



HAL
open science

Polymérisation par plasma froid : un outil pour l'obtention de surfaces fonctionnalisées pour les applications de type biocapteur et pour les systèmes à libération de médicaments

Cédric Amorosi

► **To cite this version:**

Cédric Amorosi. Polymérisation par plasma froid : un outil pour l'obtention de surfaces fonctionnalisées pour les applications de type biocapteur et pour les systèmes à libération de médicaments. Autre. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAE012 . tel-00864105

HAL Id: tel-00864105

<https://theses.hal.science/tel-00864105>

Submitted on 20 Sep 2013

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

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



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE : Chimie des matériaux

Laboratoire d'Ingénierie des Polymères pour les Hautes Technologies

THÈSE présentée par :

Cédric Amorosi

soutenue le : **26 juin 2012**

N° 1497

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Physique et ChimiePhysique**

***Polymérisation par plasma froid : un
outil pour l'obtention de surfaces
fonctionnalisées pour les applications
de type biocapteur et pour les systèmes
à libération de médicaments***

THÈSE dirigée par :

M^r AVEROUS Luc

Professeur, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M^{me} PONCIN-EPAILLARD Fabienne

M^r ROUCOULES Vincent

Directeur de Recherche CNRS, université du Maine

Maître de Conférences, université de Haute Alsace

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M^r VANDAMME Thierry

M^r MICHEL Marc

Professeur, université de Strasbourg

Chargé de Recherche, AMS Luxembourg

Remerciements

Cette étude s'est déroulée dans le cadre d'une collaboration entre le Laboratoire d'Ingénierie des Polymères pour les Hautes Technologies (LIPHT-ECPM) de l'Université de Strasbourg et le département des Matériaux Avancés et Structures (AMS) du Centre de Recherche Henri Tudor à Esch sur Alzette au Luxembourg. Je tiens à remercier les Directeurs Messieurs Luc Averous et David Ruch de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires respectifs.

De plus, je remercie le Professeur Luc Averous pour son implication dans la correction du manuscrit.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Docteur Marc Michel et au Professeur Vincent Ball, tout deux, Manager Scientifique au sein du CRP Henri Tudor, pour m'avoir encadré tout au long de cette étude. Je tiens également à les remercier pour leurs conseils, leurs disponibilités, leurs aides précieuses pendant toutes les épreuves que nous avons traversés ensemble lors du développement de ce travail de thèse. L'un comme l'autre, ont eu à mon égard un soutien constant et fait preuves de qualités humaines pour lesquelles je leurs en suis très reconnaissant. Je tiens également à saluer leurs humours et les idées géniales dont ils ont fait preuve durant ces trois années d'étude. Je tiens ainsi à les remercier car sans eux, cette thèse n'aurait pu être réalisée.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Monsieur Vincent Roucoules, Maître de Conférences, Université de Haute Alsace et Madame Poncin-Epaillard, Directrice de Recherche au CNRS, Le Mans, en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je leur adresse mes sincères remerciements.

Je remercie également Monsieur Thierry Vandamme, Professeur à l'Université de Strasbourg, qui me fait le grand honneur de faire partie du jury de cette thèse.

Je voudrais également remercier tous les membres du département AMS, pour leur accueil ainsi que pour le temps qu'ils ont passé afin de me former sur les différents outils de caractérisation qui m'ont permis de mener à bien cette étude.

Je tiens également à témoigner ma gratitude aux Docteurs Philippe Bertani, pour son aide précieuse en RMN et Christian Mustin pour les images en microscopie confocale.

Pour finir, je remercie mes collègues thésard et compagnons pendant ces trois ans, Julien Petersen, Rony Bechara, Gregory Mertz, Thierry Fouquet et Claude Becker grâce à qui, j'ai pu vivre trois années formidables. J'en garderais un très bon souvenir.

Abréviations

Techniques de caractérisation

<i>FTIR</i>	<i>Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier</i>
<i>XPS</i>	<i>Spectrométrie Photoélectronique X</i>
<i>MALDI-TOF</i>	<i>Ionisation/Désorption Laser Assistée par une Matrice – Analyseur à Temps de Vol</i>
<i>SIMS</i>	<i>Spectrométrie de Masse à Ionisation Secondaire</i>
<i>AFM</i>	<i>Microscope à Force Atomique</i>
<i>MEB/SEM</i>	<i>Microscope Electronique à Balayage</i>
<i>RMN</i>	<i>Résonnance Magnétique Nucléaire</i>
<i>DBD</i>	<i>Décharge à Barrière Diélectrique</i>

Produits utilisés

<i>AA</i>	<i>Acide Acrylique</i>
<i>MAA</i>	<i>Acide Méthacrylique</i>
<i>EGDMA</i>	<i>Ethylène Glycol Dimethacrylate</i>
<i>pAA</i>	<i>Poly (Acide Acrylique)</i>
<i>pMAA</i>	<i>Poly (Acide Méthacrylique)</i>
<i>PA</i>	<i>Phosphatase Alcaline</i>
<i>PNP</i>	<i>Paranitrophenyl Phosphate</i>
<i>NaCl</i>	<i>Chlorure de Sodium</i>
<i>HCl</i>	<i>Acide Chlorhydrique</i>
<i>Tris</i>	<i>Tris (hydroxyméthyl) Aminométhane</i>
<i>HA</i>	<i>Acide Hyaluronique</i>
<i>PLL</i>	<i>Poly-L-Lysine</i>
<i>PSS</i>	<i>Poly (Styrène Sulfonate) de sodium</i>
<i>PAH</i>	<i>Poly (Hydrochlorure d'Allylamine)</i>
<i>PDADMAC</i>	<i>Poly (Chlorure de Diallyldimethyl Ammonium)</i>

Sommaire

Remerciements	- 2 -
Abréviations	- 6 -
Sommaire	- 10 -
Index des Tables et Figures	- 16 -
Introduction Générale	- 26 -
Chapitre 1. Synthèse Bibliographique	- 33 -
A. Système à libération contrôlée	- 35 -
<i>A.1 Les différents stimuli extérieur</i>	- 36 -
<i>A.1.1 Réponse à la température</i>	- 37 -
<i>A.1.2 Réponse au pH</i>	- 38 -
<i>A.1.3 Autres réponses</i>	- 39 -
<i>A.2 Matrices utilisées pour la libération contrôlée de médicaments</i>	- 39 -
<i>A.2.1 Les hydrogels</i>	- 40 -
<i>A.2.2 Autres matrices</i>	- 41 -
B. Application de type biocapteur	- 42 -
<i>B.1 Introduction</i>	- 42 -
<i>B.2 L'élément de reconnaissance</i>	- 44 -
<i>B.3 Principales méthodes d'immobilisations d'enzymes</i>	- 45 -
<i>B.3.1 Affinité</i>	- 47 -
<i>B.3.2 Piégeage</i>	- 47 -
<i>B.3.3 Adsorption physique</i>	- 48 -
<i>B.3.4 Réticulation</i>	- 48 -
<i>B.3.5 Covalent</i>	- 48 -
C. Techniques de modification de surface et polymérisation par plasma froid	- 49 -
<i>C.1 Techniques de modification de surface</i>	- 49 -
<i>C.1.1 Technique Langmuir-Blodgett-Kuhn</i>	- 49 -
<i>C.1.2 Dépôt de polyélectrolyte en multicouche</i>	- 50 -
<i>C.1.3 Traitement par ultraviolet (UV) et photo greffage</i>	- 51 -
<i>C.1.4 Traitement plasma</i>	- 51 -
<i>C.1.5 Autres techniques</i>	- 52 -

<i>C.2 Plasma froid à pression atmosphérique</i>	- 52 -
<i>C.2.1 Généralités</i>	- 52 -
<i>C.2.2 Les décharges contrôlées par barrière diélectrique (DBD)</i>	- 53 -
<i>C.2.2.1 Rôle du diélectrique</i>	- 53 -
<i>C.2.2.2 Les différents types de décharge</i>	- 55 -
<i>C.2.3 Les différentes méthodes pour modifier une surface par plasma</i>	- 58 -
<i>C.2.3.1 Le traitement plasma</i>	- 59 -
<i>C.2.3.2 Le greffage après traitement plasma</i>	- 59 -
<i>C.2.3.3 Le dépôt de film mince fonctionnalisé</i>	- 59 -
<i>C.2.4 Avantages et inconvénients du procédé plasma</i>	- 61 -
Chapitre 2. Matériels et Méthodes	- 65 -
A. Matériels	- 67 -
B. Méthodes	- 71 -
<i>B.1 Dépôt des précurseurs par plasma</i>	- 71 -
<i>B.2 Techniques d'analyse de surface</i>	- 74 -
<i>B.2.1 Microscope électronique à balayage (MEB)</i>	- 74 -
<i>B.2.2 Microscope à force atomique (AFM)</i>	- 75 -
<i>B.2.3 Spectroscopie de photoélectron X (XPS)</i>	- 77 -
<i>B.3 Caractérisation de la structure chimique des films déposés</i>	- 78 -
<i>B.3.1 Spectroscopie infra rouge en transmission (T-FTIR)</i>	- 78 -
<i>B.3.2 Spectrométrie de masse par temps de vol des ions produits par désorption laser assistée par matrice (MALDI-TOF) et d'ions secondaires (SIMS)</i>	- 79 -
<i>B.3.3 Résonance Magnétique Nucléaire à l'état solide (Solid State NMR)</i>	- 82 -
<i>B.4 Techniques d'analyses en solution et par fluorescence</i>	- 82 -
<i>B.4.1 Spectroscopie UV/Visible</i>	- 82 -
<i>B.4.2 Microscopie confocal</i>	- 84 -

Chapitre 3. Résultats et Discussions	- 87 -
<i>3.1 Caractérisation de films polymères plasma obtenus à partir d'acide acrylique et méthacrylique : vitesse de croissance, morphologie, composition chimique et oligomérisation</i>	- 92 -
<i>3.2 Conception d'un film polymère plasma flexible auto supporté comme support pour l'immobilisation d'enzymes</i>	- 112 -
<i>3.3 Films polymères plasma : une alternative aux films (PSS-PAH)_n ou (PSS-PDADMAC)_n pour retenir l'activité enzymatique dans des polyélectrolytes assemblés en multicouches</i>	- 136 -
<i>3.4 Préparation en une étape d'un film polymère plasma pour la libération de médicaments</i>	- 157 -
Supporting Information	- 174 -
Conclusion Générale	- 189 -
Références Bibliographiques	- 196 -

Index des Tables et Figures

Chapitre 2. Matériels et méthodes

Tableau 1. Monomères et polymères utilisés.

Tableau 2. Composés utilisés pour la préparation des solutions tampon et les tests enzymatique.

Tableau 3. Polyélectrolytes utilisés.

Tableau 4. Produits utilisés pour les systèmes à libération de médicaments préparés en une seule étape.

Tableau 5. Produits utilisés pour la réalisation des méthodes de dérivation.

Chapitre 3. Résultats et discussions

Table 6. Values of the Yasuda parameters applied in this investigation. Note that for a given pressure and plasma power, the values of Y are not the same for MAA and AA.

Table 7. Nominal composition of the solutions used to synthesize the polymer films by APDBD.

Supporting Information

Table 1. Results of the peak fitting to the C1s core level of the XPS spectra of ppAA deposited in conditions of $Y_{intermediate}$ before chemical derivatization with TFE.

Table 2. Results of the peak fitting to the C1s core level of the XPS spectra of ppAA deposited in conditions of $Y_{intermediate}$ after chemical derivatization with TFE.

Table 3. Assigned bands of FTIR spectra for (a) ppMAA and (b) ppEGDMA.

Table 4. Possible assignments for different mass peaks obtained with MALDI-TOF for plasma polymer made of EGDMA and MAA.

Chapitre 1. Synthèse Bibliographique

Figure 1. Liste des principaux stimuli pouvant induire une réponse pour un système sensible à l'environnement.

Figure 2. Représentation schématique d'un gel sensible au pH.

Figure 3. Type de matériaux polymères sensibles à l'environnement, selon différents assemblages de macromolécules.

Figure 4. Représentation schématique du fonctionnement d'un biocapteur.

Figure 5. Représentation schématique de deux biorécepteurs A. Anticorps, B. ADN.

