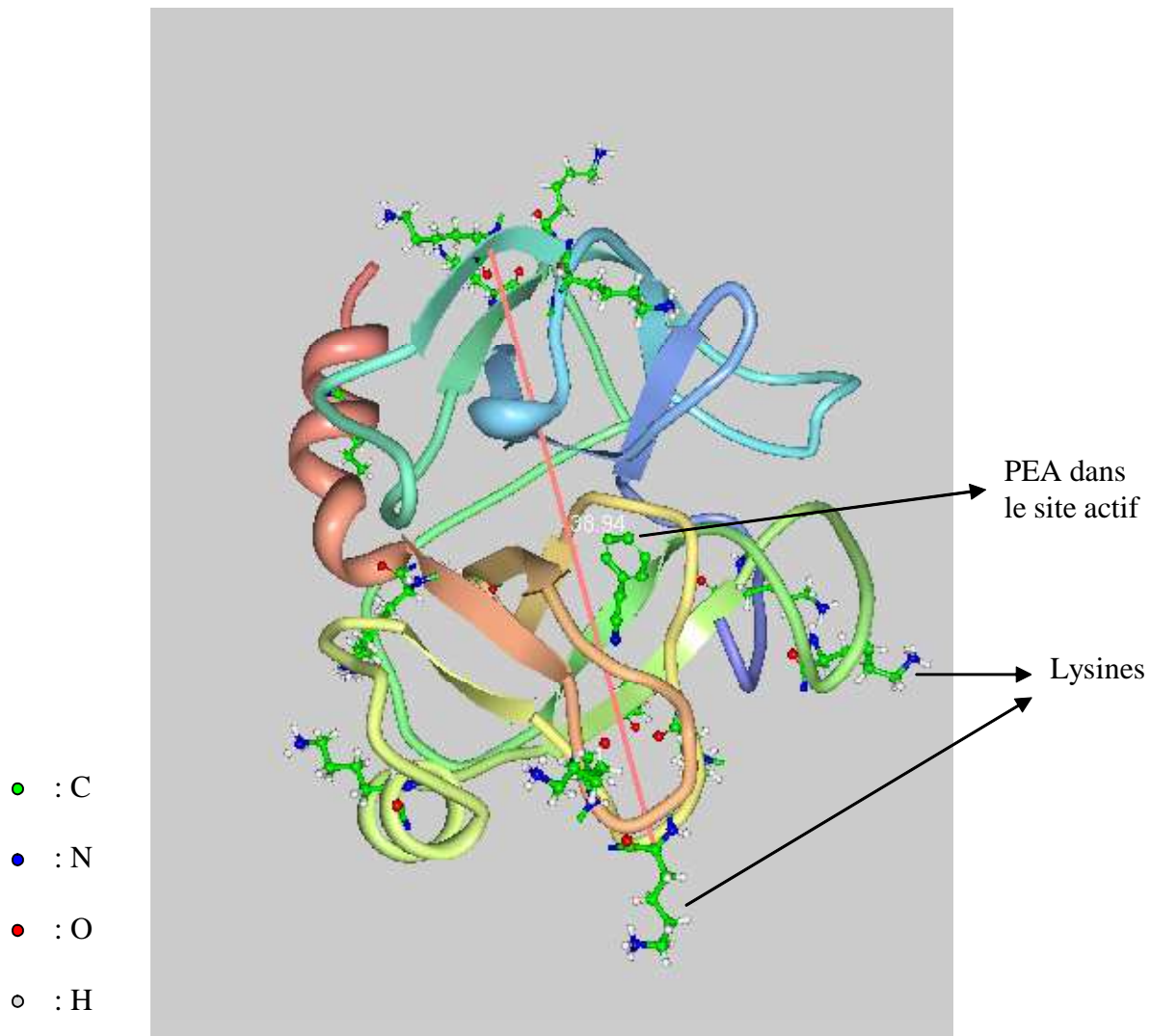
L'immobilisation de la trypsine, comme toute protéine, sur un support présente un intérêt:

- si l'enzyme conserve une activité significative après fixation,
- si sa durée d'utilisation s'en trouve augmentée: du fait de la suppression de l'auto-hydrolyse, très importante en phase homogène et du fait de la stabilisation de sa structure 3D grâce aux liaisons covalentes.

La conservation de l'activité enzymatique après l'immobilisation, dépend ainsi directement:

- du protocole de fixation: conditions d'incubation, conditions de rinçage, qui doivent respecter la structure tridimensionnelle relativement fragile de l'enzyme,
- de l'accessibilité au site réactionnel pour les substrats à convertir.

La figure IV.1. montre une vue 3D de la trypsine sur laquelle figurent, d'une part le site réactionnel, marqué par la présence de l'inhibiteur 2-phenylethylamine (PEA:  $C_6H_5-CH_2-CH_2-N^+H_3$ ) et d'autre part les résidus lysine qui sont les points de fixation potentiels de l'enzyme au support. La présence d'une fonction amine primaire à l'extrémité de chaque résidu lysine rend en effet possible la formation d'une fonction imine après réaction avec l'aldéhyde libre du GA greffé. On remarque sur la figure IV.1. que les résidus lysine sont disposés essentiellement en périphérie de la trypsine, ce qui est logique compte tenu de leur caractère hydrophile (dans ses fonctions naturelles la trypsine opère en milieux aqueux) et ce qui est favorable dans l'optique de l'engagement d'une réaction avec le GA fixé sur le support.

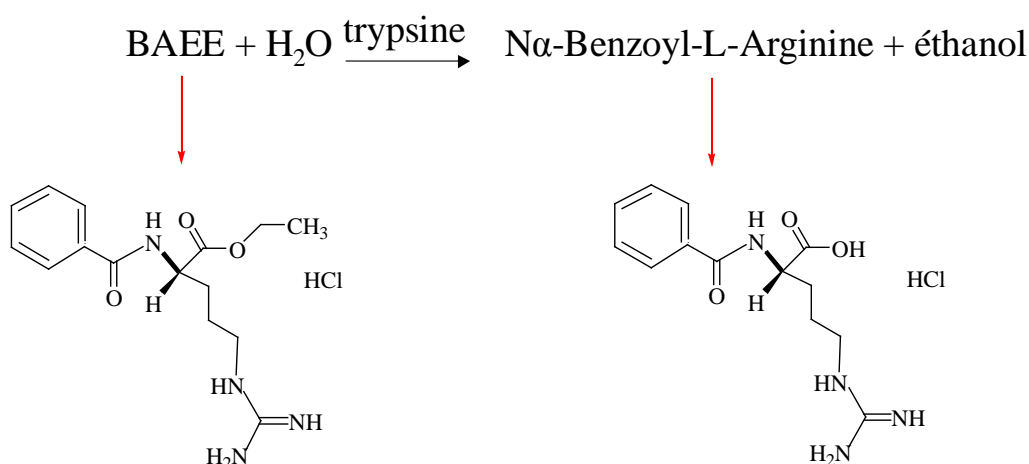


**Figure IV.1.** Structure 3 D de la trypsine; les 14 résidus lysine et le PEA; référence: 1UTO Protein Data Bank

Dans la mesure où on n'a pas la possibilité d'imposer ni de contrôler l'orientation de l'enzyme par rapport à la surface, on mesurera expérimentalement, après immobilisation, l'activité enzymatique présente sur les supports de PE. Différents essais d'immobilisation covalente, de physi-sorption ou chimi-sorption, accompagnés de différents protocoles de lavage / rinçage seront réalisés et comparés en terme d'activité de la surface d'une part juste après fixation et d'autre part, au cours du temps, afin d'estimer la stabilité de cette activité.

## I. 2. Mesure de l'activité enzymatique en phase homogène

Pour déterminer l'activité enzymatique de la trypsine pancréatique bovine (Réf. T 1426, Sigma), nous avons appliqué une méthode standard utilisant un substrat synthétique: le *N*- $\alpha$ -Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester <sup>[1]</sup> (BAEE, HCl Réf. B 4500, Sigma). On a vu au Chapitre III que la trypsine possédait la particularité de couper spécifiquement les liaisons amides (liaisons peptidiques) et esters, situées du côté carboxylique des résidus lysine et arginine. C'est cette activité «esterase» qui est exploitée dans la méthode au BAEE, présentée ci-dessous:



**Figure IV.II.** Réaction du *N*- $\alpha$ -Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester (BAEE) en présence de la trypsine

On mesure donc la vitesse d'hydrolyse de ce substrat (formation de *N*- $\alpha$ -Benzoyl-L-Arginine) au cours du temps en suivant l'augmentation de la densité optique (DO) à 253 nm.

L'unité d'activité enzymatique mesurée selon cette méthode (Référence Sigma) est définie comme égale à la quantité d'enzyme qui produit une variation de densité optique de 0,001 DO / min à 253 nm avec le substrat BAEE à pH 7,6 et à température ambiante au cours d'une réaction effectuée dans un volume total de 3,20 ml (3 ml de solution de BAEE et 0,20 ml d'échantillon contenant la trypsine).

Protocole opératoire selon la méthode sigma:

- préparation d'une solution tampon phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) à 67 mM et ajout de soude ( $\text{NaOH}$ ) jusqu'à atteint un pH=7,6

- élaboration de la solution du substrat (BAEE) à 0,25 mM dans la solution tampon
- préparation d'une solution d'HCl à 0,001 M
- préparation de 3,5 mg de la poudre de trypsine dans 100 ml de la solution HCl

La solution ainsi préparée contient environ 500 U/ml, la poudre de trypsine utilisée (lot Sigma n° 121k7692) possédant une activité spécifique de 14100 U/mg de trypsine selon le fournisseur. La vérification de la valeur de l'activité enzymatique de la trypsine par la méthode au BAEE a été réalisée après chaque changement de lot.

La densité optique a été mesurée grâce à un spectromètre UV/visible (UVIKON 860) toutes les 5 secondes dans une cuve de quartz contenant 3 ml de la solution de substrat et 0,2 ml de la solution d'enzyme. La solution de trypsine (0,2 ml) est ajoutée au temps  $t=0$  puis après une brève agitation, on mesure la densité optique (DO) de cette solution. Le substrat BAEE seul, en présence de 0,2 ml de solution d'HCl (sans la trypsine), a été choisi comme référence afin de comparer l'évolution de sa densité optique avec celle de la solution contenant l'enzyme.

### I. 3. Etude de l'influence des conditions de réaction sur la cinétique d'hydrolyse du BAEE par la trypsine

Pour évaluer l'influence des conditions de réaction sur la mesure de l'activité enzymatique de la trypsine en phase homogène, une série d'expériences a été réalisée en faisant varier la concentration du substrat (BAEE), le pH et la température. L'ensemble de ces paramètres nous permet de présenter un protocole optimal de dosage de la trypsine immobilisée sur la surface de polyéthylène.

#### I.3.1. Effet de la concentration de substrat

Une enzyme en phase homogène en présence d'un substrat en concentration non inhibitrice, suit généralement la loi cinétique de Michaëlis - Menten rappelée ci-dessous:

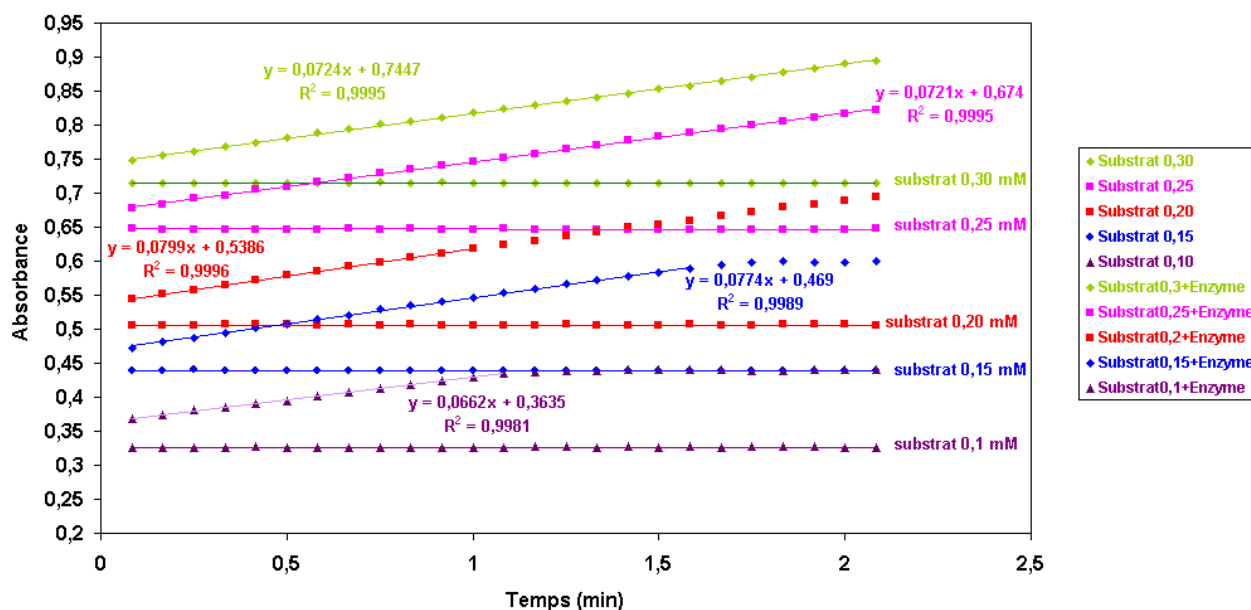
$$V = V^{\text{Max}} C_S / (K_M + C_S) = k_{\text{cat}} E_0 C_S / (K_M + C_S)$$

Expression dans laquelle  $C_S$  représente la concentration du substrat;  $K_M$  la constante d'affinité et  $k_{\text{cat}}$  la constante catalytique de l'enzyme pour ce substrat;  $E_0$  la concentration d'enzyme.

$V^{\text{Max}}$  est égale à la vitesse maximale de conversion du substrat lorsque ce dernier est en quantité suffisante pour ne pas limiter la cinétique réactionnelle ( $C_S \gg K_M$ ). On est alors en condition de "substrat saturant" et la vitesse mesurée est proportionnelle à la concentration d'enzyme.

Ainsi, pour quantifier la présence d'une enzyme via la mesure de son activité, on doit s'assurer que la réaction se déroule dans de telles conditions de saturation, afin que la cinétique mesurée soit proportionnelle à la quantité d'enzyme, et ne dépende pas de la concentration de substrat, qui de plus est variable en fonction de l'avancement de la réaction.

Afin de connaître la dépendance de l'activité enzymatique de la trypsine vis à vis de la concentration du substrat, nous avons effectué une série de mesures selon le protocole décrit ci-dessus. Pendant cette étude la température a été mesurée dans chaque cuve-réacteur à la sortie du spectrophotomètre. La Figure IV.3. montre l'influence des différentes concentrations initiales de substrat sur l'activité enzymatique.



**Figure IV.3.** Evolution de l'absorbance en fonction de temps pour les substrats 0,1 mM (T=22°C), 0,15 mM (T=23°C), 0,20 mM (T=25°C), 0,25 mM (T=23°C) et 0,30 mM (T=23,5°C) mesuré par spectrophotomètre UVIKON, cuve quartz ( $V_T=3,20$  ml,  $C=3,19$  mg trypsine / 100 ml)

On observe les résultats suivants:

- Les références (solutions du substrat BAEE seul) ne montrent pas de variation de DO significative pendant le temps d'observation (environ 2 minutes),
- Au contraire, en présence de trypsine, on observe une augmentation linéaire de la densité optique, traduisant l'apparition du produit de la réaction, le N- $\alpha$ -benzoyl-L-arginine,
- Les différentes pentes mesurées sont toutes proches de  $0,073 \pm 0,007$  DO/min, les variations existant entre elles semblant être dues à une variation de température plutôt qu'à la différence des concentrations de substrat initiales. En effet les deux pentes les plus extrêmes 0,0662 respectivement 0,0799 DO/min correspondent à la température la plus basse (22°C) respectivement, la plus haute (25 °C). Une étude dédiée à l'influence de la température sera présentée dans un paragraphe suivant.



De cette étude sur la concentration de substrat, nous concluons qu'au moins dès la concentration de 0,15 mM, la saturation est atteinte. On peut noter que la méthode Sigma recommande une solution standard à 0,25 mM de substrat BAEE, ce qui est en accord avec les résultats présentés ci-dessus.

A partir de la pente obtenue pour la solution standard de BAEE à 0,25 mM en présence de l'enzyme, on peut calculer l'activité spécifique de la trypsine c'est à dire le nombre d'unités d'activité par milligramme de poudre du lot de trypsine utilisé. Cette valeur est égale à 11250 U/mg.

### I.3.2. Effet de la température sur l'activité enzymatique

A partir des résultats précédents, nous avons observé que la température exerçait une influence sur l'activité enzymatique de la trypsine. Il est donc nécessaire d'en préciser l'importance.

L'activité enzymatique sur solution de BAEE à 0,25 mM a été déterminée pour différentes températures selon le protocole Sigma. Le tableau IV.1. présente l'évolution de l'activité enzymatique en fonction de la température et souligne qu'une variation de seulement 0,5 °C se traduit par une modification mesurable de l'activité enzymatique.

T (°C)	A * (DO / min)
15	0,0346
17	0,042
18,5	0,0488
20	0,0603
23	0,0721
23,5	0,0742
25	0,0855
26	0,0868
27,5	0,0985
28,5	0,1185
29,5	0,1216
35,5	0,1716
38	0,2006
39	0,2088

\* A désigne la pente des droites DO fonction du temps à différentes températures

**Tableau IV.1.** Evolution de l'activité enzymatique de la trypsine en fonction de la température

L'exploitation des résultats selon la relation d'Arrhénius permet de déterminer l'énergie d'activation de la réaction enzymatique:

$$K_{cat} = C \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}}$$

avec C: constante

T: température (°K)

R: constante des gaz parfaits (8,31 J/mol/°K)

E<sub>a</sub>: énergie d'activation de la réaction (J/mol)

$$\frac{-E_a}{R} = -6611,7 \text{ K} \quad (\text{Figure IV.4.})$$

$$E_a \approx 55 \text{ kJ/mol}$$

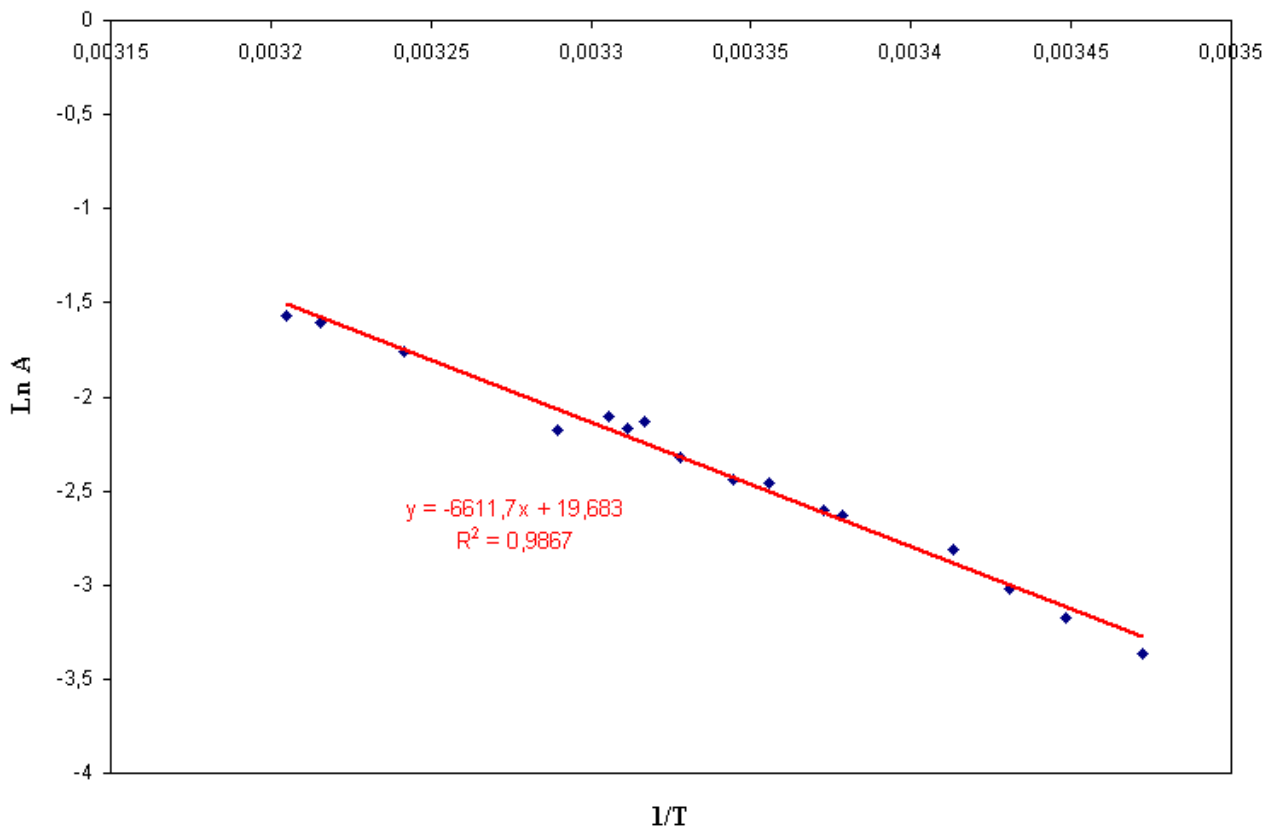
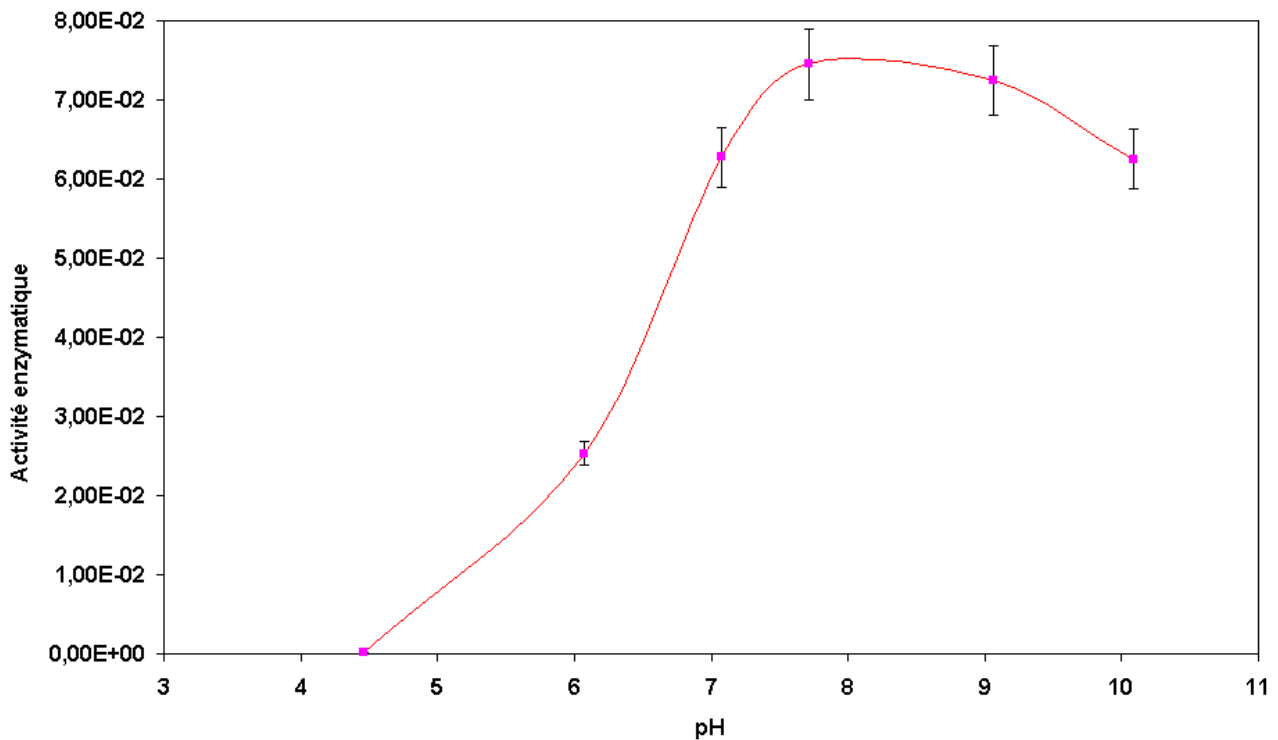


Figure IV.4. Evolution de Ln A en fonction de 1/T

### I.3.3. Effet du pH sur l'activité enzymatique

L'évolution de l'activité enzymatique de la trypsine en fonction du pH révèle une courbe en cloche faisant apparaître une zone de pH optimal. L'activité enzymatique croît avec l'augmentation de pH de la solution du substrat jusqu'à pH 7,6 puis l'activité reste plus ou moins stable jusqu'à pH 9. Au delà de cette zone, l'activité semble à nouveau décroître progressivement.



**Figure IV.5.** Variation de l'activité enzymatique de la trypsine en fonction du pH des différentes solutions de substrat BAEE

## II. Immobilisation de la trypsine sur des surfaces de PE traité par différents plasma et mesure de son activité enzymatique

En général l'immobilisation des enzymes leur confère les caractéristiques suivantes:

- augmentation de leur stabilité dans le temps,
- élargissement du domaine d'utilisation vis à vis des conditions de température et de pH,
- facilité de séparation en vue d'une réutilisation,
- possibilité de mise en œuvre de procédés continus

De plus, pour les protéases, l'immobilisation évite, ou limite, l'autolyse qui existe en solution.

Ainsi il a été montré que l'immobilisation covalente de la trypsine sur un gel à base d'oxyde de silicium conduisait à une meilleure résistance aux changements de pH et de température ainsi qu'à une plus grande stabilité dans le temps en comparaison avec la trypsine en solution [2].

Dans ce qui suit, nous abordons plus particulièrement la mesure de l'activité enzymatique de la trypsine immobilisée sur une surface de PE. Précédemment nous avons montré que le plasma d'ammoniac était efficace pour le greffage de fonctions amines primaires à la surface du polyéthylène. Cependant la densité de ces fonctions est restée relativement faible alors que d'autres méthodes de fonctionnalisation rapportées dans la littérature font état de densités bien supérieures (cf Chapitre I).

Afin d'accroître la quantité d'amines primaires et de comparer son influence sur l'activité enzymatique immobilisée, différents types de plasma ont été choisis: des gaz non-polymérisables ( $N_2+H_2$ ,  $NH_3$ ) et un gaz polymérisable (allylamine  $CH_2=CH-CH_2-NH_2$ ). Les fonctions amines primaires incorporées par chaque traitement plasma sur les films de PE ont ensuite été liées au glutaraldéhyde (GA), jouant le rôle de bras espaceur, comme déjà décrit précédemment. Enfin, la dernière étape a consisté à l'immobilisation covalente de la trypsine, dont nous avons mesuré, par la suite, l'activité enzymatique.

## II. 1. Dispositif expérimental utilisé pour le traitement de la surface par plasma RF basse pression

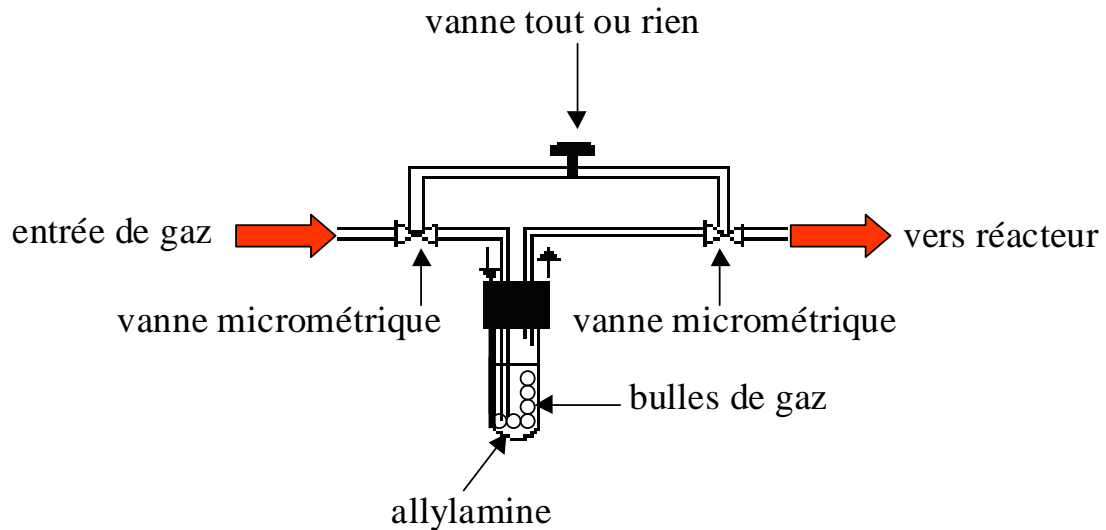
Le dispositif expérimental utilisé précédemment pour la fonctionnalisation de la surface de polyéthylène (cf. chapitre II) peut recevoir différents types de gaz <sup>[3,4]</sup>. Nous l'avons mis en oeuvre de façon similaire avec l'ammoniac <sup>[5]</sup> et le mélange azote / hydrogène <sup>[6]</sup>.

Les paramètres opératoires utilisés pour le traitement de films de polyéthylène par plasma RF hors équilibre d'ammoniac et de mélange azote / hydrogène sont résumés dans le tableau suivant.