Figure 6. Représentation schématique des principales méthodes d'immobilisation d'enzymes.

E : Enzyme, P : Protéine inerte.

Figure 7. Représentation schématique du fonctionnement de la technique Langmuir-Blodgett.

Figure 8. Représentation schématique du procédé couche par couche dans le cas où l'assemblage s'effectue par l'intermédiaire d'espèces anionique et cationique (polyélectrolytes).

Figure 9. Relation entre tension et courant dans un plasma basse pression.

Figure 10. Oscillogramme représentant la tension et le courant pour une décharge a. filamentaire et b. lumineuse dans l'hélium pour une fréquence de 10 kHz.

Figure 11. Images représentatives d'une décharge a. filamentaire et b. lumineuse lorsque le courant est à son maximum. Le temps d'exposition est de 10 ns.

Figure 12. Courbe de Paschen présentant la tension appliquée en fonction du produit de la pression par la distance inter électrode.

Chapitre 2. Matériels et méthodes

Figure 13. a. Représentation schématique du prototype plasma. b. Photographie présentant l'ensemble du prototype.

Figure 14. Photo présentant l'électrode supérieure recouverte par le diélectrique.

Figure 15. Photo présentant a. l'atomiseur et b. l'électrode inférieure sur laquelle les échantillons à traiter sont déposés.

Figure 16. Schéma de principe d'un microscope électronique à balayage.

Figure 17. Principe du microscope à force atomique

Figure 18. Représentation d'un microscope confocal à balayage laser. La présence du trou d'aiguille permet de ne capter que les signaux lumineux venant du plan focal, améliorant ainsi la résolution de l'image.

Chapitre 3. Résultats et discussions

Figure 19. Thickness (measured by AFM) as a function of number of passes for AA and MAA to obtain ppAA and ppMAA plasma polymers deposited in conditions corresponding to different Yasuda parameters ($Y_{low} < Y_{intermediate} < Y_{high}$). The lines correspond to a linear regression to the experimental data. The Y values are listed in Table 1.

Figure 20. Typical AFM topography images ($10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$) obtained from coatings made from AA and MAA under different value of Y and after 80 passes.

Figure 21. Cross sectional SEM images obtained from the plasma polymers ppAA under conditions corresponding to the Y_{low} values and after 80 passes.

Figure 22. FTIR spectra acquired in the transmission mode for plasma polymer films made from AA (upper panel) and MAA (bottom panel) under energetic conditions corresponding to $Y_{\text{intermediate}}$. The FTIR spectrum of the monomer is displayed as a reference. The spectra are up-shifted for clarity.

Figure 23. Percentage of COOH group preservation as a function of the Y parameter for ppAA (●) and ppMAA (■) as obtained from a spectral decomposition of the carbonyl bands measured in the FTIR spectra.

Figure 24. (a) XPS spectra highlighting the Cls core level and the fits to the peaks for ppAA after TFE reaction in conditions where the film was deposited under $Y_{\text{intermediate}}$ value. (b): percentage of carboxylic group preservation determined with (●) XPS and (■) FTIR in the case of ppAA films.

Figure 25. Solvent-free MALDI mass spectra of the whole plasma-polymers deposits from a) acrylic acid and b) methacrylic acid monomers. The inset shows the zoom on the m/z 650-800 range of low and high Yasuda parameter plasma conditions. Hypothetic structures for the three main distributions spaced by 2 Da are depicted below the spectra and annotated with grey (PAA) and black (PMAA) filled squares, triangles and circles in the inset (■, ▲, ● and ■, ▲, ●).

Figure 26. Thickness (measured by AFM) as a function of number of passes for plasma polymer films made from MAA, EGDMA and mixture of them (20/80 EGDMA/MAA %molar ratio) deposited under same energetic conditions. The lines correspond to a linear regression to the experimental data.

Figure 27. FTIR spectra in transmission mode on plasma polymer films based on (a) EGDMA and (b) comonomer mixture, with the same energetic conditions. The spectra are up-shifted for clarity. The inset corresponds to a zoom of the wavenumber region associated to the carbonyl stretching vibration.

Figure 28. (a) ^{13}C CP-MAS NMR spectra of plasma polymer made from EGDMA and comonomer mixture under the same energetic conditions. The spectra are up-shifted for clarity (b) Enlarged view of the wavenumber region associated to the carbonyl band. The dashed line is a deconvolution into two Gaussian curves the dashed-dotted lines are the individual contributions.

Figure 29. Determination of functional group density in function of thickness for plasma polymer made of mixture (MAA/EGDMA) (■). The error bars correspond to one standard deviation over 3 independent measurements.

Figure 30. Typical AFM topography images (10 μm x 10 μm) obtained from coatings made of comonomer mixture.

Figure 31. XPS spectra highlighting the N1s core level for plasma polymer film made of the comonomer mixture after immersion in a. PBS solution and b. PBS solution + enzyme.

Figure 32. TOF-SIMS analysis showing the magnesium signal as a function of the profiling time (which is proportional to the depth of the profiling) of the coating made from a 20/80 EGDMA/MAA co-monomer mixture. "Si" indicates the species originating from the glass substrate.

Figure 33. Laser Scanning Confocal Microscopy images of plasma polymer films based on a 20/80 EGDMA/MAA co-monomer mixture after immersion in a buffered solution with alkaline phosphatase at 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 15 h. Self-standing film rolling over itself (1000 μm X 1000 μm).

Figure 34. a. Evolution of the absorbance at $\lambda=405$ nm of plasma polymer films based on a 20/80 EGDMA/MAA co-monomer mixture loaded with the enzyme (AP) during 15 h and put in a 3 mM PNP, for the first (■), the second (▲) and the third measurement (●). After each experiment the film was immersed in Tris-NaCl buffer and deionized water to wash away the non hydrolyzed PNP and its hydrolysis product. **b.** Evolution of the maximal absorbance reached after 4665 s for the 3 successive experiments.

Figure 35. Evolution of the absorbance at 405 nm of plasma polymer film produced from different EGDMA/MAA co-monomer mixtures loaded with the enzyme (AP) during 15 h and put in a 3 mM PNP, for the first (■), the second (▲) and the third measurement (●). After each experiment the film was immersed in Tris-NaCl buffer and deionized water to wash away PNP and its hydrolysis product.

Figure. 36. A. Evolution of the absorbance at 405 nm of a (PLL-HA)₁₅ film loaded with the enzyme (AP) during 2h and put successively in a 3 mM PNP containing Tris-NaCl buffer, for the first (●), the second (○) and the third measurement (■). After each experiment the film was immersed in Tris-NaCl buffer to wash away PNP and its hydrolysis product. The straight lines correspond to linear regressions to the experimental data.

Figure 37. A. Evolution of the absorbance at 405 nm of a (PLL-HA)₁₅ film loaded with the enzymes (AP) during 2h, with a (PAH-PSS)₂ capping layer and put successively in a 3 mM

PNP containing Tris-NaCl buffer, for the first (●), the second (○) and the third measurement (■). After each experiment the film was immersed in Tris-NaCl buffer to wash away PNP and the corresponding hydrolysis product.

B. Absorbance at 405 nm in the cuvette at the end of each enzymatic assay (●) and after 12 h of storage (○) of the PNP solutions in the absence of the quartz substrate.

Figure 38. Thickness of ppEGDMA films on silicon substrates as determined from height profile measurements on scratched films by means of AFM. The solid line is a linear regression to the data and the dotted line corresponds to the limits of the 95% confidence interval.

Figure 39. A. Kinetics of PNP hydrolysis in the presence of (PLL-HA)₁₅ + AP + 10 passes of ppEGDMA for the first (●), the second (○) and the third (■) experiment. The lines correspond to linear fits to the experimental data. **B.** Kinetics of PNP hydrolysis in the presence of (PLL-HA)₁₅ + AP + 20 passes of ppEGDMA for the third (■) experiment. The two first experiments are not displayed because they were performed only up to 5.4×10^3 s and were similar, in this time range, to the third experiment. The line corresponds to a linear fit to the experimental data for times larger than 1.2×10^4 s.

Figure 40. Evolution of the rate of the enzymatic hydrolysis of different films. The nature of the barrier is given in the inset. The lines are just aimed to guide the eye.

Figure 41. Line profiles (average over 30 lines) obtained through a scratch in films made from (PLL-HA)₁₅ + 20 EGDMA passes and (PLL-HA)₁₅ + AP + 20 EGDMA passes.

Figure 42. Typical AFM topography images obtained from the plasma polymers (a) ppMAA, (b) ppEGDMA, (c) A₁ and (d) A₂ for 20 passes. A₁ and A₂ correspond to the films produced with and without acetaminophen (see Table 8).

Figure 43. Left panel: FTIR spectra of the A₁ coating before washing (spectrum a), the same coating after washing with water (spectrum b), of the A₂ coating (spectrum c) and of pure acetaminophen (spectrum d). The right panel is a magnification of the spectra, in the 1490-1530 cm⁻¹ spectral domain, showing the presence of a band characteristic of acetaminophen in the spectrum of sample A₁.

Figure 44. MALDI-TOF mass spectra corresponding to the different samples indicated in the insets.

Figure 45. Kinetics of acetaminophen release. The full line corresponds to the fit of equation (2) to the experimental data and the dotted line corresponds to the experimental data.

Supporting Information

Figure 1. Cross sectional SEM images obtained from the plasma polymers ppAA and ppMAA under different Y conditions and after 80 passes. The scale bars are different in the different micrographs.

Figure 2. FTIR spectra acquired in the transmission mode for plasma polymer films made from AA (left panel) and MAA (right panel) under energetic conditions corresponding to Y_{low} (lower panel) and Y_{high} (upper panel).

Figure 3. Determination of the F/O ratio on films spin coated from poly (acrylic) and poly (methacrylic) acid solutions versus TFE labeling time. The lines are only aimed to guide the eyes. The error bars correspond to one standard deviation over 3 independent measurements.

Figure 4. XPS survey spectra for plasma polymer films made from AA under energetic conditions corresponding to $Y_{intermediate}$ before (left) and after (right) reaction with TFE.

Figure 5. Confocal microscopy images of plasma polymer films deposited on PS substrate after immersion in buffered solution with enzyme. **a.** Thickness measurement of the membrane ($\sim 4\mu\text{m}$), **b.** approximately spot height ($\sim 20\mu\text{m}$).

Figure 6. Evolution of the thickness of $(\text{PLL-HA})_n$ films deposited in the presence of NaCl 0.15 M solutions (\bullet) and of the same films put in the presence of alkaline phosphatase at $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in the same electrolyte during 2h. The films were dried under a nitrogen stream before thickness measurement with spectroscopic ellipsometry. The thickness values correspond to the average of 5 measurements along the main axis of the silicon substrates and the error bars to one standard deviation.

Figure 7. Evolution of the absorbance at 405 nm of a $(\text{PLL-HA})_{15}$ film loaded with the enzyme (AP) during 2h, with a $(\text{PDADMAC-PSS})_2$ capping layer and put successively in a 3 mM PNP containing Tris-NaCl buffer, for the first (\blacksquare) and the second (\bullet) measurement. The lines correspond to linear regressions to the experimental data. The slopes of these lines are given in the inset.

Figure 8. Representation of the dynamic Atmospheric Pressure Plasma Dielectric Barrier Discharges (APDBD) open air reactor used in this investigation.

Figure 9. FTIR spectra acquired in the transmission mode for plasma polymer films made from MAA. The FTIR spectrum of the monomer is displayed as a reference. The spectra are up-shifted for clarity.

Figure 10. FTIR spectra acquired in the transmission mode for plasma polymer films made from EGDMA. The FTIR spectrum of the monomer is displayed as a reference. The spectra are up-shifted for clarity.

Figure 11. ^{13}C CPMAS spectra of plasma polymer made from MAA. The spectrum of the monomer is displayed as a reference. The different carbon atoms are assigned in the inset. The spectra are up-shifted for clarity.

Figure 12. ^{13}C CPMAS spectra of plasma polymer made from EGDMA. The spectrum of the monomer is displayed as a reference. The different carbon atoms are assigned in the inset. The spectra are up-shifted for clarity.

Figure 13. MALDI-TOF mass spectra corresponding to the structure of the plasma polymer made of EGDMA and MAA.

Introduction Générale

La création de nouveaux matériaux interagissant avec le milieu extérieur est devenue un domaine de recherche très actif combinant plusieurs disciplines telles que les sciences médicales, la chimie, la biologie, la physique et l'ingénierie. Le but de cette approche pluridisciplinaire est de synthétiser de nouveaux matériaux destinés à interagir avec des systèmes biologiques actifs afin de créer, d'augmenter ou de remplacer les fonctions naturelles de l'organisme vivant. Le fait que la réponse biologique d'un matériau est principalement liée à sa surface montre l'importance de trouver des méthodes de fonctionnalisation contrôlable et reproductible. Dans ce but, la fonctionnalisation par procédé plasma est devenue en l'espace de quelques années, une approche très prometteuse.

Le terme plasma fut utilisé pour la première fois par Lewi Tonks et Irvin Langmuir en 1929 pour décrire une collection de particules chargées [1]. La définition fut plus tard étendue afin de décrire un état de la matière (le 4^{ème} état de la matière) dans lequel on retrouve un ensemble d'espèces chargées, excitées et neutres incluant les électrons, des radicaux, des photons et des atomes où des molécules chargés positivement et négativement [2-4].

Le contrôle des interactions entre cellules et surface des matériaux peut être réalisé grâce à l'immobilisation de molécules actives sur des matériaux dont la surface a été modifiée par plasma. Il s'agit de fournir des cibles spécifiques pour la reconnaissance et la croissance de cellules. Différents procédés plasma [5] ont ainsi été utilisés pour produire des surfaces caractérisées par des groupements fonctionnels qui autorisent l'immobilisation de biomolécules par le biais d'interactions fortes (liaison covalentes par exemple) ou par celui d'interactions faibles (Van der Waals, électrostatiques...).

Ces groupements sont aussi une des caractéristiques principales des polymères répondant à des stimuli extérieurs bien spécifiques. En effet, ces polymères dit 'intelligent' voit leur comportement modifier face à différents stimuli tel que le pH, la température, la force ionique, le potentiel électrique, le champ magnétique, la lumière ou encore le son. Ils ont montré depuis peu un grand intérêt dans le cadre de certaines applications tels que les biocapteurs, la libération contrôlé de médicament, la biocatalyse, l'ingénierie des tissus ou encore les actuateurs.

Les polymères sensibles au pH sont capables d'accepter ou de céder un proton en réponse à un changement d'environnement. Les systèmes à base de poly (allylamine) se dissolvent ou gonflent (dans le cas d'un film réticulé) davantage à pH faible tandis que les gels à base d'acide poly acrylique (pAA) se dissolvent plus facilement à pH élevé.

De ce fait, les polymères 'hydrogels' fabriqués à partir de chaînes réticulées montrent de grosses différences en ce qui concerne leur propriété de gonflement en fonction de l'environnement. Une propriété intéressante de ce genre de système est la possibilité d'ajuster le gonflement et la réponse au pH en utilisant des monomères neutres tel que le 2-hydroxyethyl méthacrylate. Les co-monomères obtenus tendent à augmenter le caractère hydrophobe de la chaîne et donc à modifier le comportement face au pH. On peut alors citer les hydrogels à base d'acide méthacrylique (MAA) et de polyéthylène glycol (PEO) largement étudiés dans la littérature [6]. A faible pH, des liaisons hydrogène sont observées entre le groupement acide du PMAA et le groupement éther du PEO. Ces interactions conduisent à une contraction du gel tandis qu'à pH élevé, le groupement acide s'ionise menant à une rupture des liaisons hydrogène et à un gonflement du gel. Ce gonflement est alors directement proportionnel à la proportion d'acide méthacrylique dans le copolymère.

L'objectif principal de cette thèse de doctorat a été la mise en œuvre et la caractérisation de polymères obtenus par polymérisation plasma pour des applications du type : systèmes à libération contrôlés et biocapteurs. Le choix de l'acide acrylique et méthacrylique en tant que précurseur s'est principalement fait en raison des groupements carboxyliques présents dans leurs structure et nécessaire pour le bon fonctionnement des applications visées. Les systèmes développés ont été obtenus à l'aide d'un prototype expérimental. Cet outil a été fourni par le groupe 'VITO's plasma technology' dans le cadre d'un projet national intitulé 'TRASU' (traitement de surface). Il fut principalement développé pour le dépôt de films minces sur des aciers galvanisés afin d'améliorer la résistance à la corrosion. Ce prototype, contrairement aux autres réacteurs plasma disponibles en laboratoire, permet :

- l'élimination de systèmes de pompage sous vide onéreux indispensable pour les traitements à faible pression et en atmosphère contrôlée.
- d'obtenir des vitesses de déposition de plusieurs centaines de nanomètres par minute en fonction du précurseur utilisé.
- le traitement de surfaces importantes (de l'ordre du m²).

Cette étude s'est déroulée dans le cadre d'une collaboration entre le Laboratoire d'Ingénierie des Polymères pour les Hautes Technologies (LIPHT-ECPM) de l'Université de Strasbourg

et le département des Matériaux Avancés et Structures (AMS) du Centre Henri Tudor à Esch sur Alzette, Luxembourg.

Ce manuscrit, dont les résultats sont organisés autour d'articles scientifiques en anglais publiés ou soumis dans des journaux internationaux, est structuré en trois parties distinctes.

Le chapitre 1 présente un état de l'art sur les différents systèmes qui seront retenus et étudiés. Cette étude bibliographique s'est focalisée dans un premier temps sur les systèmes sensibles à l'environnement en insistant sur 2 types de stimuli en particulier : le pH et la température avant de présenter les différentes matrices présentes dans la littérature. La deuxième partie, introduit les biocapteurs avec les différentes familles de biorécepteurs en insistant sur les enzymes qui ont largement été utilisées dans la littérature pour ce type d'applications. La troisième et dernière partie de ce premier chapitre présente les différentes méthodes de dépôt utilisées pour l'obtention de ces différents systèmes. Une étude plus approfondie concernant la polymérisation par plasma qui est de nos jours considérée comme une technique prometteuse et polyvalente pour l'obtention de films avec des groupements fonctionnels sans affecter les propriétés intrinsèques du matériau sur lequel ils sont déposés est réalisée de façon plus approfondie.

Le chapitre 2 passe en revue les matériels et méthodes employés afin de mener à bien cette étude.

Le chapitre 3, expose l'ensemble des résultats obtenus concernant les films déposés pour les applications visées, et ceci notamment au travers de la présentation d'un ensemble d'articles publiés et/ou soumis, tels que :

1. Caractérisation de films polymères plasma obtenus à partir d'acide acrylique et méthacrylique : vitesse de croissance, morphologie, composition chimique et oligomérisation
2. Conception d'un film polymère plasma flexible auto supporté comme support pour l'immobilisation d'enzymes

3. Films polymères plasma : une alternative aux films (PSS-PAH)_n ou (PSS-PDADMAC)_n pour retenir l'activité enzymatique dans des polyélectrolytes assemblés en multicouches

4. Préparation en une étape d'un film polymère plasma pour la libération de médicaments

Chapitre 1

-

Synthèse Bibliographique

La première partie de ce chapitre permet de mettre en évidence, la possibilité d'obtenir des films dont la quantité de groupements fonctionnels peut être modifiée en fonction des paramètres opératoires et du précurseur utilisés. Cette partie montre le développement des outils nécessaires à la caractérisation des films polymères obtenus par polymérisation plasma. La partie 2 montre l'intérêt d'ajouter un agent réticulant lors de la phase de polymérisation pour l'obtention d'un support permettant l'immobilisation d'enzymes, pour des applications capteur. En effet, pour des applications de types biocapteurs ou systèmes à libération contrôlée de principes actifs, il est nécessaire de synthétiser des couches stables en milieu aqueux.

La troisième partie met en évidence la possibilité de créer des systèmes barrières par procédé plasma à pression atmosphérique.

La dernière partie met en évidence la possibilité de piéger, durant la phase de déposition, une molécule de faible poids moléculaire. Une partie des molécules introduites durant la phase de déposition pouvant ensuite être libérée de façon lente et progressive lorsque l'échantillon est immergé dans une solution aqueuse.

Pour finir, une partie présentant des conclusions générales permet de résumer les principaux résultats issus de cette étude et les perspectives qui en découlent.

A. Système à libération contrôlée

L'objectif de cette première partie est de décrire le concept de système à libération contrôlée. On verra ainsi qu'il en existe différents types.

Si des groupements polaires tels que les groupements carboxyle, hydroxyle ou amine sont introduits à la surface d'un matériau, une amélioration de certaines propriétés existantes, voire de nouvelles propriétés, peuvent être obtenues (meilleure mouillabilité, meilleur caractère polaire et meilleures propriétés hydrophile par exemple) [7-9]. L'utilisation de précurseurs à base de groupements carboxyliques est alors devenue une voie intéressante pour l'obtention de surfaces spécifiques principalement dans deux domaines d'applications. Le premier concerne le développement de surfaces hydrophiles. Dans ce cas, les fonctions hydrophiles sont nécessaires uniquement sur l'extrême surface. Le second, est l'obtention de surface avec une réactivité bien définie. La quantité de fonctions accessibles est alors d'une grande importance puisque les groupements fonctionnels ne sont plus limités à l'extrême

surface. Les groupements accessibles dus au gonflement de la membrane sont alors à considérer.

En plus de ces propriétés, certains types de polymères possèdent des propriétés relatives aux changements d'environnement. En effet, des transitions peuvent être observées (gonflement, contraction) lorsque par exemple un changement de température est effectué. Parmi ces polymères, on peut citer les dérivés du Poly (*N*-Isopropylacrylamide) (PNIPAAm) [10]. Ces systèmes montrent une réduction de la solubilité ainsi qu'une contraction prononcée avec l'augmentation de la température. L'intérêt majeur de ces systèmes réside dans le fait qu'il est possible de libérer une molécule d'intérêt de façon contrôlée à un endroit donné. Aussi connu sous les noms de 'matériaux sensibles à l'environnement' ou encore 'matériaux intelligents', ces polymères sont donc capables, lors d'un changement d'environnement, de modifier leurs structures en passant pour certain d'un état hydrophile à un état hydrophobe [11].

A.1 Les différents stimuli extérieurs

Certains paramètres environnementaux, tels que la température, le pH, l'environnement électrique... ont un fort impact sur notre organisme. Pour ces raisons, les polymères sensibles à ces paramètres peuvent être sélectionnés dans le cadre de systèmes à libération de médicaments.

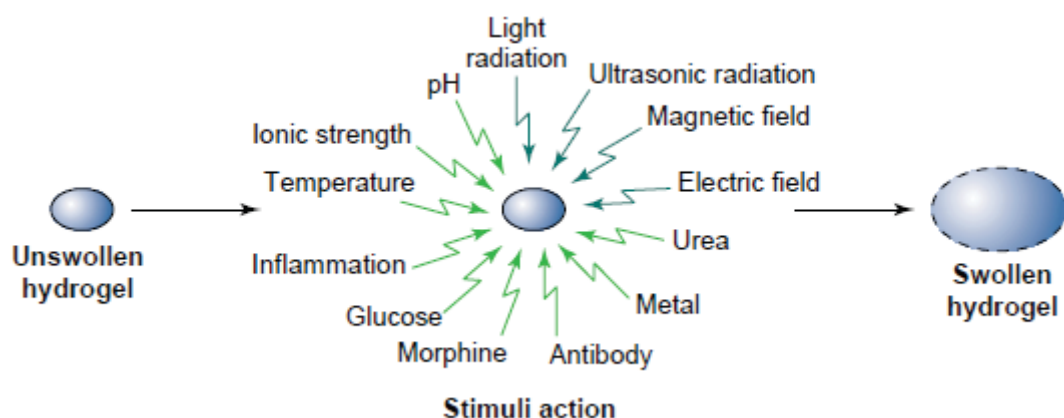


Figure 1. Liste des principaux stimuli pouvant induire une réponse pour un système sensible à l'environnement [12].