Gaz	N <sub>2</sub> + H <sub>2</sub>	NH <sub>3</sub>
Débit de gaz	N <sub>2</sub> : 55 cm <sup>3</sup> /min H <sub>2</sub> : 165 cm <sup>3</sup> /min	175 cm <sup>3</sup> /min
Pression	1 mbar	1,5 mbar
Puissance plasma	40 W	40 W
Temps de traitement	2 s	2 s

**Tableau IV.2.** Conditions opératoires retenues pour le traitement par plasma d'ammoniac et de mélange azote / hydrogène

Pour le dépôt d'allylamine <sup>[7,8]</sup> (CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) par plasma, le dispositif expérimental exige d'introduire le précurseur allylamine sous forme vapeur dans le réacteur. Le système choisi consiste à entraîner par un flux d'argon la vapeur produite par bullage dans le réservoir qui contient le précurseur (l'envoi d'un flux d'argon dans le réservoir entraîne un bullage régulier et sous forme de vapeur de monomère vers le réacteur au niveau de l'électrode creuse). Afin d'éviter la condensation du monomère avant son arrivée dans le réacteur, des rubans chauffants entourent le tube d'alimentation vapeur / précurseur.



**Figure IV.6.** Système de l'introduction d'allylamine sous forme vapeur

Dans les films de PE traités sont découpés des disques de diamètre 2,4 cm sur lesquels seront réalisées les fixations successives du glutaraldéhyde et de la trypsine.

Point d'ébullition (°C)	55-58
Point de fusion (°C)	-88
Tension de vapeur à 20°C	26,4 kPa
Température d'auto inflammation (°C)	370
Densité relative (eau=1)	0,76

**Tableau IV.3.** Caractérisation physique de l'allylamine (amino-3 propène)

(cette substance doit être manipulée avec précautions, car elle réagit violemment en présence d'oxygène)

## II. 2. Mesure de l'activité enzymatique de la trypsine immobilisée sur la surface de PE

### II.2.1. Immobilisation de la trypsine et mesure de son activité

L'immobilisation de la trypsine est réalisée suivant le protocole décrit au chapitre III paragraphe II. 2. On présentera plus en détail les différentes méthodes de lavage / rinçage des échantillons (disques de PE fonctionnalisés) mises en œuvre pour éliminer les enzymes faiblement liées au support.

Après incubation des échantillons dans une solution de trypsine 1 g/l, on rince les disques selon le protocole (b) mentionné ci-dessous:

- tampon phosphate (pH=7,6) à 0,1 M pendant environ une heure (chaque 30 min, la solution de tampon est changée et les échantillons sont rincés et agités à nouveau pendant 30 min)
- Lavage des échantillons par une solution de détergent pendant 10 min en agitant. Différentes solutions ont été comparées: tampon phosphate, guanidine.HCl <sup>[9,10]</sup> (5 M ou 2 M préparée dans l'eau), tween 20 <sup>[11-12]</sup> (0,1 ml de tween dans 100 ml de tampon phosphate 0,1M).
- Rinçage final de tous les échantillons avec la solution tampon phosphate pH=7,6 pendant 20 min (chaque 10 min, la solution de tampon est changée).
- séchage à l'air

Nous avons mesuré l'activité enzymatique des disques de PE soit juste après le rinçage, soit après quelques jours en gardant les échantillons à secs dans le réfrigérateur, selon le protocole ci-dessous:

- Préparation du substrat BAEE à 0,25 mM dans le tampon phosphate à 67 mM
- Placer les disques dans les réacteurs en verre, puis ajouter à l'instant  $t = 0$ , 3 ml de cette solution de BAEE.
- Prélèvement (1 ml) dans le réacteur à différents temps, mesure de la DO et recyclage du prélèvement dans le réacteur. La fréquence de prélèvement est généralement de 40 minutes. L'expérience est poursuivie pendant un temps suffisamment long pour obtenir un changement

significatif de la DO par rapport à la première mesure: durée généralement comprise entre 2 et 3 heures.

- Les disques sont alors retirés du réacteur afin de mesurer une éventuelle évolution de la DO de la solution de BAEE en leur absence: la stabilité de la densité optique durant cette deuxième phase de l'expérience (environ 2 heure) est la preuve d'une immobilisation réussie; une continuité dans l'augmentation de la DO est au contraire le signe d'une activité en solution due au relargage de la trypsine de la surface de PE.

Il est important de noter que cette étude du relargage permet de vérifier la solidité de l'ensemble disque PE + enzyme. Lorsqu'on détecte une activité enzymatique en solution, on suppose que certaines liaisons chimiques ont été cassées, sans pouvoir préciser si cela témoigne d'une dégradation au niveau du polymère traité ou bien d'une rupture du bras espaceur.

Afin de s'assurer de la pertinence de l'observation de l'évolution de la densité optique au cours du temps, nous avons effectué les tests de contrôles suivants:

- Cinétique d'évolution du substrat seul pendant le temps de manipulation (référence).
- Cinétique en présence de PE non traité et de PE traité par plasma sans GA et sans enzyme afin de connaître les éventuelles réactions de la surface de PE avec la solution de BAEE.
- Cinétique en présence de PE non traité + glutaraldéhyde, de PE traité par plasma + glutaraldéhyde et de PE traité + glutaraldéhyde + NaCNBH<sub>3</sub>, afin de connaître les éventuelles interactions entre le BAEE et les fonctions aldéhydes fixées ou adsorbées.
- Cinétique en présence de PE non traité + enzyme (PT)\*, de PE traité + enzyme (PPT)\* et de PE traité + enzyme + NaCNBH<sub>3</sub> (PPTR)\* afin de mesurer l'activité enzymatique de la trypsine fixée en surface sans l'intermédiaire du bras espaceur glutaraldéhyde: c'est à dire adsorbée ou liée à des fonctions non déterminées de la surface de PE traitée par plasma.

Notons que toutes les étapes de traitement subies par les échantillons ont été standardisées (plasma NH<sub>3</sub>, GA, enzyme).

\* Nous utiliserons dans la suite un code pour caractériser les disques de PE selon les traitements subis. Avec une lettre par étape: P pour Polyéthylène, PP pour Polyéthylène traité Plasma, G pour glutaraldéhyde, T pour incubation avec la Trypsine et R pour Réduction par NaCNBH<sub>3</sub>.



L'unité d'activité enzymatique immobilisée sur la surface a été calculée à partir de la différence entre la pente de l'échantillon et celle de la solution BAEE (référence). L'unité d'activité définie dans le protocole Sigma est basée sur une vitesse de réaction (DO / minute) mesurée dans un volume réactionnel de 3,2 ml; nous appliquons donc la formule ci-dessous pour exprimer en unité Sigma nos mesures faites dans un volume réactionnel de 3 ml:

$$A = 3/3,20 * 10^3 * DO / \text{min} \quad (\text{Unité Sigma})$$

### II.2.2. Mise au point d'un protocole de rinçage des échantillons après l'immobilisation

Afin d'optimiser l'étape de rinçage après l'immobilisation de la trypsine, deux protocoles de rinçage des échantillons ont été comparés. Le premier choisi (a) consiste en un rinçage en 3 étapes: solution tampon, solution de détergent et finalement solution tampon. Le deuxième protocole (b) est celui présenté en détail au paragraphe précédent, correspondant à une augmentation de nombre des étapes de rinçage. Cette étude a été réalisée dans le but de ne mesurer que l'activité des enzymes liées fortement au support (liaisons covalentes) après élimination de celles adsorbées non spécifiquement. C'est pour cette même raison que différents composés connus pour leurs propriétés désorbantes <sup>[9-12]</sup> (le tensio-actif Tween 20, la guanidine) ont également été testés (cf paragraphe suivant). La figure IV.7. présente la comparaison de l'activité enzymatique mesurée pour ces deux protocoles de rinçage avec des échantillons de type PPGTR provenant d'une même série plasma, c'est à dire obtenus à partir d'un même film de PE traité par plasma.

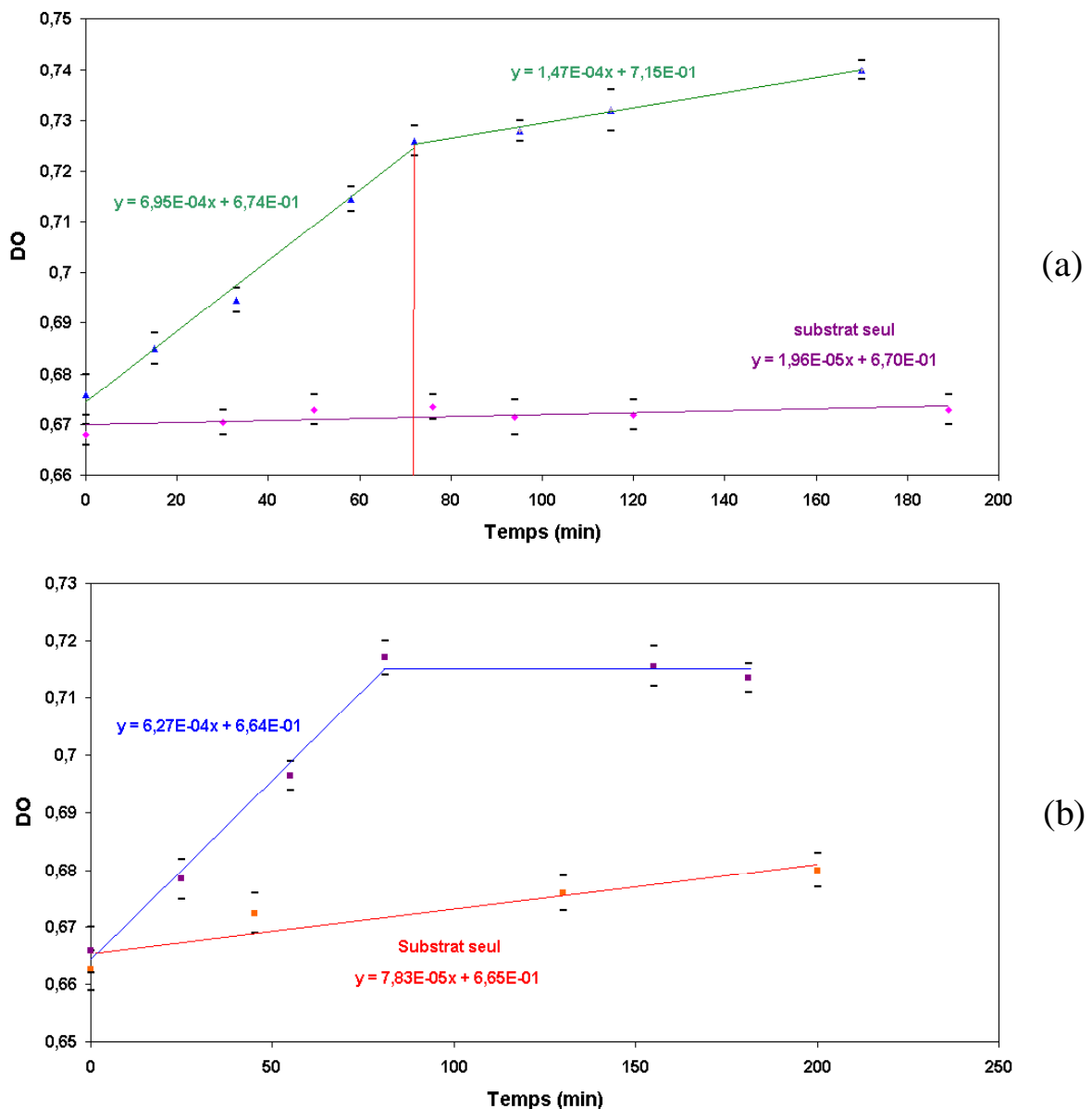
On observe que l'augmentation du nombre des étapes de rinçage (protocole b) supprime le relargage de la trypsine observé avec le protocole (a).

Nous avons aussi constaté pour les tests de contrôle (échantillons n'ayant pas subis l'incubation avec la trypsine ou encore échantillons de type PT et PPT) une diminution des interférences avec la solution BAEE: c'est à dire que l'augmentation de la DO au cours du temps observée avec ces échantillons devient nulle ou non significative avec le protocole de rinçage (b).

On doit remarquer que, dans tout ce travail, nous avons été confronté à la mesure de variations de densité optique relativement faibles alors même que les solutions sans enzyme - substrat seul (BAEE) ou PE non traité + BAEE par exemple - pouvaient évoluer au cours du temps, de façon plus ou moins importante selon les expériences. Nous avons donc dû estimer une "variation minimum" de DO traduisant un effet enzymatique significatif. En considérant les différentes expériences réalisées, nous avons estimé cette pente minimum à  $10^{-4}$  DO / min, ce qui

correspond à une mesure de variation de DO de  $6 \cdot 10^{-3}$  en une heure d'expérience, ou encore à une activité  $A = 2 \cdot 10^{-2}$  Unité /  $\text{cm}^2$ . En résumé, en dessous de cette valeur, nous avons jugé qu'on ne pouvait pas affirmer de façon certaine la présence d'une activité enzymatique significative sur les échantillons de PE.

Pour les échantillons traités par plasma allylamine et  $\text{N}_2+\text{H}_2$ , le même effet de rinçage a été constaté. En conséquence pour la suite de notre étude, le protocole de rinçage (b) a été choisi pour tous les échantillons.



**Figure IV.7.** Effet de l'augmentation de nombre de rinçage sur l'activité enzymatique de deux échantillons de type PPGTR provenant d'une même série plasma  $\text{NH}_3$ : rinçage en 3 étapes (a) et rinçage en 5 étapes (b)

### II.2.3. Comparaison des activités enzymatiques obtenues par différents traitements plasma

#### II.2.3.1. Activité enzymatique de surfaces traitées par plasma $\text{NH}_3$

Le calcul de l'activité enzymatique par unité de surface de support permet de mettre en évidence l'efficacité de l'immobilisation en fonction des étapes de fonctionnalisation ou des types de rinçage effectués (cf tableau IV.4) :

- L'activité enzymatique des échantillons de type PPGTR ayant subi les quatre étapes : traitement par plasma, fixation de GA, immobilisation de la trypsine et réduction par  $\text{NaCNBH}_3$ , est la plus élevée et est, en particulier, supérieure à celle des échantillons n'ayant pas subi l'étape de la réduction (PPGT).
- Les activités enzymatiques des échantillons rincés avec la solution de tampon ou avec la solution de tween sont identiques.
- L'activité des échantillons rincés avec la solution de guanidine reste toujours très faible, inférieure au seuil de "détection significative".
- On remarque l'activité significative des échantillons PPTR ayant subi l'incubation directe PE traité par plasma + trypsine (sans l'étape glutaraldéhyde) puis la réduction par  $\text{NaCNBH}_3$ .
- Au contraire, les échantillons PPGT ayant subi le protocole d'immobilisation classique, mais sans réduction finale, montrent une faible activité qui varie entre 1,8 et 2  $\text{U}/\text{cm}^2$ .