A.1.1 Réponse à la Température

Les gels sensibles à la température font partie des systèmes les plus étudiés dans le cadre des systèmes à libération de médicaments [13-15]. La première caractéristique de ce genre de polymère est la présence de groupements hydrophobes, tels que les groupements méthyle, éthyle ou encore propyle. Ces gels voient leur solubilité diminuer lorsque la température augmente à l'inverse de la plupart des polymères. A faible température, les liaisons hydrogène entre les segments hydrophiles des chaînes polymères et les molécules d'eau sont prépondérantes, ce qui se traduit par une augmentation de la solubilisation dans le milieu aqueux. Lorsque la température augmente, les interactions hydrophobes deviennent plus fortes tandis que les liaisons hydrogène s'affaiblissent. Ce comportement mène à une contraction du gel suite à l'augmentation des interactions hydrophobes entre les chaînes. Les polymères à base de PNIPAAm sont très largement utilisés en additionnant d'autres monomères afin de jouer sur la valeur de LCST (Low Critical Solution Temperature) [14-17] correspondant à la valeur de température pour laquelle on observe un changement de comportement du gel. L'objectif étant d'optimiser la réponse du gel en fonction des températures de l'environnement. En général, plus la proportion de partie hydrophobe dans le polymère est élevée, plus la LCST est faible.

A.1.2 Réponse au pH

Dans le cas des polymères sensibles au pH, l'élément clef du système est la présence de groupements ionisables attachés à une chaîne hydrophobe [12, 18, 19]. En effet, ils sont généralement produits par l'ajout d'un groupement fonctionnel acide ou basique à la chaîne polymère. Ces derniers sont capables d'accepter ou de donner un proton en fonction du pH et de la force ionique de la solution. Lors de l'ionisation, les chaînes enroulées s'étendent, par la répulsion électrostatique des charges générées. Le niveau d'ionisation de ces gels dépend du nombre de groupements acides/basiques présents sur la chaîne. Une augmentation des groupements acide résulte en une augmentation de l'hydrophilicité du réseau et à un meilleur gonflement aux pH élevés. Inversement, les hydrogels contenant des groupements basiques tels que les amines, s'ionisent et montrent des répulsions électrostatiques à pH faible. Une des propriétés intéressantes de ce genre de système est la possibilité d'ajuster le gonflement et la réponse au pH en utilisant des monomères neutres tel que le 2-hydroxyethyl méthacrylate [20]. Les co-monomères obtenus tendent à augmenter le caractère hydrophobe de la chaîne et donc à modifier le comportement face au pH.

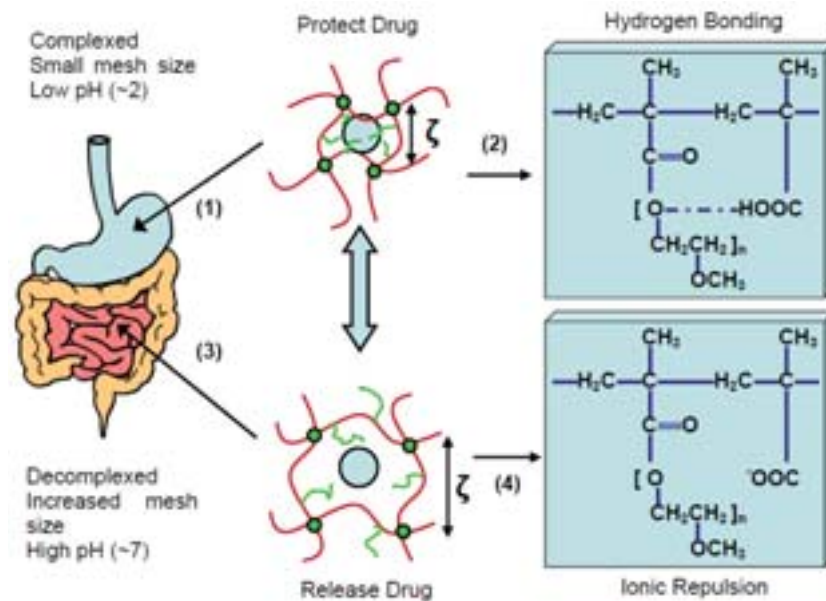


Figure 2. Représentation schématique d'un gel sensible au pH [21].

Un exemple de systèmes sensibles au pH est donné par la figure 2. Le gel, constitué de groupements carboxyliques, se contracte à pH acide (estomac), par le biais d'interactions faibles (liaisons hydrogène), empêchant la libération du médicament. Pour des valeurs supérieures au pKa de la matrice (intestin), les interactions faibles sont largement affaiblies suite à la dé-protonation des groupements carboxyliques menant à un gonflement de la matrice et à la libération du médicament.

A.1.3 Autres réponses

Il existe de nombreuses revues concernant les différents mécanismes de libération et de modifications de systèmes sensibles à l'environnement [22, 23]. Celles-ci montrent qu'il existe des gels sensibles au courant électrique [24], constitués, comme pour les systèmes sensibles au pH, d'espèces ionisables. Ces matériaux subissent une contraction ou un gonflement en présence d'un champ électrique. Les systèmes sensibles à la lumière peuvent être séparés en deux catégories, ceux sensibles aux rayonnements UV et les autres sensibles aux rayonnements visibles. Les gels sensibles au rayonnement UV peuvent être synthétisés en introduisant une molécule qui une fois irradiée, se rompt, libérant ainsi la molécule d'intérêt. C'est le cas, par exemple, des esters o-nitrobenzyl [25, 26]. Les gels sensibles aux rayonnements visibles quant à eux sont préparés en introduisant des chromophores sensibles à la lumière.

A.2 Matrices utilisées pour la libération contrôlée de médicaments

Les types et formes de matrices utilisées dans le cadre de systèmes à libération contrôlée sont nombreux (Figure 3) [27]. On peut citer les micelles, les membranes, les capsules, les hydrogels... Dans la suite, on discutera quelques-unes d'entre elles de manière non exhaustive, en se focalisant principalement sur les gels.

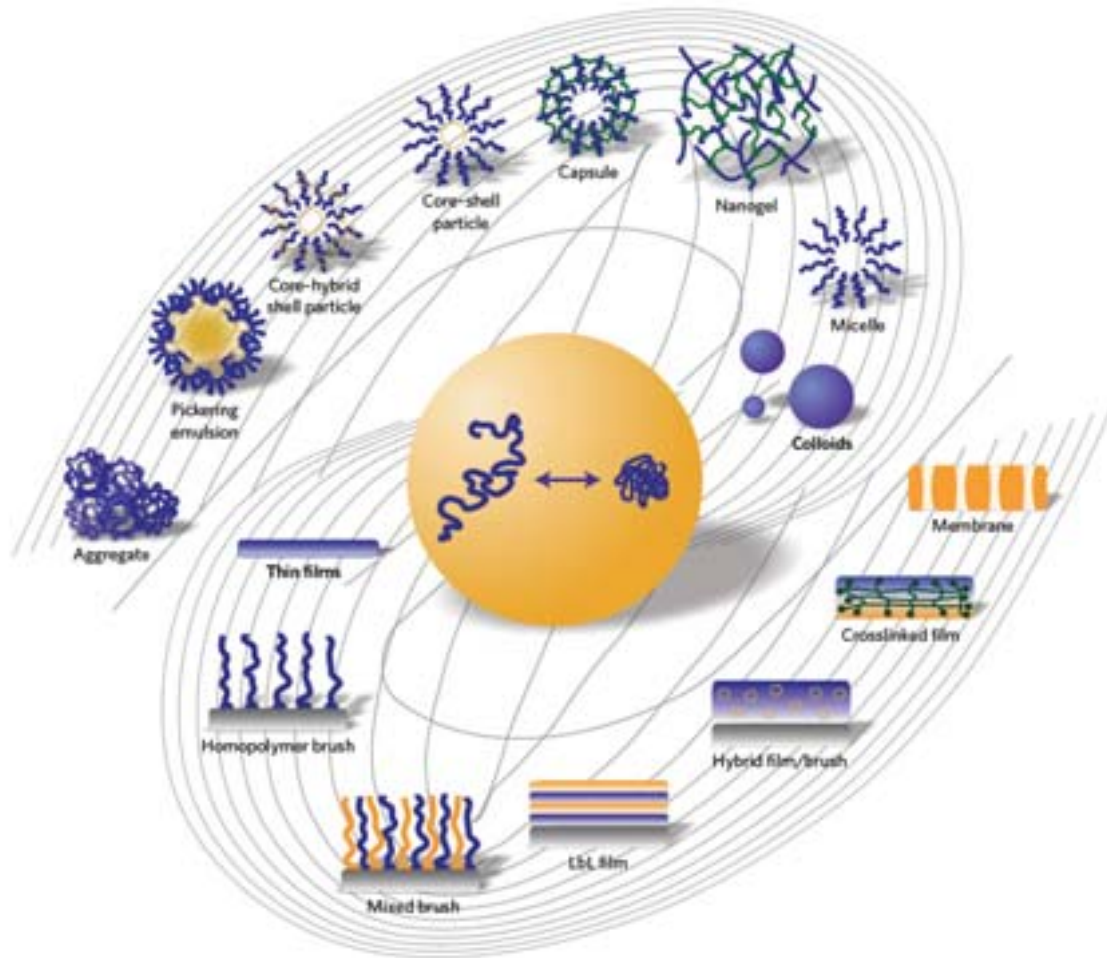


Figure 3. Type de matériaux polymères sensibles à l'environnement, selon différents assemblages de macromolécules [28].

A.2.1 Les hydrogels

En 1968, il a été observé qu'une répulsion entre un polymère et un solvant peut engendrer une transition de phase et un changement dans le degré de gonflement [29]. Ces polymères ont été décrits comme des matériaux tridimensionnels, hydrophiles, dont le réseau polymère est capable d'absorber une grosse quantité d'eau (> 20%) ou de fluide biologique [30]. Le réseau est constitué d'homopolymère ou de copolymère, et il est insoluble grâce à une réticulation physique ou chimique. Les hydrogels présentent ainsi une compatibilité thermodynamique avec l'eau qui permet leur gonflement lors d'un contact avec une solution aqueuse. La transition de phase a lieu en réponse aux changements d'environnement tels que le pH, la force ionique, la température ou encore les variations électriques. De manière générale, les hydrogels peuvent être préparés à partir de polymères synthétiques ou naturels [31]. Ainsi, les hydrogels fabriqués à partir de polymères d'origine naturelle (biopolymères)

possèdent une faible tenue mécanique. Ils offrent toutefois certaines propriétés avantageuses telles qu'une biocompatibilité inhérente, une biodégradabilité et des groupements fonctionnels supportant l'activité cellulaire. Les polymères synthétiques quant à eux, ne possèdent pas ces propriétés de bioactivité inhérente. Ils ont néanmoins des structures bien définies qui peuvent être modifiées dans le but d'obtenir les propriétés de dégradabilité et les groupements fonctionnels nécessaires à l'immobilisation de cellules et autres biomolécules [32]. Les hydrogels peuvent être formés par réticulation physique [33, 34] ou chimique [35, 36], d'homopolymère ou copolymères, pour donner un réseau tridimensionnel avec des caractéristiques chimiques et mécaniques spécifiques. La réticulation peut être réalisée par des interactions covalentes (gels chimiques) ou non (gels physiques) [32]. Ces derniers sont caractérisés par un réseau tridimensionnel dans lequel les chaînes polymères sont liées par des interactions faibles. Une approche pour créer une réticulation physique consiste en des interactions hydrophobes dans lesquelles les blocs hydrophobes sont couplés à des blocs hydrophiles, sur les bases d'un polymère amphiphile. Néanmoins, il existe d'autres interactions permettant d'obtenir ce genre de polymères telles que les interactions électrostatiques ou les liaisons hydrogène jouant le rôle d'une réticulation physique inter chaînes. Lorsque la liaison entre les polymères est covalente, la réticulation est de type chimique fournissant ainsi une meilleure stabilité mécanique. Les approches pour obtenir ce type de structure sont axées sur la polymérisation radicalaire, l'irradiation ou encore l'utilisation d'enzymes [36].