Notons que les valeurs des incertitudes mentionnées dans le tableau correspondent à l'écart type  $\sigma_n$  calculé à partir des résultats de n échantillons différents. Cet écart type illustre la dispersion des résultats, due d'une part à la sensibilité des mesures et d'autre part à la reproductibilité des essais : reproductibilité liée au fait que les échantillons (disques PE) sont découpés en différents endroits des films de PE traités par plasma; et aussi aux possibles variations d'un traitement plasma à un autre.

Nom	Tampon (U/cm <sup>2</sup> )	Tween (U/cm <sup>2</sup> )	Guanidine (U/cm <sup>2</sup> )
PPGTR	$8,4 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-2}$ n=17	$8,1 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-2}$ n=11	$1,5 \cdot 10^{-2} \pm 0,6 \cdot 10^{-2}$ n=8
PPGT	$1,8 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-2}$ n=5	$2,2 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-2}$ n=6	$0,7 \cdot 10^{-2} \pm 0,5 \cdot 10^{-2}$ n=4
PPTR	$7,6 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-2}$ n=4	$7,8 \cdot 10^{-2} \pm 3 \cdot 10^{-2}$ n=3	0 n=4
PPT	$3,2 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-2}$ n=7	$3,1 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-2}$ n=5	$1,1 \cdot 10^{-2} \pm 0,1 \cdot 10^{-2}$ n=3

**Tableau IV.4.** Activité enzymatique d'échantillons issus de PE traité par plasma NH<sub>3</sub> (Q<sub>NH3</sub> = 175 sccm, P<sub>w</sub> = 40 W, P = 1,5 mbar, t = 2 s). Les incertitudes indiquées sont les écarts types  $\sigma_n$  calculés à partir des résultats de n essais.

Les résultats montrent l'effet important sur l'activité enzymatique produit par le NaCNBH<sub>3</sub> qui permet de réduire les fonctions imines en amines secondaires plus stables. La valeur de l'activité enzymatique passe d'environ  $2 \cdot 10^{-2}$  U/cm<sup>2</sup> (valeur non significative) pour PPGT à environ  $8 \cdot 10^{-2}$  U/cm<sup>2</sup> pour PPGTR.

La – relativement – forte activité des échantillons PPTR, qui évitent l'étape du glutaraldéhyde, nous a surpris. Nous n'avons pas de certitude quant à la nature des liaisons entre le PE traité et la trypsine: des phénomènes de physisorption comme des liaisons chimiques sont envisageables du fait, d'une part du caractère hydrophile du PE traité plasma (cf chapitre II résultats XPS) et d'autre part de la grande variété de fonctions chimiques créées en surface par le plasma. Il est également remarquable que, comme pour l'immobilisation classique avec le glutaraldéhyde, l'utilisation du réducteur NaCNBH<sub>3</sub> se révèle indispensable à la manifestation d'une activité conséquente, les échantillons PPT ayant une activité très faible d'environ 3 U/cm<sup>2</sup>.

Par la suite, afin d'essayer d'augmenter l'activité enzymatique, nous avons testé l'utilisation de ce réducteur après les deux étapes de formation d'imine: (i) après la fixation de GA sur le PE traité plasma, (ii) après l'immobilisation de la trypsine. Cependant la valeur de l'activité enzymatique dans ce cas (échantillon PPGTR) a diminué, passant à  $A = 5,2 \cdot 10^{-2} \pm 0,6 \cdot 10^{-2}$  U/cm<sup>2</sup> (n=4). On doit noter que cet essai a été réalisé avec seulement 4 échantillons (deux traitements plasma différents).

En ce qui concerne les différentes solutions de rinçage (tampon, tween, guanidine), nous avons trouvé une activité semblable dans le cas du tampon et du tween. Par contre nous avons observé une perte de l'activité enzymatique en utilisant la solution de guanidine, que ce soit à la concentration 2 M ou 5 M.

L'équipe de Mikulec <sup>[13]</sup> a constaté que la guanidine élimine complètement toute l'activité enzymatique de la trypsine immobilisée sur la surface Co-Cr-Mo. Dans le cas de protéines faiblement liées, ces auteurs proposent d'expliquer leur "décrochage" par l'affaiblissement des interactions hydrophobes avec la surface. Ils associent ce phénomène à la forte solubilité des acides aminés asparagine, glycine et tyrosine - prédominants dans la trypsine <sup>[14]</sup> - dans les solutions de guanidine 5 M <sup>[15]</sup>. Ils font également remarquer que ces trois acides aminés sont abondants à proximité du site actif de la trypsine <sup>[14,16]</sup> ce qui pourrait expliquer la dénaturation de l'enzyme par les solutions de guanidine.

On peut noter que dans le cas du rinçage avec la solution tampon, des essais ont été réalisés en remplaçant le tampon par de l'eau distillée lors de la dernière étape de rinçage, afin d'éliminer les ions sodium et hydrogénophosphate avant passage des échantillons en XPS. Les échantillons de type PPGTR ayant subi un tel rinçage final à l'eau montrent une activité faible:  $3,4 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-2}$  U/cm<sup>2</sup> (n=3).

Des expériences ont également été menées sur des échantillons de PE non traité, incubés dans la solution de trypsine. On remarque que les échantillons lavés avant incubation (lavage en 3 étapes: eau, éthanol absolu, eau) conduisent à des valeurs significativement inférieures aux échantillons bruts utilisés: échantillon lavé (2 essais)  $A = 1,2 \cdot 10^{-2} \pm 0,3 \cdot 10^{-2}$  U/cm<sup>2</sup>; échantillons non lavés (n=3 essais):  $A = 3,7 \cdot 10^{-2} \pm 0,4 \cdot 10^{-2}$  U/cm<sup>2</sup>.

### II.2.3.2. Activité enzymatique de surfaces traitées par le mélange N<sub>2</sub>+H<sub>2</sub> plasma

Nous avons également étudié l'activité enzymatique de la trypsine immobilisée sur des échantillons de PE traité par plasma N<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>.

Le tableau IV.5. montre que, comme au paragraphe précédent:

- l'activité enzymatique des échantillons rincés avec la solution de guanidine 5 M n'est pas significative ( $1,0 \cdot 10^{-2}$  U/cm<sup>2</sup>)
- pour un rinçage avec la solution tampon, l'activité enzymatique ( $4,9 \cdot 10^{-2}$  U/cm<sup>2</sup>) des échantillons PPGTR (réduits par NaCNBH<sub>3</sub>) est supérieure à celle des échantillons PPGT non réduits.
- Par contre, cette valeur de  $4,9 \cdot 10^{-2}$  U/cm<sup>2</sup> obtenue dans le cas du traitement par plasma N<sub>2</sub>+H<sub>2</sub> est plus faible que dans le cas du traitement par plasma ammoniac.

Nom	Tampon (U/cm <sup>2</sup> )	Guanidine (U/cm <sup>2</sup> )
PPGTR	$4,9 \cdot 10^{-2} \pm 5 \cdot 10^{-3}$ n=3	$1,0 \cdot 10^{-2} \pm 9 \cdot 10^{-3}$ n=3
PPGT	$3,8 \cdot 10^{-2} \pm 4 \cdot 10^{-3}$ n=3	0 n=3

**Tableau IV.5.** Activité enzymatique d'échantillons provenant de PE traité par plasma N<sub>2</sub>+H<sub>2</sub> (Q<sub>N2</sub> = 55 sccm, Q<sub>H2</sub> = 165 sccm, P<sub>w</sub> = 40 W, P = 1,0 mbar, t = 2 s); Les incertitudes indiquées sont les écarts types  $\sigma_n$  calculés à partir des résultats de n essais.

Nous pouvons conclure que dans nos conditions, un traitement par un plasma ammoniac est plus efficace, pour maximiser l'activité enzymatique immobilisée, qu'un traitement par un plasma du mélange N<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>.

Nous n'avons pas trouvé le temps de déterminer le nombre de fonctions amines primaires sur des surfaces traitées par le mélange N<sub>2</sub>+H<sub>2</sub> à l'aide des méthodes de dosage expliquées au chapitre II. Par contre d'autres travaux du laboratoire ont montré que l'ammoniac est plus efficace que le mélange N<sub>2</sub>+H<sub>2</sub> pour l'amélioration de l'adhérence des couches de cuivre vis-à-vis des polymères fluorés<sup>[17]</sup> mais aussi pour le greffage d'anticorps à la surface de membranes de cellulose<sup>[5]</sup>.

### II.2.3.3. Activité enzymatique de surfaces traitées par plasma allylamine

Dans les deux paragraphes précédents, nous avons réalisé le greffage des fonctions amines primaires par des traitements de fonctionnalisation par plasma  $\text{NH}_3$  et mélange  $\text{N}_2 + \text{H}_2$ . Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons à la polymérisation par plasma de l'allylamine (PPAA) pour déposer une couche mince contenant des fonctions amines primaires.

Le dépôt d'allylamine polymérisée par plasma basse pression a été effectué selon deux conditions opératoires. Les résultats montrent que l'activité enzymatique varie en fonction du choix des conditions expérimentales. De plus, nous avons constaté que les conditions de pré-traitement dans l'argon jouaient aussi un rôle important sur l'activité enzymatique (tableau IV.6.).

Nom	Tampon ( $\text{U}/\text{cm}^2$ )	Tween ( $\text{U}/\text{cm}^2$ )	Eau ( $\text{U}/\text{cm}^2$ )
PPGTR (I)	$6,9 \cdot 10^{-2}$ n=1	$5,9 \cdot 10^{-2}$ n=1	$3,9 \cdot 10^{-2}$ n=1
PPGTR (II)	$1,5 \cdot 10^{-1}$ n=1	$7,9 \cdot 10^{-2}$ n=2	$5,6 \cdot 10^{-2}$ n=1

**Tableau IV.6.** Activité enzymatique de la surface traitée par plasma allylamine

(I): (pré-traitement:  $Q_{\text{Ar}} = 150$  sccm,  $P_w = 20$  W,  $P = 0,8$  mbar,  $t = 5$  s et traitement:  $Q_{\text{Ar}} = 30$  sccm,  $P_w = 25$  W,  $P = 1,0$  mbar,  $t = 30$  min)

(II): (pré-traitement:  $Q_{\text{Ar}} = 150$  sccm,  $P_w = 20$  W,  $P = 1$  mbar,  $t = 5$  min et traitement:  $Q_{\text{Ar}} = 30$  sccm,  $P_w = 25$  W,  $P = 0,45$  mbar,  $t = 20$  min)

Les résultats obtenus montrent que quelle que soit la solution de rinçage, plus le temps de pré-traitement dans l'argon est long, plus grande est l'activité enzymatique.

Comme pour les traitements précédents, le rinçage des échantillons avec une dernière étape utilisant l'eau distillée, ou avec la solution de guanidine 2 M, mène à une diminution de l'activité enzymatique mesurée.

En ce qui concerne la question principale de l'efficacité d'un traitement du PE par plasma allylamine pour l'immobilisation de la trypsine, nous n'avons pas de réponse simple à ce stade de l'étude. En premier lieu, peu d'expériences ont été réalisées : une série plasma / un échantillon PPGTR.

L'expérience (II) sur PPGTR rinçage tampon avait donné la plus grande valeur d'activité immobilisée obtenue dans ce travail soit  $15 \cdot 10^{-2} \text{ U/cm}^2$ . Par contre, contrairement à ce que l'on avait observé avec les traitements  $\text{NH}_3$  ou  $\text{N}_2 + \text{H}_2$ , le rinçage avec la solution de Tween diminue fortement cette activité, jusqu'à une valeur de  $7,9 \cdot 10^{-2} \text{ U/cm}^2$ , voisine de celles obtenues pour PPGTR traitement  $\text{NH}_3$ . Par ailleurs, le changement des conditions expérimentales du dépôt par plasma n'a pas permis de reproduire les fortes activités obtenues avec les premières conditions.

Une étude plus approfondie sera nécessaire pour optimiser les conditions opératoires du traitement par plasma d'allylamine en vue de l'immobilisation enzymes. C'est la raison pour laquelle le traitement par plasma d'ammoniac a été choisi pour la suite de notre étude.

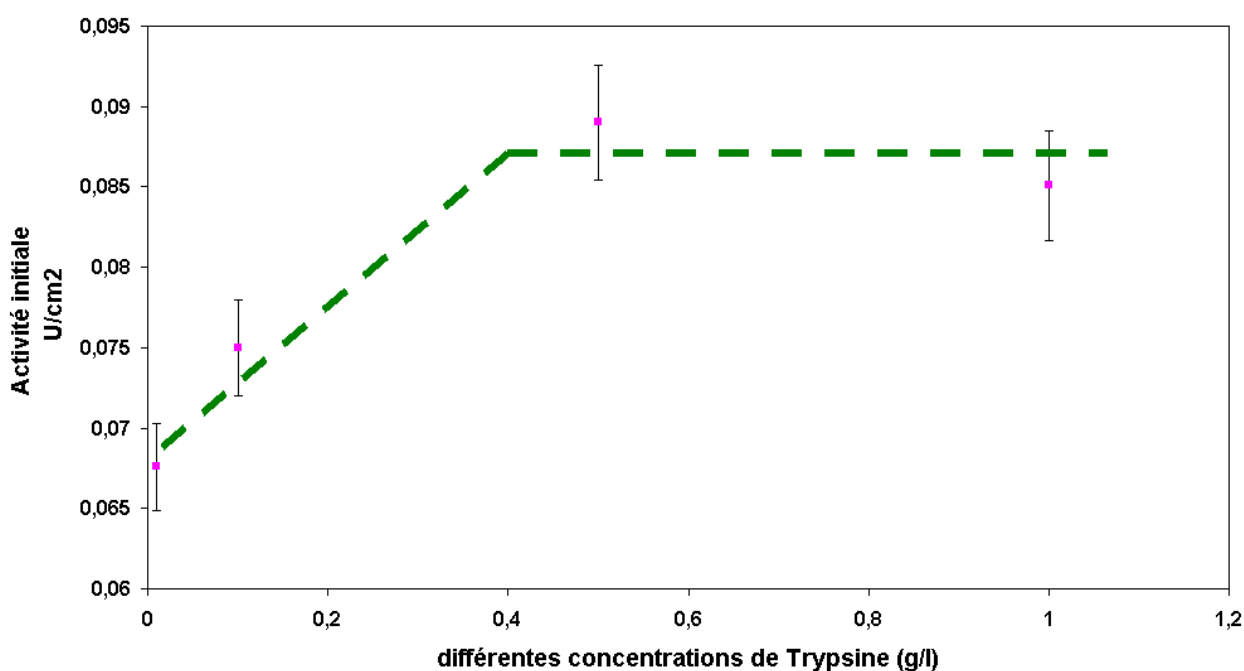


### III. Activité enzymatique de la trypsine immobilisée sur des surfaces de PE traité par plasma $\text{NH}_3$

#### III.1. Evaluation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de la trypsine dans la solution d'incubation

L'étape d'immobilisation de l'enzyme par incubation des échantillons de PE fonctionnalisés dans une solution de trypsine (généralement à 1 g/l) a été décrite au chapitre III.

La figure IV.8. représente l'influence de la variation de la concentration de la trypsine dans la solution d'incubation sur l'activité immobilisée mesurée initialement sur des échantillons de type PPGTR. On peut constater que l'activité enzymatique croît avec l'augmentation de la concentration de trypsine jusqu'à 0,5 g/l. Pour des concentrations supérieures (0,5-1 g/l), on peut considérer que l'activité immobilisée atteint un plateau. Ces résultats sont en accords avec ceux obtenus par analyse XPS et présentés chapitre section III, I.3.3.

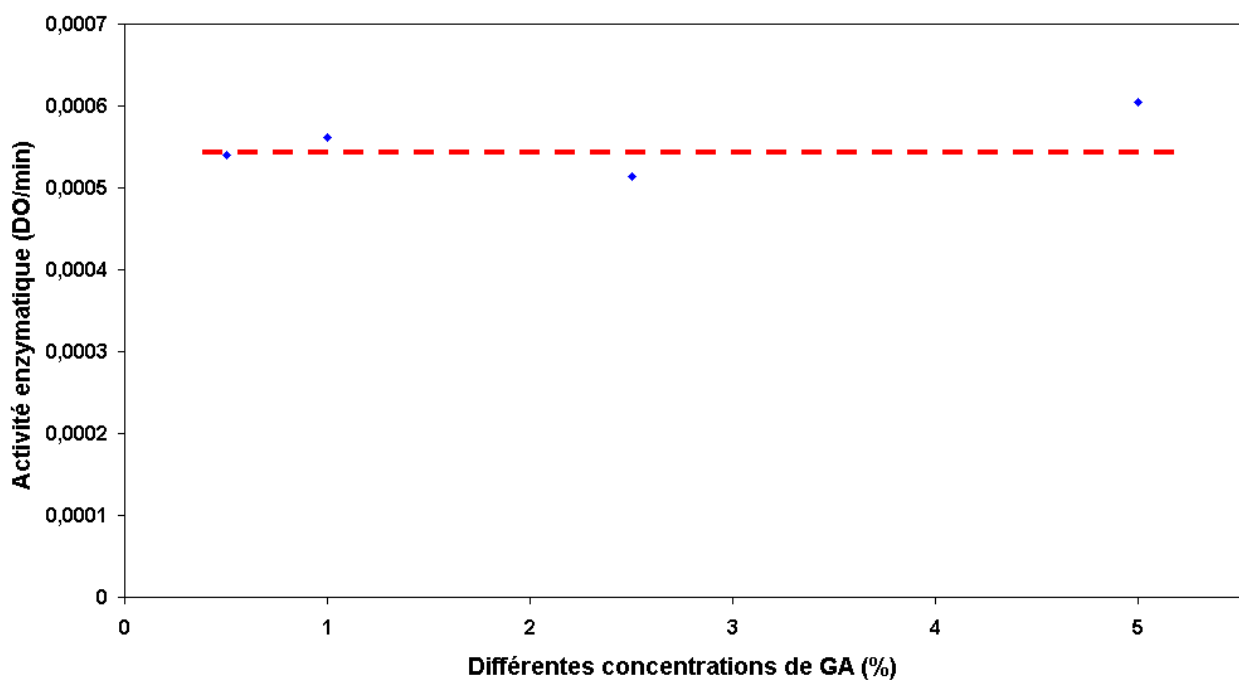


**Figure IV.8.** Effet de la concentration de la trypsine dans la solution d'incubation sur l'activité enzymatique immobilisée – (Echantillons PPGTR rinçage tampon)

### III.2. Evaluation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de GA

L'activité enzymatique a également été évaluée en faisant varier la concentration du glutaraldéhyde (GA) dans la solution réagissant avec les amines primaires en surface du PE traité par plasma (la concentration de la trypsine est 1 g/l).

Les résultats présentés Figure IV.9. montrent qu'entre 0,5 % et 5 % de GA l'activité enzymatique ne varie pas de manière significative. Cette observation est en accord avec les travaux effectués par L. Geng et al. sur l'immobilisation de la trypsine <sup>[18]</sup>.



**Figure IV.9.** Evolution de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de GA dans le mélange réactionnel (Echantillon PPGTR rinçage tampon)

### III.3. Stabilité de l'activité enzymatique au cours d'essais répétitifs

Dans le but d'évaluer la stabilité de l'activité enzymatique de la trypsine immobilisée sur la surface, nous avons effectué une comparaison entre l'activité enzymatique du premier essai et celle mesurée au cours du temps. Pour cela, après le premier essai, l'échantillon est conservé dans une solution de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,6 et à 4°C. Après un certain temps - pouvant varier d'une semaine à trois semaines - , l'échantillon est sorti de sa solution de stockage, séché à l'air à température ambiante, puis testé à nouveau contre une solution de BAEE suivant le protocole déjà présenté (section II.2.1.). En fonction de l'activité enzymatique mesurée, il peut être à nouveau stocké en l'attente de tests suivants.

Le tableau IV.7. regroupe les valeurs des activités enzymatiques mesurées lors des "deuxième essais" réalisés avec les échantillons déjà présentés (tableau IV.4.).

Nom	Tampon (U/cm <sup>2</sup> )	Tween (U/cm <sup>2</sup> )	Guanidine (U/cm <sup>2</sup> )
PPGTR	$4,5 \cdot 10^{-2} \pm 9 \cdot 10^{-3}$ n=10	$4,0 \cdot 10^{-2} \pm 9 \cdot 10^{-3}$ n=8	$1,4 \cdot 10^{-2} \pm 6 \cdot 10^{-3}$ n=3
PPGT	$0,7 \cdot 10^{-2} \pm 6 \cdot 10^{-3}$ n=3	$0,6 \cdot 10^{-2} \pm 5 \cdot 10^{-3}$ n=3	–
PPTR	$2,1 \cdot 10^{-2} \pm 13 \cdot 10^{-3}$ n=3	$2,0 \cdot 10^{-2} \pm 5 \cdot 10^{-3}$ n=2	–
PPT	$1,6 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}$ n=2	$1,6 \cdot 10^{-2} \pm 3 \cdot 10^{-3}$ n=2	–

**Tableau IV.7.** Mesure de l'activité enzymatique des échantillons lors du deuxième essai, après une première période de stockage variant d'une à trois semaines

Un résultat important montré dans le tableau IV.7. est le maintien d'une activité enzymatique significative pour les échantillons du type PPGTR, même si cette activité a diminué d'environ 50% par rapport au premier essai.

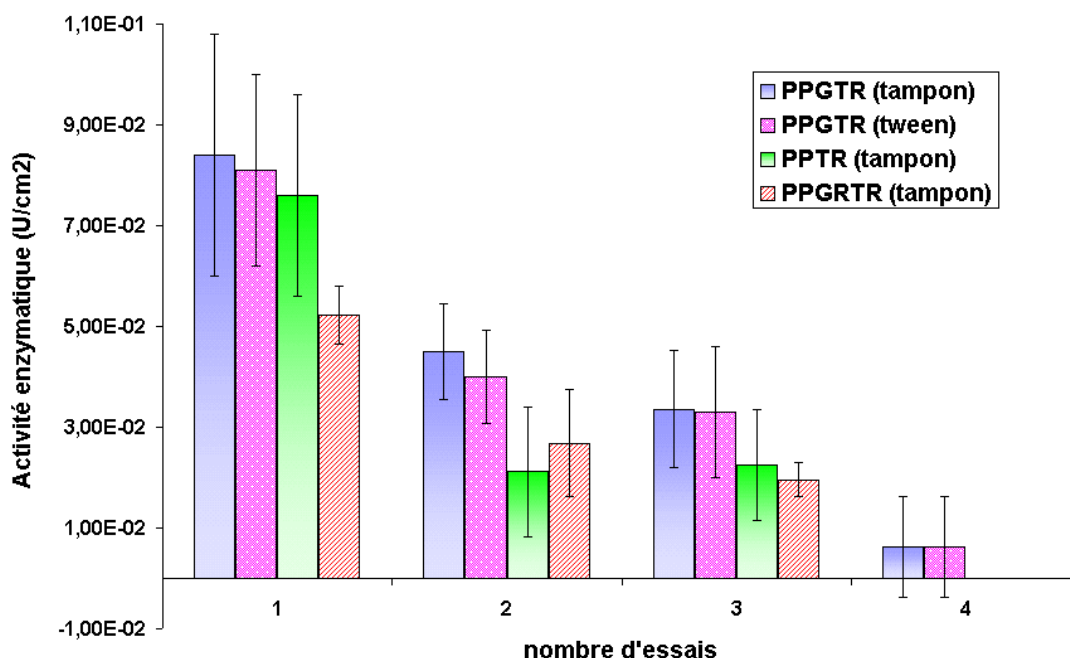
Par contre les échantillons de type PPTR (sans glutaraldéhyde), qui montraient une activité voisine de celle des PPGTR au premier essai, voient celle-ci chuter de manière plus drastique

encore, puisqu'ils perdent près de 75% de l'activité initiale, avoisinant au deuxième essai des valeurs à peine significatives ( $2 \cdot 10^{-2} \text{ U/cm}^2$ ).

Les résultats obtenus confirment l'intérêt de procéder à la réduction par  $\text{NaCNBH}_3$ , les échantillons non réduits PPGT et PPT montrant des activités non significatives, du même ordre de grandeur que des échantillons de PE non traités incubés en présence d'enzyme (PT).

On confirme également la similarité des activités obtenues avec les deux solutions de rinçage : solution tampon et tween.

Par la suite, nous avons entrepris de suivre l'évolution de l'activité enzymatique des échantillons PPGTR, PPTR et PPGRTR pendant des essais répétitifs sur une période de 2 mois.



**Figure IV.10.** Evolution de l'activité enzymatique en fonction du nombre d'essais pour les échantillons PPGTR, PPTR et PPGRTR; les barres d'incertitudes portées sur le diagramme correspondent à la valeur de l'écart type  $\sigma_n$

On constate que l'activité enzymatique des échantillons PPGTR, PPTR et PPGRTR diminue progressivement au cours du temps et après quatre essais répétitifs. Cette diminution est plus importante dans le cas des échantillons PPTR (PE traité par plasma, immobilisation de la trypsine et réduction par  $\text{NaCNBH}_3$ ) où l'activité passe à 28 % (PPTR) de la valeur initiale dès le deuxième essai. Cette décroissance continue jusqu'à la perte totale de l'activité enzymatique.

En ce qui concerne les échantillons PPGTR les résultats montrent qu'environ 50 % de l'activité reste sur la surface après le deuxième essai; et environ 40 % après le troisième (correspondant à environ 4 à 6 semaines de stockage). Ceci confirme le rôle positif du glutaraldehyde (GA) qui favorise la stabilité de la trypsine immobilisée sur la surface. Ces résultats sont en accord avec la littérature <sup>[19]</sup>.

Cependant cette activité devient faible au cours du temps et après des essais répétitifs. Après le quatrième essai l'activité enzymatique restant sur la surface passe à 8 % de la valeur initiale, inférieure à la valeur minimum significative. Cette diminution de l'activité au cours du temps est courante, même pour des enzymes immobilisées, et variable selon leur nature. On l'impute généralement à un changement de configuration de l'enzyme immobilisée ; dans le cas des protéases un risque supplémentaire pourrait provenir des éventuelles enzymes libérées dans le milieu de stockage, qui seraient alors en posture de lyser celles encore immobilisées <sup>[2,20-21]</sup>. Enfin, on ne peut pas exclure la dégradation du polymère lui-même.

Afin de tenter d'améliorer la conservation de l'activité enzymatique des échantillons au cours des essais répétitifs, nous avons étudié - sommairement - l'influence du pH (3 ; 4 ; 6 ; 7,6 ; 10) des solutions de phosphate de sodium utilisées pour le stockage sur l'activité enzymatique. Cependant, les résultats de ces mesures n'ont pas été concluants et la compréhension des phénomènes mis en jeu dans la perte progressive de l'activité enzymatique immobilisée au cours de longues périodes demanderait une étude beaucoup plus complète.

Le tableau IV.8. présente différents résultats concernant la stabilité d'enzymes immobilisées par différentes méthodes.

Enzyme	Support	Immobilisation	Stabilité	Référence
Trypsine	Polyéthylène (PE)	Plasma NH <sub>3</sub> + glutaraldéhyde	50 % de l'activité reste au 2 <sup>ème</sup> essai	Présent Travail
Trypsine	Bille gel de silice réticulé avec chitosan	Epoxy activation + glutaraldéhyde (1)	A.R* 65% au 4 <sup>ème</sup> essai 75 % à 30 jours	Xi et al. 2005 [2]
Trypsine	Cellulose + polymère acrylique	Hexyl diamine + glutaraldéhyde	A.R* 90% (2) à 90 jours, 4°C, milieu Tris-HCl	Jiang et al. 2000 [22]
Trypsine	Membrane PVDF activée (3) par carboxyl	Covalente Incubation directe trypsine	Stable 1 an 4°C, tampon Tris-HCl "Légère décroissance" 3 <sup>ème</sup> digestion	Bienvenu et al. 1999 [23]
Trypsine	Polyéthylène	Covalente (4) PE-g-PAA + CMC	A.R* 95% 6 mois de stockage 100% pour 6 essais	Yamada et al. 2003 [24]
Trypsine	Silicium poreux	Silanisation (5) + glutaraldéhyde	Utilisation pour 400 digestions sur 2 mois en présence de guanidine, HCl 2M (5)	Ekström et al. 2000 [25]
MDH et LDH (6)	CIM epoxy monoliths (6)	Covalente via liaison avec epoxy	100% 100 à 150 jours	Vodopivec et al. 2003 [26]

\* A.R = Activité résiduelle

(1): Activation par le 1,2-éthylènediglycidyl éther.

(2): Activité de l'enzyme immobilisée = 55,6 % enzyme libre

(3): Membrane IAV, Société Immobilon tech

(4): PE-g-PAA: Polyéthylène greffé avec un polymère d'acide acrylique; liaison avec le CMC: CMC= 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoéthyl)-carbodiimide metho-*p*-toluenesulfonate.

(5): (3-aminopropyl)triéthoxysilane.

(6): Support commercial méthacrylate poreux; MDH= Malate déshydrogénase; LDH=L-lactate déshydrogénase. Pas de changement de réponse pendant une période de mesures de 100 jours. Activité relative de la trypsine immobilisée : 45% à 13% de l'enzyme native.