A.2.2 Autres matrices

Les systèmes colloïdaux tels que les solutions de micelles, de vésicules et les nanoparticules [37-40] de diamètre compris entre 10 et 400 nm sont très utilisés dans le cadre de l'obtention de systèmes à libération contrôlée de principes actifs. L'objectif de ces systèmes étant principalement d'optimiser à la fois la capacité à stocker la molécule dans le réseau et les propriétés de libération mais aussi d'obtenir une durée de préservation la plus longue possible. Dans le cas des micelles provenant de l'auto assemblage de copolymères amphiphiles [41], les médicaments peuvent être physiquement piégés dans le noyau des micelles et transportés à des concentrations qui peuvent dépasser leur solubilité intrinsèque dans l'eau. Une des caractéristiques intéressantes de l'utilisation de copolymères à blocs, à base de molécules amphiphiles pour des systèmes à libération de principes actifs, est que leurs compositions chimiques, leurs poids moléculaires et le rapport des longueurs des blocs

(partie hydrophobe/hydrophile) peuvent être ajustés en fonction du résultat souhaité. Ceci permet un bon contrôle de la taille et de la morphologie des micelles. Les liposomes quant à eux correspondent à une forme de vésicule qui consiste en une ou plusieurs couches de lipides. Le caractère polaire du cœur des liposomes permet l'encapsulation de molécules polaires. Ainsi les molécules amphiphiles et lipophiles sont solubilisées dans la bicouche lipidique en fonction de leur affinité envers le lipide. La molécule est alors capable de diffuser à travers la membrane. Pour finir, les nanoparticules solides sont capables d'adsorber ou bien d'encapsuler une molécule, la protégeant ainsi des différents types de dégradations (chimique et enzymatique).

B. Application de type biocapteur

B.1 Introduction

Après avoir vu les systèmes à libération contrôlée, nous allons nous focaliser sur une seconde application : les biocapteurs. Dans cette partie, nous nous sommes principalement intéressés à la partie active du biocapteur.

La détection et la quantification d'une espèce chimique ou biologique peuvent être faites soit à l'aide d'instruments d'analyses tels que les chromatographes ou les divers spectromètres, soit à l'aide de capteurs spécifiques. Leland C. Clark [42] fut le premier à utiliser une enzyme immobilisée à la surface d'une électrode afin de doser l'oxygène dans le sang et définir le terme 'biocapteur'. Il s'agit d'un dispositif constitué d'une partie biosélective (enzyme, anticorps, ARN) qui permet la reconnaissance spécifique d'une espèce. Le biorécepteur est immobilisé sur un transducteur qui transforme l'interaction biochimique en un signal électrique pouvant ensuite être interprété par un opérateur (Figure 4). Le dispositif complet permet ainsi d'obtenir à partir de l'espèce à détecter dans la solution, toute l'information utile à son évaluation [43]. Ils ont pour avantages d'être compact, de conception technologique simple, de coût relativement faible, facile à manipuler et surtout ils sont adaptés à l'analyse *in-situ*. Les applications potentielles des biocapteurs sont considérables, que ce soit dans le contrôle de la production pharmaceutique, environnemental (l'analyse de l'eau : pesticides, métaux...), agroalimentaire (dosage du lactose, analyse des viandes...) ou dans le domaine médical (dosage du glucose, cholestérol...) qui en fait un domaine de prédilection et de fort développement actuel. L'exemple le plus connu est celui des capteurs basés sur la glucose oxydase largement développés pour les personnes atteintes de diabète.

Les biocapteurs peuvent être séparés en deux groupes en fonction du type de biorécepteurs utilisés : (i) ceux disposant d'une affinité avec l'analyte, (ii) ceux ayant des propriétés catalytiques basées sur l'activité de l'élément de reconnaissance. Les biocapteurs disposant d'une affinité pour leur analyte font référence à des dispositifs intégrant des biorécepteurs immobilisés qui sont capables d'interagir de façon réversible et sélective avec la molécule cible. Le mécanisme n'étant aucunement destructif [44]. Les biocapteurs catalytiques disposent d'une protéine comme élément de reconnaissance qui, en plus de lier l'analyte, catalyse la réaction avec celui-ci pour donner un produit. C'est le cas par exemple, des capteurs au glucose [45]. Cependant, pour des raisons de stabilité, il arrive parfois que l'enzyme doit être utilisée dans son environnement initial, et c'est alors la cellule ou le microorganisme tout entier qui sera immobilisé sur le transducteur.

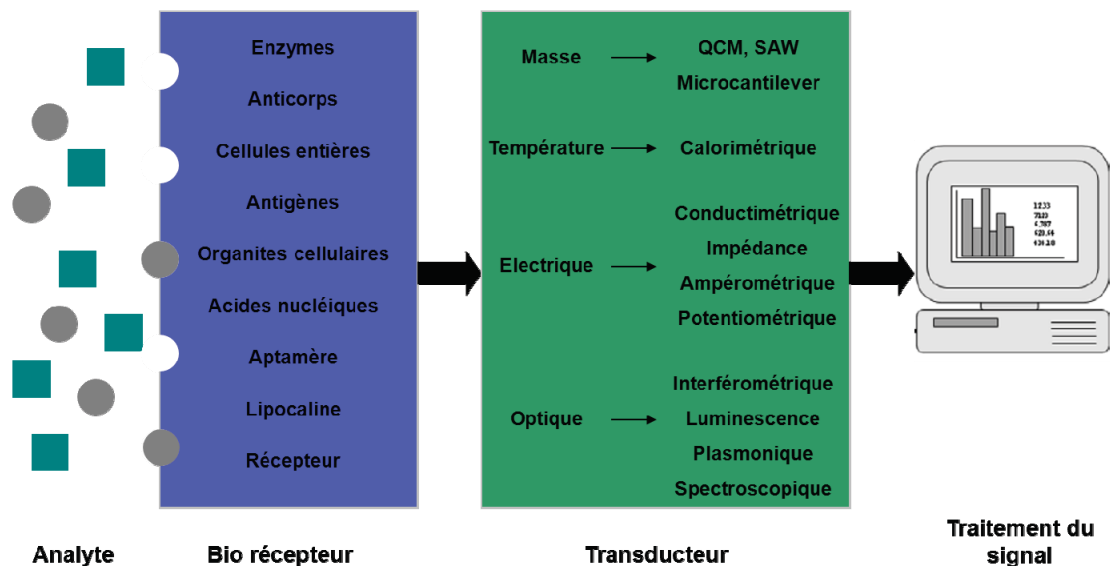


Figure 4. Représentation schématique du fonctionnement d'un biocapteur.

Le biocapteur idéal se doit d'être robuste, sélectif, reproductible et sensible à de faibles concentrations. Actuellement, les études s'orientent vers la recherche de nouveaux matériaux permettant l'immobilisation de biomolécules sans altérer leur efficacité. Il n'existe pas de domaine privilégié puisque les travaux s'étendent de l'utilisation des membranes ou de polymères jusqu'à l'emploi de divers composés inorganiques. Les biorécepteurs les plus utilisés actuellement sont basés sur des interactions de type anticorps/antigènes, acides nucléiques, enzymatiques, cellules ou encore via des matériaux synthétiques. Concernant la classification des transducteurs, les techniques conventionnelles incluent l'électrochimie

(ampérométrie, potentiométrie, impédance...) [46], la piézoélectricité (QCM, SAW, BAW) [47], l'optique (luminescence, SPR...) [48] et la calorimétrie [49].

B.2 L'élément de reconnaissance

L'élément de reconnaissance est très important dans la fabrication de biocapteurs car il se doit d'être sélectif pour un type d'analyte. Comme discuté précédemment, les biorécepteurs peuvent être divisés en deux groupes distincts : catalytiques et non catalytiques. Le groupe catalytique inclut les enzymes et les micro-organismes. Le groupe des non catalytiques, quant à lui, inclut les anticorps (Figure 5A), qui sont des protéines produites par notre système immunitaire et qui disposent comme seule caractéristique de sites de reconnaissance d'antigènes capables de lier des antigènes via des interactions non covalentes de façon très spécifique, avec souvent une forte affinité [44]. Il comprend aussi les différents récepteurs et les acides nucléiques dont l'ADN ou encore l'ARN font partie (Figure 5B). De forts développements se sont récemment développés autour des systèmes synthétiques. Parmi eux, on peut citer les polymères à empreinte moléculaire [50] basés sur l'impression moléculaire. Elle consiste à enrober des molécules chimiques cibles, dites 'templates', dans un réseau polymérique tridimensionnel et à considérer l'empreinte obtenue comme le 'mime' d'une interaction enzyme-substrat. La préparation d'une empreinte moléculaire est basée sur un procédé de polymérisation de dimères et monomères : les dimères appelés 'cross-linkers' ou réticulant et qui créent la matrice polymérique, enrobent un complexe 'monomère(s) fonctionnalisés(s)/template'. Les monomères fonctionnels doivent former des interactions spécifiques avec la molécule cible à imprimer. L'extraction de la molécule cible fournit alors un réseau polymérique poreux dans lequel les cavités et l'arrangement spatial des groupes fonctionnels correspondent au négatif de la molécule cible.

Les enzymes sont des acteurs omniprésents dans la vie de la cellule. Sans ces éléments, aucune réaction du métabolisme des cellules ne serait possible. Les enzymes sont considérées comme des catalyseurs et de ce fait possèdent des propriétés qui leurs sont spécifiques. L'enzyme reste intacte une fois la réaction réalisée, elle n'est donc pas consommée et peut donc engendrer de nouvelles réactions. Elle ne modifie pas la nature de la réaction, ni son équilibre, ni son bilan thermodynamique. La réaction est possible même en l'absence de l'enzyme. L'enzyme modifie la vitesse de la réaction en diminuant l'énergie d'activation de la réaction. Elle possède néanmoins certaines limitations liées à la conservation de son activité. Celle-ci est fortement influencée par le pH, la température et la force ionique de la

solution avec laquelle elle est en contact [51]. Certaines méthodes, en particulier concernant leur immobilisation, ont été développées afin d'améliorer leur stabilité.

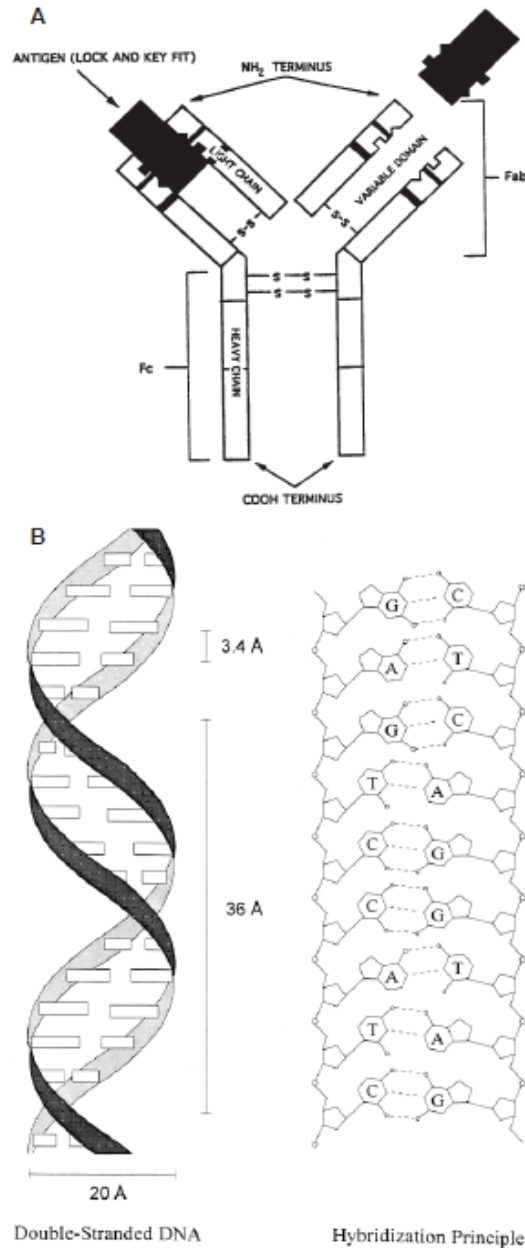


Figure 5. Représentation schématique de deux biorécepteurs A. Anticorps, B. ADN [52].