**Tableau IV.8.** Stabilité d'enzymes immobilisées par différentes méthodes selon la littérature

Notre recherche bibliographique a permis de montrer qu'il n'y a pas beaucoup d'études sur la stabilité des enzymes immobilisées sur des surfaces traitées par plasma (tableau IV.8.). On peut également constater une grande disparité des résultats de stabilité annoncés pour une même enzyme (trypsine par exemple) selon la nature des surfaces, les méthodes de fonctionnalisation et d'immobilisation, et selon les conditions de travail ou de stockage. De plus, les auteurs ne quantifient pas toujours la stabilité en terme d'évolution de l'activité enzymatique mesurée au cours du temps, ce qui rend difficile l'évaluation des différents systèmes d'immobilisation.

Pour ces raisons, il est malaisé d'interpréter les comparaisons et de proposer un procédé optimisé, en l'état actuel de nos connaissances. Les paramètres les plus immédiats qui semblent pouvoir être améliorés sont les conditions de stockage. Cependant, une différence importante par rapport à d'autres méthodes plus classiques d'immobilisation, provient de la nature de la surface traitée par plasma. Il est indispensable d'intégrer la possible évolution de cette surface dans l'étude de la stabilité de l'enzyme qui s'y trouve fixée. Des modifications de la longueur ou de la rigidité du bras espaceur pourraient contribuer à avancer dans la connaissance des phénomènes mis en jeu.

## Conclusion

L'étude décrite dans ce chapitre a été consacrée à la mesure de l'activité enzymatique de la trypsine immobilisée sur la surface de polyéthylène. Afin de comparer l'influence de l'activité enzymatique sur des surfaces présentant des taux d'amines différents, nous avons utilisé les différents procédés de plasma: soit une fonctionnalisation de la surface à partir du gaz ammoniac ou du mélange  $N_2+H_2$ , soit la polymérisation sur la surface en employant un précurseur tel que l'allylamine.

Dans le cas de l'utilisation du mélange des gaz  $N_2+H_2$ , l'activité enzymatique est plus faible que celle obtenue avec l'ammoniac. En ce qui concerne le plasma d'allylamine, une étude plus approfondie sera nécessaire pour optimiser les conditions opératoires du traitement plasma en vue de l'immobilisation des enzymes. C'est la raison pour laquelle le traitement par plasma d'ammoniac a été choisi pour la suite de notre étude.

Le protocole de rinçage des échantillons, après l'immobilisation de la trypsine, a été optimisé afin d'éviter son relargage dans la solution de travail (substrat BAEE). Nous avons également mis en évidence que l'activité enzymatique ne dépend pas de la concentration de la solution de glutaraldéhyde pour les concentrations entre 0,5 % et 5 % de GA. En revanche, elle croît avec l'augmentation de la concentration de la trypsine jusqu'à atteindre une valeur maximale pour une concentration de trypsine de 0,5 g/l. Au delà de cette concentration, la variation de l'activité enzymatique n'est pas significative.

Les études concernant l'activité enzymatique indiquent une activité plus élevée pour les échantillons ayant subi la réduction par  $NaCNBH_3$  ( $8,4 \cdot 10^{-2}$  U/cm<sup>2</sup>). En effet, la réduction conduit à une conversion des fonctions imines en amines secondaires beaucoup plus stables.

Nous avons également étudié la variation de l'activité enzymatique en fonction de différentes solutions de lavage: eau distillée, solution guanidine 2 M ou 5 M, tampon phosphate seul ou avec du tween 20. La valeur de l'activité enzymatique est identique pour les échantillons rincés avec ces deux dernières solutions. En revanche l'activité est nettement plus faible dans le cas des rinçages à l'eau ou avec la solution de guanidine.

Les données expérimentales montrent une activité identique pour les échantillons PPGTR et PPTR (sans l'étape de fixation de GA) en ce qui concerne le premier essai. Cependant, l'étude de la stabilité de la trypsine immobilisée met en évidence que 50 % de l'activité enzymatique reste sur la surface après le deuxième essai dans le cas des échantillons PPGTR, alors qu'elle diminue



rapidement pour les échantillons PPTR (une perte de l'activité de 72 % de la valeur initiale après le deuxième essai). Cette décroissance continue jusqu'à la perte totale de l'activité enzymatique.

Il serait intéressant à l'avenir de comprendre les mécanismes de cette perte d'activité au cours du temps - stabilité du support, des fonctions, de l'enzyme - et de tenter d'y remédier.

## Références

[1] – **D. S. Peterson, T. Rohr, F. Svec, J. M. J. Fréchet**

«Enzymatic microreactor-on-a-chip: Protein mapping using trypsin immobilized on porous polymer monoliths molded in channels of microfluidic devices»

Analytical Chemistry, 74, 2, 2002, p 4081-4088

[2] – **F. Xi, J. Wu, Z. Jia, X. Lin**

«Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead»

Process Biochemistry, 40, 2005, p 2833-2840

[3] – **A. J. Martinez, S. Manolache, V. Gonzales, R. A. Young, F. Denes**

«Immobilized biomolecules on plasma functionalized Cellophan. 1. Covalently attached alpha-chymotrypsin»

Biomaterials Science Polym Edition, 11, 4, 2000, p 415-438

[4] – **I. K. Kang, S. H. Choi, D. S. Shin, S. C. Yoon,**

«Immobilization of active  $\alpha$ -Chymotrypsin on RF-plasma-functionalized polymer surfaces»

Journal of Applied Polymer Sciences 78, 2000, p 1783-1796

[5] – **S. Ben Rejeb, M. Tatoulian, F. Arefi Khonsari, N. Fisher-Durand, A. Martel, J. F. Lawrence, J. Amouroux, F. Le Goffic**

«Functionalization of nitrocellulose membranes using ammonia plasma for the covalent attachment of antibodies for use in membrane-based immunoassays»

Analytica Chimica Acta, 376, 1998, p 133-138

[6] – **M. J. Wang, Y. I. Chang, F. Poncin-Epaillard**

«Effects of the addition of Hydrogen in the Nitrogen cold plasma: The surface modification of polystyrene»

Langmuir, 19, 2003, p 8325-8330

[7] – **M. Müller, C. Oehr**

«Plasma amino functionalization of PVDF microfiltration membranes: comparison of the in plasma modifications with a grafting method using ESCA and an amino-selective fluorescent probe»

Surface and Coating Technology 116-119, 1999, p 802-807

[8] – **P. Kingshott, H. Thissen, H. J. Griesser**

«Effects of cloud-point grafting, chain length, and density of PEG layers on competitive adsorption of ocular proteins»

Biomaterials 23, 9, 2002, p 2043-2056

[9] – **D. A. Puleo**

«Activity of enzyme immobilized on silanized Co-Cr-Mo»

Journal of Biomedical Materials Research, 29, 1995, p 951-957

[10] – **M. A. Firer**

«Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography»

Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 49, 2001, p 433-442

[11] – **Z. H. Wang, G. Jin**

«Covalent immobilization of proteins for the biosensor based on imaging ellipsometry»

Journal of Immunological Methods, 285, 2, 2004, p 237-243

[12] – **M. Yoshioka, Y. Mukai, T. Matsui, A. Udagawa, H. Funakubo**

«Immobilization of ultra-thin layer of monoclonal antibody on glass surface»

Journal of Chromatography: Biomedical Applications, 566, 1991, p 361-368

[13] – **L. J. Mikulec, D. A. Puleo**

«Use of  $\rho$ -nitrophenyl chloroformate chemistry to immobilize protein on orthopaedic biomaterials»

Journal of Biomedical Materials Research, 32, 1996, p 203-208

[14] – **M. A. Hermodson, L. H. Ericsson, H. Neurath, K. A. Walsh**

«Determination of the amino acid sequence of porcine trypsin by sequenator analysis»

Biochemistry, 12, 1973, p 3146-3153

[15] – **Y. Nozaki, C. Tanford**

«The solubility of amino acids, diglycine, and triglycine in aqueous guanidine hydrochloride solutions»

The Journal of Biological Chemistry, 245, 1970, p 1648-1652

[16] – **R. M. Stroud**

«A family protein-cutting proteins»

Scientific American, 231, 1974, p 74-88

[17] – **F. Arefi-Khonsari, M. Tatoulian, J. Kurdi, J. Amouroux**

«Plasma processing of polymers for enhanced adhesion to metals and metal oxides»

Proceedings of the 80th Anniversary Memorial Center Tokyo Institute of Technology Symposium; RadTech: Japan, 2000, p 158-165

[18] – **L. Geng, N. Li, M. Xiang, X. Wen, D. Xu, F. Zhao, K. Li**

«The covalent immobilisation of trypsin at the galleries of layered  $\gamma$ -zirconium phosphate»

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 30, 2003, p 99-109

[19] – **M. I. Kim, J. Kim, J. Lee, H. Jia, H. B. Na, J. K. Youn, J. H. Kwak, A. Dohnalkova, J. W. Grate, P. Wang, T. Hyeon, H. G. Park, H. N. Chang**

«Crosslinked enzyme aggregates in hierarchically-ordered mesoporous silica: A simple and effective method for enzyme stabilization»

Biotechnology and Bioengineering, 96, 2007, p 210-218

[20] – **J. L. McNay, E. J. Fernandez**

«How does a protein unfold on a reversed-phase liquid chromatography surface»

Journal of Chromatography A, 849, 1999, p 135-148

[21] – **M. Nouaimi, K. Möschel, H. Bisswanger**

«Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers»

Enzyme and Microbial Technology, 29, 2001, p 567-574

[22] – **H. Jiang, H. Zou, H. Wang, J. Ni, Q. Zhang, Y. Zhang**

«On-line characterization of the activity and reaction kinetics of immobilized enzyme by high-performance frontal analysis»

Journal of Chromatography A, 903, 2000, p 77-84

[23] – **W. V. Bienvenut, J. C. Sanchez, A. Karmime, V. Rouge, K. Rose, P. A. Binz, D. F. Hochstrasser**

«Toward a clinical molecular scanner for proteome research: Parallel protein chemical processing before and during western blot»

Analytical Chemistry, 71, 1999, p 4800-4807

[24] – **K. Yamada, T. Nakasone, R. Nagano, M. Hirata**

«Retention and reusability of trypsin activity by covalent immobilization onto grafted polyethylene plates»

Journal of Applied Polymer Science, 89, 2003, p 3574-3581

[25] – **S. Ekström, P. Önnarfjord, J. Nilsson, M. Bengtsson, T. Laurell, G. Marko-Varga**

«Integrated microanalytical technology enabling rapid and automated protein identification»

Analytical Chemistry, 72, 2000, p 286-293

[26] – **M. Vodopivec, A. Podgornik, M. Berovič, A. Štrancar**

«Characterization of CIM monoliths as enzyme reactors»

Journal of Chromatography B, 795, 2003, p 105-113

## **Conclusion Générale**

## Conclusion générale

L'objectif de ce travail était de mettre au point un procédé d'immobilisation d'enzyme sur des supports de polyéthylène (PE) traité par voie plasma, de caractériser la surface du polymère au cours des étapes successives du processus et d'évaluer les performances du produit fini.

La plus grande partie de l'étude a été réalisée en mettant en œuvre une première étape de fonctionnalisation du polyéthylène par plasma ammoniac, les conditions d'un tel traitement ayant déjà été optimisées au laboratoire.

La surface de PE issue de cette première étape de traitement a été caractérisée par différentes techniques complémentaires:

- la mesure de l'angle de contact formé entre une goutte d'eau et la surface de PE, traité ou non traité. On montre ainsi que, d'un point de vue physicochimique, la surface a bien été modifiée, puisqu'elle est devenue plus hydrophile après traitement (PE non traité  $\theta = 90^\circ$ , PE traité  $\theta = 54^\circ$ ).
- l'étude par XPS a confirmé le greffage de fonctions aminées (PE non traité % N/C = 0 ; PE traité % N/C = 0,12).
- pour la détermination de la densité des fonctions amines de surface, plusieurs méthodes de dérivation utilisant des sondes dosables par spectrophotométrie UV/visible ont été testées. Deux méthodes exploitant la réactivité des composés sulfo LC-SPDP et ITL (méthode ITL/BCA) envers les amines primaires, ont été sélectionnées pour doser spécifiquement ces dernières. Ces deux méthodes ne donnent pas lieu à des interactions non spécifiques significatives et mènent à des résultats cohérents : 1,2 à 1,4 molécules  $-\text{NH}_2/\text{nm}^2$ . Les fonctions amines secondaires ont été estimées à 3,9 molécules  $-\text{NHR}/\text{nm}^2$  à l'aide d'une seule méthode (sulfo SHPP/BCA). Quant aux amines tertiaires elles n'ont pas pu être déterminées, la méthode au bleu de bromophénol, sensée doser l'ensemble des amines primaires, secondaires et tertiaires, s'étant révélée inadaptée à nos conditions (interactions non spécifiques avec le PE non traité trop importantes). Dans la mesure où notre intérêt principal concernait la densité d'amines primaires, nous n'avons pas cherché à résoudre ce problème.

Au delà de l'objectif premier de disposer de mesures fiables de la densité surfacique d'amines primaires, - une forte densité est, a priori, un des critères de performance des traitements aminant -, nous avons exploité ces méthodes dans le but de mieux connaître leur stabilité dans le temps. Les surfaces traitées par plasma sont connues pour être sujettes à diverses évolutions en présence d'oxygène ou en présence de différents solvants. On a donc vérifié que la densité des

amines primaires diminuait au cours du temps et, résultat plus original, on a pu chiffrer cette décroissance à environ 10% de la quantité initiale durant les premières 24 heures, dans le cas d'un stockage à l'air à température ambiante comme dans le cas d'un stockage en milieu tampon pH 7,6 à 4°C. Pour des durées de stockage plus longues (10 jours) le milieu tampon phosphate à 4°C semble préférable au stockage à l'air mais au vu du petit nombre d'expériences supportant cette hypothèse il serait sage de reproduire ces expériences avant de conclure.

Suite logique de la phase précédente, nous avons mis en œuvre et caractérisé la seconde étape du processus d'immobilisation par liaison covalente: le greffage d'un bras espaceur, le glutaraldéhyde, à la surface du PE traité, par formation d'une liaison imine entre les fonctions amine primaire et aldéhyde.

- la caractérisation par XPS a montré la diminution du rapport N/C signe d'un masquage des fonctions amines par le glutaraldéhyde. De plus, l'expérience menée en modifiant la concentration du glutaraldéhyde dans le milieu d'incubation, a montré que la concentration choisie usuellement (5 %) était suffisante pour assurer la saturation de la surface (plateau de la courbe N/C fonction de la concentration).

- comme pour les fonctions amines, on a cherché à mesurer la densité des fonctions aldéhyde présentes à la surface. Deux méthodes, ne donnant pas d'interactions non spécifiques ou d'interférences, ont été à nouveau sélectionnées. L'une utilise la tyramine pour réagir avec les aldéhydes de surface et conduire à une surface réductrice; celle-ci réduit alors les ions cuivriques et on mesure l'apparition des ions cuivreux au spectrophotomètre, à l'aide du BCA. L'autre méthode libère directement le glutaraldéhyde greffé à la surface (hydrolyse), glutaraldéhyde mesuré à son tour par spectrophotométrie, après réaction avec le phénol. Les résultats obtenus avec les deux méthodes donnent une densité de fonctions aldéhyde comprise entre 1,2 et 1,4 molécules -CHO /nm<sup>2</sup>, et nous ont conduit à plusieurs conclusions:

- les deux méthodes mènent à des valeurs très voisines entre elles, et de plus très semblables à celles obtenues pour les amines primaires: ces quatre résultats quasi identiques se confortent mutuellement, et suggèrent que les réactions [amine primaire + GA] se font mole-à-mole.

- ceci est en accord avec le souhait de saturation des sites d'amines primaires réalisé expérimentalement grâce au large excès de fonctions aldéhyde disponibles dans la solution d'incubation, et vérifié par les résultats XPS (pour des concentrations de GA > 2,5 %).

- il ne semble pas qu'il existe en quantité significative de molécules de glutaraldéhyde pontées entre deux amines de surface, car les deux méthodes "Tyramine/BCA" et "Acide/Phénol" devraient, dans ce cas, donner des résultats différents.



Cette mise au point de méthodes de dosage a également rendu possible l'étude de la stabilité des fonctions aldéhyde au cours du temps. Celles-ci se sont montrées plus stables que les amines primaires puisqu'on a chiffré des diminutions, dans les premières 24 heures, de 3% de la valeur initiale dans l'air à température ambiante et 4% en milieu tampon phosphate à 4°C. Une conclusion importante pour la conduite du procédé d'immobilisation est donc qu'il est préférable d'enchaîner rapidement les étapes traitement plasma et fixation du glutaraldéhyde, cette seconde étape stabilisant en quelque sorte la surface.

Enfin nous avons réalisé la troisième étape d'immobilisation de l'enzyme en incubant les échantillons de PE portant les fonctions aldéhyde dans une solution de trypsine. Deux variantes expérimentales ont été testées, selon qu'on opérât - ou non - la réduction des fonctions imines précédemment formées par le cyanoborohydrure de sodium (réduction en amines secondaires réputées plus stables). A nouveau nous nous sommes efforcés de caractériser cette nouvelle étape par différentes méthodes:

- Par XPS on a mis en évidence l'augmentation du rapport N/C et la déconvolution des pics C<sub>1S</sub> a montré l'apparition d'un pic "amide" correspondant aux très nombreuses liaisons peptidiques reliant deux à deux les différents résidus aminés de la protéine (123 résidus d'acides aminés). Une approche originale a également consisté à rechercher les C<sub>1S</sub> et S<sub>2P</sub> qui sont apparus comme de bons marqueurs de la présence de l'enzyme. En effet, en dépit d'impuretés soufrées, on a observé à 164 eV la signature de liaisons C-S attribuées aux résidus d'acides aminés soufrés : cystéine (12 résidus) et méthionine (3 résidus). La comparaison des pics S<sub>2P</sub> en fonction de concentrations variables de trypsine dans la solution d'incubation a également permis de vérifier que la concentration usuellement utilisée était suffisante pour assurer une "saturation" de la surface.

- Par la méthode au BCA nous avons estimé la masse de trypsine présente en surface du PE à 1,7 µg/cm<sup>2</sup> valeur plus faible que d'autres obtenues avec des copolymères greffés sur des polymères présentant une morphologie et une réactivité différente. Mais la fonctionnalisation directe de la surface opérée dans notre cas ne permet pas l'inclusion d'enzyme dans des couches réticulées d'une certaine épaisseur. L'estimation du taux de recouvrement de la surface à partir d'un calcul très simplifié laisse supposer que la trypsine est immobilisée sur plusieurs couches et/ou en formant des agrégats, ce dernier point ayant été suggéré par l'observation des clichés MEB et AFM.

- Enfin nous avons mesuré l'activité enzymatique des échantillons de PE en suivant les cinétiques de dégradation du substrat synthétique BAEE. Une activité d'environ 8.10<sup>-2</sup> U/cm<sup>2</sup> a été observée pour les échantillons de type PPGTR, qui avaient subi toutes les étapes de traitement ainsi que la réduction par NaCNBH<sub>3</sub> et d'environ 7,7.10<sup>-2</sup> U/cm<sup>2</sup> pour le type PPTR, sans bras espaceur glutaraldéhyde; les autres échantillons non réduits donnant des activités très faibles ou non

significatives. Cette valeur est tout a fait dans la gamme des activités enzymatiques mesurées par d'autres auteurs.

- Alors qu'un protocole de rinçage rigoureux avait été mis au point pour éviter tout relargage d'enzyme dans la solution de substrat pendant la durée du premier test cinétique, nous avons étudié la stabilité de l'activité au cours du temps (conservation dans un milieu tampon phosphate à 4°C) et au cours d'essais répétitifs. Seuls les échantillons de type PPGTR (PE traité+glutaraldéhyde+trypsine+réduction) ont montré une activité significative pour le deuxième essai et une décroissance progressive jusqu'au 4ème, soit après une période d'environ 2 mois de conservation à 4°C dans une solution tampon. Ce dernier point justifie l'utilisation du glutaraldéhyde, dont on pouvait douter lors de la comparaison des activités initiales des échantillons PPGTR et PPTR (PE traité+trypsine+réduction). Il faut préciser qu'il existe très peu de travaux sur la stabilité des enzymes immobilisées après traitement plasma.

- On doit cependant remarquer que la littérature fournit des exemples d'immobilisation de la trypsine conduisant à des stabilités bien supérieures. Néanmoins ceci a été obtenu sur d'autres surfaces de polymères présentant des morphologies et des réactivités différentes.

- La valeur de l'activité enzymatique mesurée en regard de la densité de 1,7 µg/ cm<sup>2</sup> obtenue par la méthode au BCA pose également problème. La mesure de l'activité a été répétée un grand nombre de fois - pour PPGTR : 28 fois pour l'activité initiale ; 18 fois pour les "deuxièmes essais" en rassemblant les rinçages faits avec le tampon et avec le tween - ce qui nous donne une grande confiance dans ce résultat. Le dosage au BCA n'a été réalisé qu'au cours de deux séries d'expériences, mais la valeur fournie, plutôt faible, est cohérente au vu de la littérature. Or, sur la base de l'activité spécifique de la trypsine en solution (environ 10700 U/mg) on attend une activité de 18 U/cm<sup>2</sup> sur les échantillons PPGTR alors qu'on mesure 0,08 U/cm<sup>2</sup>. Si il est normal de trouver des activités spécifiques moindres pour les enzymes immobilisées par rapport à celles qui sont libres en solution (limitations diffusionnelles des substrats, encombrement ou mauvaise orientation du site actif,...), il serait important de comprendre la grande différence trouvée dans le cas présent.

Dans la mesure où l'enzyme est présente sur le support - (et semble y être bien fixée puisque des mesures de BCA après environ 2 ans de stockage la mettent en évidence) - on doit penser qu'elle a été dénaturée et/ou précipitée. On peut avec quelques raisons soupçonner la surface du PE traitée par plasma : en effet, elle est riche d'un grand nombre de fonctions réactives - mal connues - que nous n'avons pas essayé de "bloquer" avec d'autres agents. Nous ne l'avons pas non plus stabilisée, comme nous aurions pu le faire avec un pré-traitement à l'hélium: on aurait pu ainsi limiter les éventuelles "recombinaisons" ou ré-internalisations de morceaux de chaînes de polymère de surface. D'autres traitements plasma ont été testés : le mélange N<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>, voisin du traitement

ammoniac, et la polymérisation de l'allylamine. Seul un petit nombre d'essais a été réalisé, qui n'a pas vraiment apporté de solutions à la relative faiblesse de l'activité initiale. On doit cependant noter que dans ces derniers cas, on ne connaît pas la quantité de protéine immobilisée en surface, le dosage BCA n'ayant pas été fait.

En conclusion un grand champ de perspectives pour comprendre et améliorer les procédés testés a été ouvert. Par exemple:

- Avec un plasma ammoniac:

- Rechercher de façon plus systématique si les conditions opératoires actuelles conduisent à la formation de précipités de protéines, l'analyse par EDX ayant montré la présence d'atomes de soufre - une des signatures de la trypsine - dans les agrégats observés par MEB. En généralisant l'utilisation de ces méthodes, on disposerait ainsi d'autres moyens de caractérisation pour améliorer la quantité du dépôt,

- Stabiliser la surface traitée par un post-traitement à l'hélium,

- Essayer d'éloigner davantage l'enzyme de la surface en utilisant d'autres espaceurs que le glutaraldéhyde: bras ou sous-couche,

- Tester d'autres enzymes,

- Essayer différents agents bloquants, ou réducteurs puissants (par exemple  $\text{NaBH}_4$ ), après incubation de la surface avec l'enzyme,

- Tester d'autres modes de traitements par plasma ou par voie chimique à titre de comparaison:

- Le plasma allylamine n'a été que rapidement abordé du fait de son manque d'optimisation et de reproductibilité actuel au laboratoire. Il serait très intéressant d'utiliser les méthodes de dosage d'amines primaires et de glutaraldéhyde mises au point, pour participer à son optimisation (au sens de la densité de fonctions greffées). On pourrait alors mieux savoir de quelle manière cette densité de fonctions est corrélée d'une part à la quantité d'enzyme immobilisée et d'autre part à l'activité globale. Lorsque la littérature parle de "crowding of trypsin" (Yamada et al., 2003: réf 25, chapitre IV), moins efficace que lorsque le dépôt d'enzyme est plus faible, on peut prévoir un important travail de mise au point avant de disposer d'un procédé optimisé.

- D'autres traitements plasma, déjà opérationnels au laboratoire, comme le plasma d'acide acrylique, pourraient directement être appliqués à notre problématique.

# **Annexes**

## A.1. Produits et matériel

### A.1.1 Produits réactifs:

- Trypsine du bovin pancréas, T 1426, Sigma,
- Film de polyéthylène (PE) basse densité, ET 311201, Goodfellow
- Bouteille de gaz NH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, Air liquide
- Allylamine (amino-3 propène, Sigma-Aldrich
- N $\alpha$ -Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester (BAEE), B 4500, Sigma
- Glutaraldéhyde (25%) dans l'eau (CHO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CHO), G 6257, Sigma-Aldrich
- Sodium cyanoborohydrate 95 %, NaCNBH<sub>3</sub>, 156159, Aldrich
- Guanidine (amino methanamide) (CH<sub>5</sub>N<sub>3</sub>. HCl), M=95,53 g/mol, Aldrich
- BCA protein assay reagents A (Bicinchoninic acide et tartarate dans alcalin tampon de carbonate, 23221, Pierce
- BCA protein assay reagents B (CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O 4%), 23224, Pierce
- Sulfosuccinimidyl 6-[3'-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoate (Sulfo-LC-SPDP), 21650, Pierce
- Sulfosuccinimidyl-3-[4-hydroxyphenyl] propionate (Sulfo-SHPP), 27712, Pierce
- L-tyrosine hydrochloride, T2006, L-cysteine hydrochloride, C1276, tyramine hydrochloride, T2879, Sigma
- Phenol 99 %, P1037, Sigma
- 2-iminothiolane hydrochloride (ITL), I6256, Sigma
- DL-dithiothreitol (DTT), D9779, Sigma
- Triton X-100, 9002-93-1, Sigma
- 4-diméthylaminopyridine (DMAP), D5640, Sigma
- 1,6-diaminohexan 98 %, H11696, Aldrich
- Bleu de bromophenol, M=669,99 g/mol (C<sub>19</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S), B0126, Acros
- Pipéridine, 104094, Aldrich
- 4-nitro-benzaldéhyde (NBZ) (O<sub>2</sub>NC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CHO) 98%, 130176, Aldrich
- Tamis moléculaire 4° A
- Sodium phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

**A.1.2 : Acides et solvants:**

- Acide acétique
- Solution d'acide chlorhydrique 37% (HCl)
- Acide sulfurique (95 %) (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Méthanol absolu
- Ethanol absolu
- Méthanol anhydre
- DMF

**A.1.3 : Matériels:**

- Incubateur va-et-vient, table d'agitation
- Bain ultras-sons
- Etuve
- Spectromètre (Kontron, UVIKON 860) pour la mesure de la densité optique

## A.2. Analyses XPS (spectroscopie de photoélectrons induits par rayon X)

La spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (ESCA ou XPS) est une analyse semi quantitative pour caractériser l'extrême surface de tout matériau solide (profondeur analysée inférieure à 10 nm (3-8 nm)). Soumis à un flux de photons X (Energie incidente  $E = h\nu$ ), le matériau émet par effet photoélectrique des électrons qui sont alors analysés en nombre (aspect quantitatif) et en énergie (identification des éléments et espèces chimiques). Les analyses XPS pour étudier les modifications de surface du PE ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire ITODYS de l'université paris 7. Les informations obtenues permettent:

- d'identifier tous les éléments (sauf H et He) et de déterminer leur concentration atomique (détection limite 0,1 %)
- de déterminer la nature des liaisons, l'environnement local et/ou le degré d'oxydation de la plupart des éléments

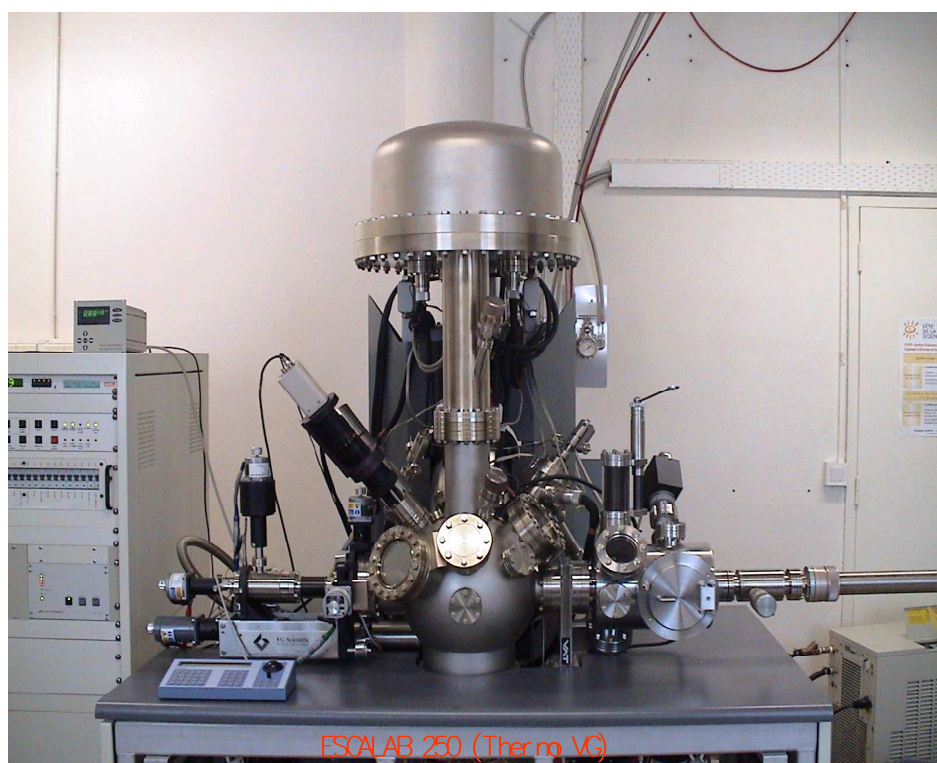
La mesure de l'énergie cinétique  $E_c$  des différents photoélectrons émis permet de déterminer l'énergie de liaison  $E_l$  correspondante et de déterminer la nature de l'élément émetteur. En effet, l'énergie cinétique d'un photoélectron est directement reliée à l'énergie du faisceau de rayons X primaire par la relation:

**Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.**

Où  $h\nu$  correspond à l'énergie du faisceau de rayon X primaire,  $E_c$  représente l'énergie cinétique du photoélectron émis par un élément donné,  $E_l$  caractérise l'énergie de liaison de ce photoélectron et  $W$  correspond au travail d'extraction du spectromètre (fonction de travail d'un spectromètre). De ce fait, la profondeur d'analyse de la spectroscopie XPS dépend du libre parcours moyen  $\lambda$  des électrons dans le matériau. Le libre parcours moyen des électrons dépend de la nature du matériau (composé organique, minéral, métallique, polymère, cristal...), de sa densité volumique. De façon générale, 95% du signal caractéristique provient d'une profondeur d'analyse de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres.