B.3 Principales méthodes d'immobilisations d'enzymes

L'immobilisation d'enzymes sur la surface du transducteur est une étape indispensable pour la création d'un biocapteur, c'est d'ailleurs une des raisons pour laquelle un certain nombre de méthodes ont été développées. Le choix de la méthode d'immobilisation doit tenir compte des performances du capteur visé. Les enzymes, une fois immobilisées, se doivent de conserver leurs structures, leurs différentes fonctions ainsi que leurs activités catalytiques et

se doivent d'interagir avec le substrat de façon suffisamment forte, afin d'éviter leur désorption lors de l'utilisation du biocapteur. De plus, la sensibilité diminue si la méthode d'immobilisation cause la dénaturation de l'enzyme ou un changement dans sa conformation. A l'inverse, une meilleure sensibilité peut être obtenue lorsque l'enzyme est correctement orientée à la surface du transducteur ou en choisissant correctement la nature de la fonction servant à lier de façon covalente l'enzyme au substrat. Une bonne orientation permet à l'enzyme d'exposer sa partie active à la solution tandis que l'utilisation d'une liaison covalente diminue la mobilité de l'enzyme permettant ainsi une interaction accrue avec son substrat. Les facteurs tels que la précision lors de la mesure, la reproductibilité ou encore le temps de vie de l'enzyme sont fortement influencés par ces phénomènes [51]. C'est pourquoi, la qualité d'un biocapteur est fortement affectée par la méthode d'immobilisation choisie.

Comparé aux techniques conventionnelles de catalyse chimique, les enzymes en tant que catalyseurs ont une capacité catalytique et un degré de spécificité plus élevés qui les autorisent à bio-catalyser une série de réactions de biotransformation. Dans le but d'exploiter au mieux les propriétés de ces enzymes, il est recommandé de les utiliser immobilisées afin d'améliorer leurs efficacités. Beaucoup d'efforts ont été employés afin de modifier les propriétés de surface des matériaux par l'introduction de groupements fonctionnels capables d'améliorer l'hydrophilicité, en créant des environnements proches de ceux dans lesquelles les enzymes évoluent naturellement. Le pH, la température ou encore la conductivité ionique sont autant de paramètres pouvant affecter la propriété catalytique de l'enzyme. Les propriétés à l'interface d'une couche de protéines adsorbées se détériorent avec le temps à cause de deux effets : l'effet Vroman et le temps de dépliage [53], qui tous deux affectent la conformation de la protéine et donc son activité. D'un autre côté, en modifiant l'hydrophobicité de surface, la quantité de protéine adsorbée va tendre à diminuer. Une des techniques les plus utilisées pour ce genre de méthode est le greffage de polyéthylène glycol (PEO) à la surface du substrat. La surface devient plus hydrophile grâce à la nature très polaire du PEO ce qui permet d'obtenir des surfaces antibactériennes [54]. Les gels, quant à eux, peuvent être utilisés comme supports dans le cadre de l'immobilisation de protéines. En effet, ils permettent de stabiliser sa conformation et de conserver son activité biologique en la protégeant des éventuelles dégradations chimiques et autres liées à l'environnement dans lequel l'enzyme sera utilisée. Celles-ci peuvent être immobilisées soit par rétention physique, soit par liaisons chimiques. On peut aussi combiner les deux méthodes pour assurer une meilleure fixation de l'enzyme. En effet, la liaison covalente 'enzyme-matrice' est généralement la technique d'immobilisation la plus stable.

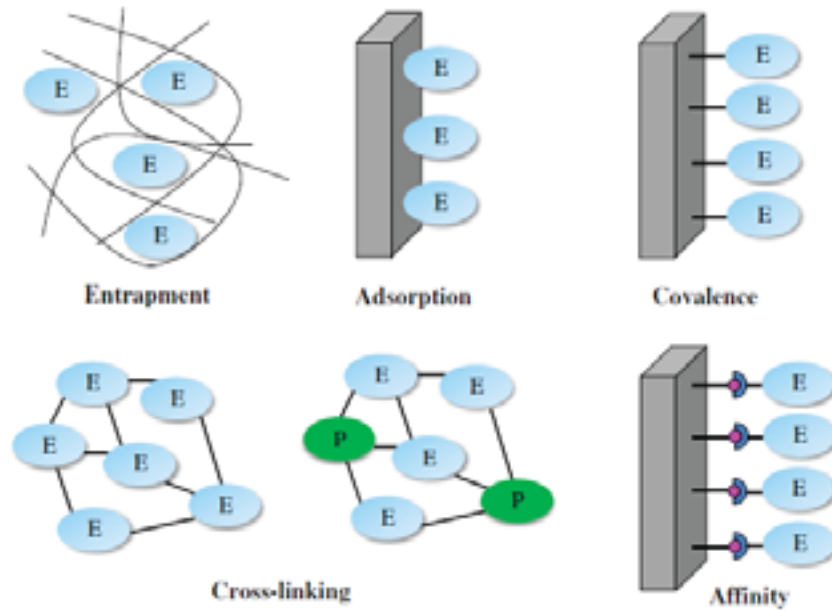


Figure 6. Représentation schématique des principales méthodes d'immobilisation d'enzymes. E : Enzyme, P : Protéine inerte [55].

B.3.1 Affinité

Cette méthode consiste à immobiliser l'enzyme de façon spécifique et orientée dans le but de préserver ses propriétés catalytiques. Pour ce faire, il est alors nécessaire de créer une affinité entre le support activé et un groupe spécifique introduit à la protéine [56]. Cette méthode permet le contrôle de l'orientation de la molécule. Certaines enzymes possèdent dans leurs structures les groupements nécessaires à ce genre d'immobilisation. Dans la plupart des cas, il est toutefois nécessaire de les lier par différentes méthodes [57].

B.3.2 Piégeage

L'enzyme est emprisonnée à l'intérieur du réseau tridimensionnel d'une matrice qui peut être de différentes natures (gels, réseaux amphiphiles et autres) [56, 58-62]. La maille de la matrice contrôle alors la rétention purement physique de l'enzyme et permet la diffusion du substrat enzymatique. Cette approche a l'avantage d'être facile à réaliser. La conformation de l'enzyme n'est pas modifiée ce qui lui permet de conserver ses propriétés. Néanmoins les performances peuvent être diminuées par la barrière de diffusion du substrat vers l'enzyme.

B.3.3 Adsorption physique

Les enzymes adsorbées à la surface de substrats solides représentent la méthode d'immobilisation physique la plus simple [63]. Elle se réalise sur des supports inertes (verres, cellulose, charbon actif, silicium). La fixation se fait par l'interaction des groupes fonctionnels de l'enzyme et du support (liaisons hydrogène, forces de Van der Waals, interactions ioniques...) [64-67]. Le substrat n'a pas besoin d'être fonctionnalisé et permet une bonne préservation du pouvoir catalytique de l'enzyme. Cette adsorption exige des conditions de pH et de force ionique très précises. La moindre variation d'un de ces paramètres provoque une désorption, ce qui limite l'utilisation de cette technique.

B.3.4 Réticulation

Ce procédé consiste à réticuler l'enzyme à l'aide d'un agent bi ou multi fonctionnel tel que, l'hexamethylenediamine, le glyoxal ou encore le glutaraldehyde qui possède à ses extrémités deux groupements aldéhyde capables de réagir avec les fonctions amine des protéines [68, 69]. L'enzyme peut dans certain cas se lier avec elle-même ou en présence d'une protéine fonctionnelle inerte telle que l'albumine du sérum bovin (BSA).

B.3.5 Covalent

Le couplage covalent entre l'enzyme et le substrat (verre, cellulose, polymère) est une méthode très développée dans la production de biocapteur. Une liaison est établie entre un groupement fonctionnel de l'enzyme, qui ne contribue pas à son activité catalytique, et un groupement fonctionnel du support préalablement activé, par différents réactifs tels que le glutaraldéhyde ou le carbodiimide. Ce dernier permet la liaison entre le groupement carboxyle du substrat et la fonction amine de l'enzyme. Le N-hydroxysuccinimide (NHS) peut lui être associé dans le but d'améliorer l'efficacité de l'immobilisation [70, 71]. De la même manière, le carbodiimide permet la liaison entre le groupement amine du substrat et la fonction carboxylique de l'enzyme [72].

Malgré les nombreux avantages liés à l'utilisation d'enzymes immobilisées, il est intéressant de souligner que leur activité catalytique, comme on a pu le voir précédemment, peut parfois être diminuée. En effet, à la vitesse de réaction enzymatique proprement dite, il faut ajouter l'effet du microenvironnement qui conditionne toute l'activité catalytique. Ainsi, les

phénomènes de diffusion limitent l'accès du substrat au niveau du site enzymatique. Ceci a pour conséquence une variation de la vitesse de catalyse de l'enzyme. De même, le pH de l'enzyme peut être modifié, en particulier lorsque la réaction enzymatique met en jeu une libération ou une consommation de protons.

Après la description des principaux systèmes applicatifs, la partie suivante sera dédiée à la description de la polymérisation par plasma qui a déjà été employée afin d'élaborer les deux systèmes décrits précédemment : (i) les systèmes à libération contrôlée et (ii) les biocapteurs.

C. Techniques de modification de surface et polymérisation par plasma froid

Cette partie aborde les questions plutôt générales des méthodes de déposition avant une focalisation sur la polymérisation par plasma.

Afin d'obtenir de nouvelles propriétés, il est notamment nécessaire de fonctionnaliser la surface des matériaux. Cette approche consiste à attacher, de façon covalente, des groupements chimiques fonctionnels spécifiques sur une surface. En modifiant ainsi la surface de ces matériaux, il est possible d'obtenir des matériaux polymères possédant des propriétés uniques. En effet, il va être facile de jouer sur certaines propriétés tel que l'énergie de surface du matériau, la balance hydrophobe/hydrophile, la réactivité, les propriétés mécaniques (réticulation de la surface), la conductivité électrique ou encore la barrière au gaz suivant l'application souhaitée et les propriétés visées. Dans ce contexte, un certain nombre de méthodes ont été développées qui sont principalement choisies en fonction du type de matériau et de la surface à fonctionnaliser.

C.1 Techniques de modification de surface

C.1.1 Technique Langmuir-Blodgett-Kuhn

La technique Langmuir-Blodgett consiste au transfert de molécules amphiphiles d'une interface eau-air à une interface solide-air [73]. Il s'agit d'un film de molécules orientées à l'interface air-eau qui peut être transféré sous la forme d'un film très mince sur la surface d'un solide. Les molécules amphiphiles sont déposées à la surface d'une solution aqueuse. La surface où se trouvent les molécules est alors diminuée grâce à l'utilisation de deux barrières qui vont servir à orienter les molécules (Figure 7). La partie hydrophile (tête) est alors immergée dans l'eau tandis que la partie hydrophobe compressée (la queue) reste émergée.

Le substrat est alors plongé puis sorti de la solution tandis que la pression de surface est conservée par la barrière. A chaque immersion du substrat dans la solution, une monocouche est créée à sa surface. Malheureusement, les propriétés mécaniques des couches obtenues sont faibles. C'est pourquoi, certaines stratégies ont été développées dans le but d'optimiser ces propriétés en réticulant la couche par l'intermédiaire de molécules insaturées et d'une irradiation UV pour démarrer la polymérisation.

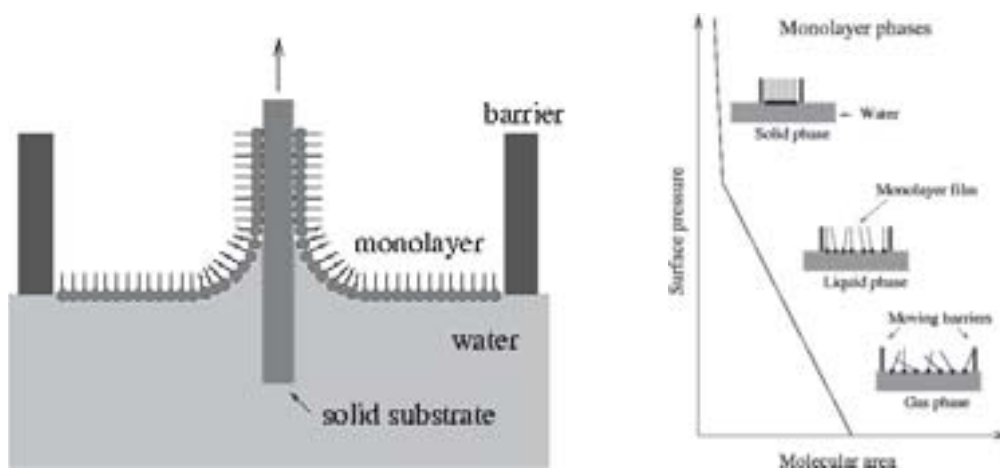


Figure 7. Représentation schématique du fonctionnement de la technique Langmuir-Blodgett [74].

C.1.2 Déposition de polyélectrolyte en multicouche

Cette méthode, qui a vu son intérêt fortement progresser à partir des années 2000, permet de déposer facilement des couches de polymère à la surface d'un substrat [75-77]. Cette technique est basée sur l'adsorption alternée d'espèces attractives telles que les couples cations/anions, donneurs/accepteurs de liaison hydrogène... Cette procédure peut alors être répétée afin de donner des films minces d'épaisseur pouvant aller du nanomètre au micromètre. Habituellement construits en immergeant le substrat dans la solution aqueuse, la technique LbL pour 'Layer by Layer' où 'couche par couche' a été étendue à d'autres procédés tel que le spray, le 'spin coating' ou encore l'électrophorèse [78]. En utilisant des polyélectrolytes fonctionnalisés par différents groupements, il est possible d'obtenir des films stables dont les propriétés peuvent varier en fonction de l'application visée.

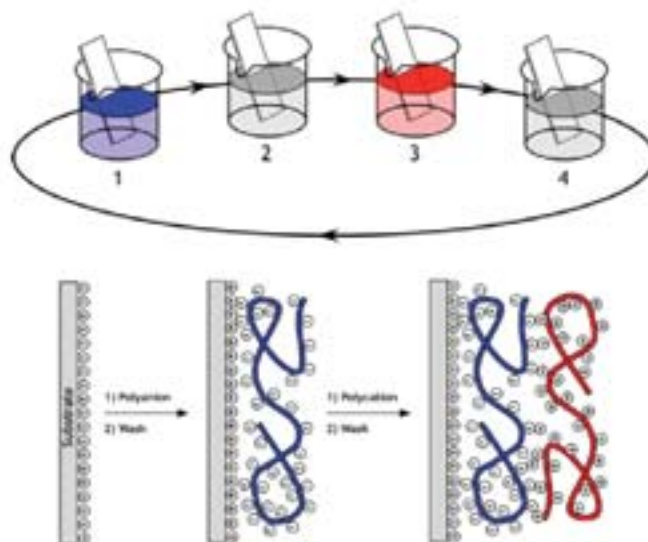


Figure 8. Représentation schématique du procédé couche par couche dans le cas où l'assemblage s'effectue par l'intermédiaire d'espèces anionique et cationique (polyélectrolytes) [77].

C.1.3 Traitement par ultraviolet (UV) et photo greffage

Le traitement UV [79, 80] est beaucoup utilisé dans le cadre de la polymérisation par greffage de polymère en présence de photo-initiateurs et photo-sensibilisateurs. En fonction de la structure chimique du polymère à greffer, différentes fonctionnalités peuvent être introduites à la surface. Les rayons UV peuvent être appliqués lorsque l'échantillon est submergé dans un gaz inerte tel que l'argon ou couvert avec une solution de monomères. Dans la plupart des cas, le photo-initiateur, comme par exemple la benzophénone, est pré déposé sur le substrat ou directement présent dans la solution. Dans la littérature, la complexité des procédés de photo-greffage a bien été démontrée. Pour ce faire, une investigation systématique sur les effets des principaux paramètres déterminant la densité de greffage est réalisée. Le lien entre temps d'irradiation, ratio molaire, concentration du monomère et du photo-initiateur, du rayonnement UV et du solvant détermine le degré moyen de greffage.

C.1.4 Traitement plasma

Quand un polymère est exposé un certain temps au plasma, différents phénomènes peuvent être observés [81-83]. Une perte de masse peut avoir lieu liée à l'ablation de la première couche proche de la surface. Cette perte de masse est fortement liée au type de polymère utilisé ainsi qu'à l'énergie appliquée dans le plasma. Les polymères sensibles à ce type de

phénomène sont ceux constitués de groupements fonctionnels comprenant de l'oxygène comme les éthers, les esters, les cétones ou encore les groupements carboxyliques. Le type de gaz utilisé pour traiter le polymère joue aussi un rôle important sur le traitement de surface. L'utilisation de gaz nobles mène généralement à des ruptures de chaînes suivie d'une réticulation, un procédé plus connu sous le nom de CASING (crosslinking via inert gas activated species) [82]. Les gaz halogénés ou oxydants quant à eux, en plus de la perte de matière liée à l'ablation, engendrent des modifications permanentes de surface. D'autres traitements basés sur l'utilisation de plasma à base d'oxygène sont très utilisés dans le cadre de l'obtention de surface avec de bonnes propriétés de mouillabilité et d'adhésion [84].

C.1.5 Autres techniques

Il existe néanmoins d'autres techniques permettant de modifier les propriétés de surface d'un matériau [85, 86]. Parmi elles, on peut citer L'ATRP (Atom Transfer Radical Polymerization) dont on peut trouver dans la littérature un certain nombre de revues récentes [76].

Les procédés de traitements de surfaces par voie humide avec solvants deviennent de plus en plus limités de par leurs effets néfastes sur l'environnement ainsi que pour des raisons de sécurité et d'application de la réglementation REACH. Un autre problème est lié à la diffusion des produits chimiques pouvant impacter les propriétés mécaniques du substrat. Dans le cas du plasma, ce phénomène disparaît puisque le procédé plasma est considéré comme étant une technique de déposition par voie sèche capable de traiter différents matériaux sans affecter les propriétés intrinsèques de celui-ci [87].

C.2 Plasma froid à pression atmosphérique

C.2.1 Généralités

Le terme plasma fut utilisé pour la première fois par Lewi Tonks et Irvin Langmuir en 1929 pour décrire une collection de particules chargées dans leurs études des oscillations de la région interne d'une décharge électrique [1]. La définition fut plus tard étendue pour décrire un état de la matière (le 4^{ème} état de la matière) dans lequel on retrouve un ensemble d'espèces chargées, excitées et neutres incluant les électrons, les atomes ou molécules chargées positivement et négativement, les radicaux et les photons [2-4]. Le concept de quatrième état de la matière vient de l'idée que les transitions de phases s'effectuent en

fournissant progressivement l'énergie à la matière comme observé lorsque l'on passe de l'état solide à l'état de gaz. Le plasma est créé en appliquant à un gaz une énergie suffisante pour réorganiser la structure électronique des espèces (atomes, molécules...) menant à la production d'espèces excitées et d'ions. Dans l'ensemble, le plasma est électriquement neutre. Il existe plusieurs types de plasma qui se différencient principalement par leurs propriétés thermodynamiques [2]. On peut ainsi séparer les plasmas dit thermiques (ou en équilibre thermodynamique) des plasmas non thermique (ou hors équilibre thermodynamique). Le premier type de plasma inclus les plasmas chauds à pression élevée ($>10^3$ Pa) avec des températures électroniques supérieures à 10^4 K. Dans ce type de système, la fréquence des collisions est élevée autorisant le transfert d'énergie des électrons vers les autres espèces. On observe ainsi une thermalisation des différentes espèces vers une température d'équilibre thermodynamique. Le degré d'ionisation ainsi obtenu est souvent proche ou égal à 100%. Dans le cas des plasmas non thermiques (froid), les différentes espèces présentes disposent de différentes températures. Ainsi, on retrouve des électrons avec des températures avoisinant les 10^4 K tandis que la température des ions et des neutres avoisine l'ambient. Les plasmas froids ont un degré d'ionisation beaucoup plus faible que les plasmas chauds, aux alentours de 10^{-4} à 10^{-1} %. Ce dernier système est donc tout à fait adapté au traitement des matériaux organiques sensibles aux températures élevées. Le plasma peut être généré en laboratoire par différentes énergies tel que les énergies mécaniques (proche d'une compression adiabatique), thermiques (fours chauffés électriquement), chimiques (réactions exothermiques), radiatives (faisceaux d'électrons) et électromagnétiques (corona, courant direct, radio fréquence).

C.2.2 Les décharges contrôlées par barrière diélectrique (DBD)

C.2.2.1 Rôle du diélectrique

Un grand nombre d'articles concernant les dispositifs adaptés pour le laboratoire comme pour l'industrie sont accessibles dans la littérature scientifique actuelle. Les traitements corona furent les premières décharges utilisées pour le traitement des polymères dans l'air. Ce système est largement utilisé dans l'industrie du fait de la possibilité d'obtention d'un plasma stable à pression atmosphérique. Ce résultat est obtenu grâce à l'utilisation d'une barrière diélectrique. Néanmoins, avant d'introduire le diélectrique et son rôle dans le plasma, il est intéressant d'étudier la relation qui existe entre le courant et la tension de décharge dans le cas d'un plasma basse pression. La figure 9 montre quatre régions qui peuvent être définies

comme suit : la première région qui correspond à la décharge Townsend ou sombre, la seconde région correspondant à la décharge luminescente normale, région dans laquelle sont effectués les traitements de surface à basse pression, la troisième, à la décharge luminescente anormale et pour finir la région 4 qui peut être associée au domaine où se forme l'arc électrique, région dans laquelle le plasma devient très conducteur suite à une chute de tension et une montée du courant fulgurante. Cette dernière est donc à éviter car inadaptée pour le traitement de surface. Malheureusement, pour plusieurs gaz, l'initiation de la décharge à 1 bar mène directement à l'arc électrique (région 4) ce qui rend très difficile l'obtention d'un plasma stable à pression atmosphérique. Pour éviter la formation d'un arc, le courant doit donc être limité en intensité. Pour ce faire, la présence d'une barrière diélectrique entre les deux électrodes est la solution la plus simple et facile pour obtenir un plasma froid à pression atmosphérique.

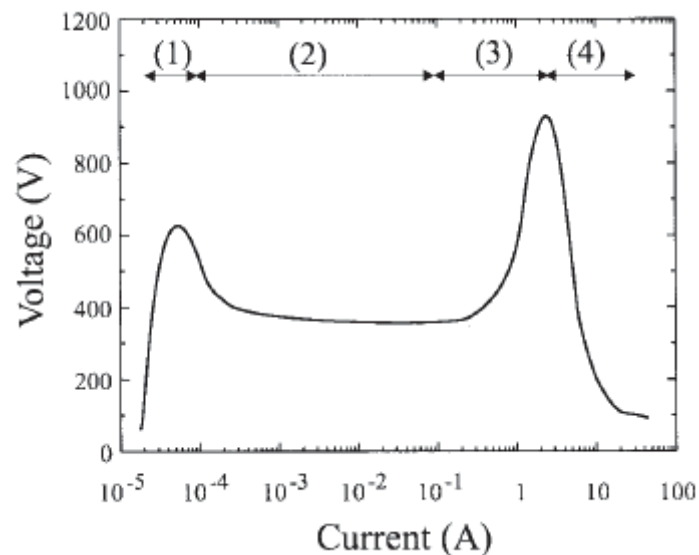


Figure 9. Relation entre tension et courant dans un plasma basse pression [88].

Ce type de décharge a été découvert par Siemens en 1857 [77] pour la génération d'ozone et est généré entre deux plaques métalliques parallèles dont une au moins est recouverte par une fine couche de diélectrique ou d'un matériau avec une forte constante diélectrique. Ce matériau permet d'accumuler des charges sur sa surface ce qui limite le champ électrique entre les deux électrodes, évitant ainsi le passage à l'arc électrique. L'utilisation d'une alimentation Haute Tension (HT) alternative est donc nécessaire dans ce cas, pour compenser les charges créées en surface à chaque alternance et ainsi éviter l'extinction du plasma.

L'utilisation du diélectrique permet également de répartir ces micros décharges sur l'ensemble de la surface de l'électrode grâce à 'l'effet mémoire' lié aux charges accumulées sur la surface. Pour le traitement des polymères, qui sont des matériaux diélectriques, ce type de décharge à pression atmosphérique est particulièrement adapté.