Le dispositif expérimental est un spectromètre Thermo VG ESCALAB 250 avec une source monochromatique Al ou Mg  $K\alpha$  ( $h\nu=1486,6$  et  $1253,6$  eV selon un angle de  $90^\circ$  par rapport à la surface. L'appareil est composé de deux chambres:

- le sas d'introduction des échantillons. (cette enceinte est mise sous vide grâce à un pompage secondaire permettant d'atteindre un vide inférieur à  $10^{-7}$  mbar. Une fois ce vide atteint, l'échantillon est transféré en chambre d'analyse
- la chambre d'analyse. Le vide dans cette chambre varie de  $10^{-8}$  mbar à  $10^{-11}$  mbar. Cette chambre est équipée d'une source X monochromatée, d'un analyseur hémisphérique avec multidétection (6 channeltrons), d'un canon permettant le bombardement ionique des surfaces.



**Figure A.1.** Dispositif expérimental sous ultra-vide dédié à la spectroscopie de photoélectrons X

Le spectromètre est couplé à un micro-ordinateur équipé du logiciel Advantage (VG Thermo Electron) permettant l'acquisition et le traitement des données. On calcule les données à partir des pics et les facteurs de sensibilité pour chaque élément (1,0, 1,80, 2,93 pour C, N, O). Les spectres sont calibrés par rapport au pic de  $C_{1s}$  à 285 eV.

Tous les éléments présents dans l'échantillon, exceptée l'hydrogène (ne procède pas d'électron de cœur), sont détectés par XPS. De plus, lorsqu'un élément est lié à une molécule ou dans un composé, les niveaux électroniques de cœur, qui ne participent pas directement à la



formation de liaisons chimiques (établie par les électrons de valence uniquement), subissent une légère variation de leur énergie due à la modification de leur environnement chimique.

Ce déplacement énergétique, de l'ordre de quelques dixièmes à quelques électrons Volt (eV), appelé «déplacement chimique», est caractéristique de l'environnement moléculaire immédiat, de l'état de valence ou du degré d'oxydation de l'élément émetteur. La spectroscopie XPS permet donc une analyse élémentaire et chimique des différents éléments présents à la surface du matériau étudié. La profondeur d'analyse est de l'ordre de 5 nm dans le cas des matériaux polymère. La spectroscopie XPS permet donc une analyse élémentaire et chimique des différents éléments présents à la surface du matériau étudié.

Le tableau suivant représente les valeurs de référence pour les éléments carbone, azote, oxygène et soufre dans les matériaux organiques.

Groupe fonctionnel	Structure chimique	Energie de liaison (eV)
<b>C<sub>1s</sub></b>		
Hydrocarbures	C-H, C-C	285,0
Amine	C-N	285,7
Ether, alcool	C-O-C, C-O-H	286,5
Imine, nitrile	C=N, CN	287,0
Cétone, aldéhyde	C=O	287,8
Amide	N-C=O	288,0
Acide Carboxylique, ester	-COOH, -COOR	289
Carbonates	-O-C(=O)-O	290,5
<b>N<sub>1s</sub></b>		
Imine	-N=C	398,5
Amine aliphatique	-NH	399,3
Amide	N-C=O	399,8
Ammonium	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	401,5
Nitro	-NO <sub>2</sub>	405,5
<b>O<sub>1s</sub></b>		
Carbonyle	C=O, O-C=O	532,2
Alcool, éther	C-O-H, C-O-C	532,8
Ester	-O-C=O	533,7
<b>S<sub>2p</sub></b>		
Thioether (cystéine, méthionine)	C-S	164
Soufre oxidé	SO <sub>x</sub>	168

**Tableau A.1.** Déplacement chimique du C<sub>1s</sub>, N<sub>1s</sub> O<sub>1s</sub> et S<sub>2p</sub> des principaux groupes fonctionnels

### A.3. Microscopie de force atomique (AFM)

La microscopie de force atomique (AFM) permet d'imager à l'air, en milieu liquide ou sous atmosphère contrôlée des échantillons conducteurs ou non et de nature très diverse, possibilité d'observer de grands échantillons, très peu de préparation. Cette technique nous donne des formes ou des tailles caractéristiques de la surface des échantillons. Elle fait partie des microscopes en champ proche qui se caractérisent par l'utilisation d'une pointe que l'on approche très près (0,1 à 10 nm) de la surface de l'échantillon à observer. Les analyses AFM ont été effectuées avec un instrument NT-MDT (Smena Head, Solver electronics) équipé d'un cantilever standard de Silicium avec une fréquence de résonnance de 150 Hz en mode de semi contact. Les images ont été réalisées par l'instrument d'analyse de Grain avec le logiciel SPIP (Image Metrology A/S, Denmark).

Un capteur miniature est proche de la surface d'un échantillon, leurs déplacements relatifs donnent directement une cartographie de la grandeur mesurée. Le capteur de force est un ressort-lame (le cantilever), encastré à une extrémité et muni d'une pointe à l'autre. La lecture de la déflexion du ressort s'effectue par la mesure de la déviation d'un faisceau lumineux, émis par une diode laser, et réfléchi par l'extrémité du cantilever. Dans la figure présentée, l'échantillon est déplacé par rapport au point d'encastrement du cantilever. Grâce à la boucle d'asservissement, on peut obtenir des images qui correspondent à une interaction mécanique constante.

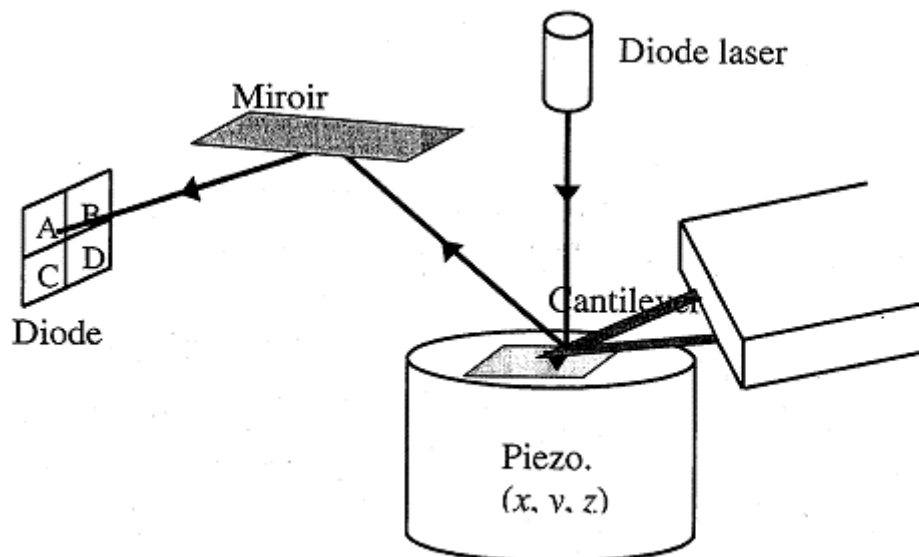


Figure A.2. Microscopie de force atomique (AFM)

#### **A.4. Microscopie électronique à balayage (MEB) et analyse EDX**

Cette technique permet de suivre les informations topographiques et de voir les contrastes de composition du matériau. Le microscope à balayage utilisé est le LEICA S440 piloté par le logiciel LEO à filament de tungstène (Laboratoire des Interfaces et Systèmes Electrochimiques (LISE-UPR15) à Ivry sur seine).

Un faisceau incident d'électrons balaye la surface de l'échantillon inclinée à 45°. La diffusion inélastique de ces électrons à travers le matériau provoque l'émission d'électrons secondaires provenant des niveaux de cœur des atomes. La quantité émise est fonction de la topographie de la surface.

Dans le cas des échantillons isolants tels que les polymères, il faut les recouvrir d'un film conducteur. C'est pour cette raison qu'on effectue préalablement sous vide d'un dépôt métallique d'or par pulvérisation à l'aide d'un plasma d'argon. L'épaisseur du dépôt métallique ainsi obtenue est de 20 nm.

Suite à l'excitation des atomes présents dans le matériau par interaction avec les électrons incidents, des photons X sont émis (processus de désexcitation). Ceci permet alors l'analyse chimique par EDX (energy dispersive X-ray analysis). L'énergie de ces photons X est caractéristique des atomes dont ils sont issus, d'où la possibilité de réaliser une analyse élémentaire. Le spectre obtenu est en fait une succession de pics correspondant à des photons X d'énergie donnée donc à un élément donné. C'est une analyse élémentaire quantitative avec un maximum d'erreur relative de l'ordre de 10 à 20 %. Elle permet de connaître la nature et la concentration des éléments présents. Tous les éléments sont détectables, sauf les éléments légers. Son seuil de détection est de 1% atomique en moyenne. Cette technique permet une analyse locale pour une profondeur de l'ordre du micron. Par contre, elle ne permet d'avoir des informations sur la forme chimique des éléments détectés.

Son principe repose sur les bandes de valence et de conduction. En effet, le rayonnement X bombardant l'échantillon est absorbé par la bande de valence et provoque un départ des électrons vers les trous de la bande de conduction. La création de paire électrons/trous provoque la création d'un photocourant. Par le biais d'un amplificateur, il est possible d'obtenir une impulsion proportionnelle à l'énergie du photon incident.

Le faisceau incident de rayons X (d'énergie 20keV) pénètre dans la couche à une profondeur de 500 nm environ permettant de connaître la composition et la présence des différents éléments plus en profondeur que dans le cas des analyses XPS dont la profondeur d'analyse est de 5 nm.

**A.5. Séquences de la trypsine**

IVGGYTCGAN	TVPYQVSLNS	GYHFCGSLI	NSQWVVSAAH	CYKSGIQVRL
GEDNINVEG	NEQFISASKS	IVHPSYNSNT	LNNDIMLIK	KSAASLNSRV
ASISLPTSCA	SAGTQCLISG	WGNTKSSGTS	YPDVLKCLKA	PILSDSSCKS
AYPGQITSNM	FCAGYLEGGK	DSCQGDSGGP	VVCSGKLQGI	VSWGSGCAQK
NKPGVYTKVC		NYVSWIKQTI		ASN

## Résumé

La technologie plasma basse pression est utilisée pour contrôler les modifications des propriétés physico-chimiques de surface des polymères, sans altérer les propriétés de cœur des matériaux. Nous avons utilisé cette technique pour activer des films de polyéthylène (PE) dans afin d'immobiliser des biomolécules à leur surface. Différents types de plasma basse pression ont été mis en œuvre afin d'incorporer des fonctions aminées, en particulier des amines primaires à la surface: plasma ammoniac,  $N_2 + H_2$  et allylamine. Dans une deuxième étape, on a fait réagir le dialdéhyde glutarique (glutaraldéhyde) avec les fonctions amines primaires de la surface (formation de liaisons imines), afin qu'il joue le rôle de bras espaceur. Enfin, la dernière étape consiste en l'immobilisation covalente de la trypsine via la réaction de l'extrémité libre du bras avec les groupements amine primaire portés par l'enzyme (résidus lysine). Dans certaines expériences, la réduction des fonctions imine en amine secondaire a été effectuée à l'aide du cyanoborohydrure de sodium. L'analyse XPS a permis de caractériser chaque étape de fixation, de la surface traitée par plasma jusqu'à l'enzyme immobilisée. Différents protocoles de rinçage des échantillons ont été testés afin de s'assurer de la bonne immobilisation de l'enzyme. L'activité enzymatique a été mesurée en suivant les cinétiques de dégradation du substrat *N*- $\alpha$ -Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester (BAEE). On a pu ainsi mettre en évidence une activité enzymatique d'environ  $0,08 \text{ U/cm}^2$  sur les échantillons traités subissant l'étape de réduction, sans relargage d'enzyme pendant les essais. L'étude de la stabilité de l'activité au cours du temps et au cours d'essais répétitifs montre une activité significative pour le deuxième essai et une décroissance progressive jusqu'au 4ème, soit après une période d'environ 2 mois.

**Mots clés:** polyéthylène, traitement plasma, quantification amines et aldéhydes, stabilité, immobilisation, trypsine, activité enzymatique, XPS

## Abstract

Cold plasma processing is a very efficient technique to modify the surface of polymers without changing their bulk properties. By this way, the immobilization of enzymes on inert supports becomes possible. In this work different plasma processes (mixture of nitrogen and hydrogen, ammonia, and allylamine) were selected in order to generate primary amine functions on the surface of low density polyethylene (PE) films. The activation of the surface by amino groups was followed by a reaction with glutaraldehyde as homobifunctional cross-linking agent leading to the first imine linkage. The enzyme was then reacted with free aldehyde functions and fixed to the surface via lysine residues (imine bond). In some cases, the reduction of the imine bonds by sodium cyanoborohydride was performed to form the stable secondary amines. The activity of the trypsin immobilized on the PE disks was assayed by kinetic measurement of *N*- $\alpha$ -Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester (BAEE) hydrolysis. The surface composition of the modified polyethylene samples was characterized by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and confirms the composition of the different layers fixed on to the surface of PE. In order to check the strength of immobilization, different washing solutions were used. Active trypsin was successfully immobilized on the surface of polyethylene with a maximal value of activity equal to  $0.080 \text{ U/cm}^2$  and no enzyme was released during the reaction. We also studied the stability of the immobilized enzyme during repetitive assays (4 assays) which showed a decrease of activity over a period of two months.

**Key words:** polyethylene, plasma treatment, quantification of amine and aldehyde, surface density, stability, immobilization, trypsin, enzymatic activity, XPS