C.2.2.2 Les différents types de décharge

Il existe un certain nombre de facteurs donnant lieu à une modification de régime dans le plasma. Parmi eux, on peut citer les propriétés intrinsèques du diélectrique, le gaz utilisé lors de la décharge ou encore la configuration des électrodes.

On peut alors classer les décharges à barrière diélectrique en deux catégories : les décharges filamenteuses (FDBD) et les décharges luminescentes (GDBD). Le régime filamentaire fut la première catégorie de décharge opérationnelle reportée dans la littérature et est toujours le plus populaire dans la communauté plasma [89]. Quand la tension appliquée est suffisamment élevée pour claquer la décharge dans le gaz à pression atmosphérique, un grand nombre de microdécharges distribué aléatoirement dans le temps et l'espace peut être observé menant à une structure filamentaire ('streamers') [90]. Les streamers ainsi formés sont caractérisés par une densité d'électrons élevée et une réactivité accrue (radicaux et ions). Cette avalanche qui s'amplifie très rapidement ne peut pas être observée normalement à basse pression car dans ce cas-ci, le libre parcours moyen est grand et la densité du gaz est faible, ce qui fait que les électrons ne subissent pas un nombre suffisant de collisions pour faire en sorte que l'avalanche d'électrons atteigne les dimensions suffisantes. C'est pourquoi les décharges filamenteuses se produisent principalement à des pressions assez élevées.

Il y a quelques années, l'obtention d'une décharge à barrière diélectrique dans laquelle aucune trace de microdécharge n'est observée, a été rapportée. Depuis 1988, Okazaki, Kogoma et al. de l'université de Sophia à Tokyo [91] ont publié les premiers travaux dans ce domaine utilisant une tension sinusoïdale dans différents gaz avec et sans additifs. Ils ont observé que certaines conditions sont nécessaires pour l'obtention d'une décharge stable et homogène. Les mesures électriques permettent de montrer que la décharge homogène luminescente est caractérisée par un courant périodique (Figure 10).

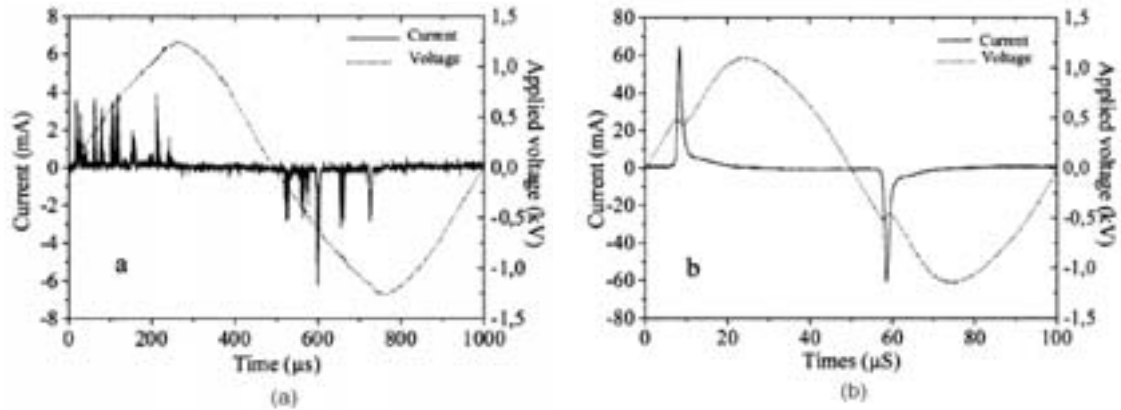


Figure 10. Oscillogramme représentant la tension et le courant pour une décharge **a.** filamentaire et **b.** lumineuse dans l'hélium pour une fréquence de 10 kHz [90].

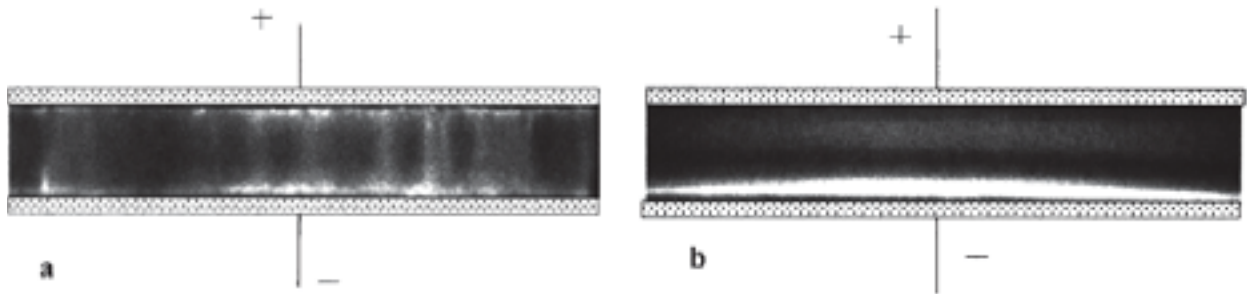
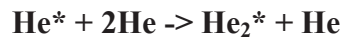


Figure 11. Images représentatives d'une décharge **a.** filamentaire et **b.** lumineuse lorsque le courant est à son maximum. Le temps d'exposition est de 10 ns [90].

Le terme de 'décharge lumineuse' (glow discharge) a été utilisé par les auteurs en raison des similitudes observées entre le régime de DBD d'aspect homogène et la véritable décharge lumineuse obtenue à faible produit pression-distance. Les différents mécanismes pouvant permettre cette création d'électrons germes dans le gaz sont à l'origine d'une séparation des GDBD en deux catégories proposée par Massines et al. [92] : 'Atmospheric Pressure Glow Discharge' (APGD) obtenues dans l'hélium et autres gaz nobles et 'Atmospheric Pressure Townsend Discharge' (APTD) obtenues dans l'azote.

Généralement pour chaque appareil DBD avec ses caractéristiques architecturales et électriques, il est possible de déterminer les conditions fréquence/tension qui définissent le domaine d'existence de la GDBD pour un gaz pur comme l'hélium ou l'azote qui sont normalement utilisés comme gaz principal dans les procédés de dépôts. L'addition d'un monomère réactif réduit généralement la fenêtre d'obtention de la GDBD. En effet si la concentration du gaz réactif dans le flux dépasse un certain seuil qui dépend du gaz principal et de la structure du précurseur, l'obtention de la décharge lumineuse est annulée et la

transition vers une décharge filamentaire est observée. C'est pourquoi, la fenêtre d'opération de la décharge luminescente doit être évaluée avec précaution dans le but d'obtenir un bon contrôle du dépôt. Comme on a pu le voir précédemment, le gaz fait partie des paramètres pouvant influencer le type de décharge. En utilisant des gaz plasma tel que l'hélium, l'argon, l'azote ou encore l'air, il est possible d'obtenir des décharges luminescentes ou filamenteuses à pression atmosphérique. L'homogénéité observée dans une décharge hélium est liée à l'existence de niveau d'énergie élevé des métastables [93, 94] et des durées de vie importantes (7900s pour le 2^3S) [95]. Les états métastables sont ainsi obtenus par collisions avec les électrons présents dans la phase gaz :



Ces niveaux d'énergie élevés retournent dans leur état initial en émettant un photon. Une décharge homogène permet généralement d'obtenir des dépôts homogènes. Néanmoins l'existence de métastables et la présence d'autres espèces excitées modifient les mécanismes de déposition observés entre les plasmas atmosphériques et les plasmas à basses pressions. Ces espèces peuvent occasionner des collisions avec les molécules du précurseur pour initier la nucléation et engendrer des mécanismes de croissances, de la même façon que les électrons pour les systèmes sous vide. La quantité d'impureté dans le gaz joue alors un rôle important puisqu'il contrôle la densité d'espèces métastables. L'oxygène perturbe la décharge en annihilant les métastables d'hélium qui ont pour but de stabiliser la décharge [96]. Il est alors important d'avoir un bon contrôle des constituants présents dans l'atmosphère où va être créé le plasma afin d'obtenir un traitement le plus homogène possible.

C.2.3 Les différentes méthodes pour modifier une surface par plasma

Afin de mieux comprendre comment le plasma peut générer une large variété de groupements fonctionnels, il est nécessaire d'analyser son interaction avec le substrat. Dans le gaz, les espèces les plus influencées par le champ électrique sont les électrons puisqu'ils sont chargés et disposent d'une masse plus faible que les espèces neutres et les ions. Par conséquent, le principal acteur du transfert d'énergie dans le plasma est l'électron. Il peut ainsi causer des collisions élastiques ou inélastiques avec les particules plus lourdes. Les collisions inélastiques sont responsables de la création des espèces réactives du plasma et sont donc responsables de la chimie du plasma tandis que les collisions élastiques vont être responsables de l'augmentation de température des particules lourdes. Comme discuté plus haut, des particules chargées (les ions et les électrons) sont présents dans le plasma. On trouve aussi des atomes, des molécules, des métastables et des radicaux dans la zone active du plasma ainsi que des photons (UV). Toutes ces particules vont interagir de façon différente avec le substrat, menant à une large variété de processus en surface. La profondeur affectée du substrat par les photons peut aller jusque plusieurs dizaines de nanomètres tandis que la limite pour les autres particules se situe en dessous de 10 nm. Cela signifie bien que le plasma affecte seulement l'extrême surface du substrat. Il est donc considéré comme une technique de modification de surface. Cela a un côté positif dans la mesure où les propriétés intrinsèques du matériau ne sont pas influencées mais aussi un côté négatif car la contamination de surface peut être préjudiciable au procédé. C'est ainsi que l'interaction des espèces actives dans le plasma avec le substrat peut à la fois mener à l'addition ou à la suppression de particules sur le substrat. Lors du passage d'un substrat polymère dans ou à proximité d'une décharge électrique à pression atmosphérique, il survient une modification de la surface de l'échantillon tant sur le plan morphologique que chimique. En effet, l'énergie injectée sur le matériau peut permettre d'augmenter la température à la surface du substrat ou de créer des liaisons chimiques à la surface du matériau. Il est alors possible de classer en plusieurs catégories les traitements plasma.

C.2.3.1 Le traitement plasma

Le traitement de surface fait référence à une augmentation de l'énergie de surface. Certains traitements augmentent l'affinité du substrat par rapport à d'autres substances. Ceci est nécessaire dans le cas de matériau disposant de faible énergie de surface comme par exemple les polyoléfinés. Ce type de traitement est généralement réalisé à partir de gaz inerte menant à la formation de groupements fonctionnels à la surface du matériau ou à la création de radicaux libres. Ces derniers peuvent être utilisés pour de la réticulation ou du greffage de surface. Les gaz principalement utilisés sont l'argon (Ar), l'hélium (He), l'oxygène (O₂), l'azote (N₂), l'ammoniac (NH₃) ou encore le téflon (CF₄) pour l'obtention de surfaces hydrophobes [97]. Les groupements ainsi introduits peuvent être utilisés pour lier des polymères ou d'autres molécules à la surface du matériau traité dans le but d'atteindre les propriétés de surfaces désirées.

C.2.3.2 Le greffage après traitement plasma

L'utilisation d'hélium ou d'argon est connue pour introduire des radicaux à la surface du substrat sans incorporer de groupements fonctionnels ou de polymères déposés par plasma [98]. Si ces radicaux libres sont exposés à l'atmosphère ou à de l'oxygène, des groupements peroxydes ou hydroperoxydes peuvent être formés. Ces derniers peuvent être utilisés pour amorcer une réaction de polymérisation. A noter dans ce cas que le monomère n'est pas soumis au plasma. Ainsi le polymère greffé aura la même composition que le polymère obtenu par polymérisation radicalaire [99-101]. La quantité de sites amorceur de la polymérisation (radicaux, fonctions peroxyde et hydroperoxyde) est donc un paramètre important à contrôler dans ce type de procédé.

C.2.3.3 Le dépôt de film mince fonctionnalisé

Dans le cas de la polymérisation classique, un amorceur produit les radicaux qui vont ensuite réagir avec les monomères présents dans la solution qui à leur tour vont produire d'autres radicaux. Ces derniers vont alors réagir avec d'autres monomères dans un processus répétitif pour former au final une chaîne polymère. Dans le cas de la polymérisation par plasma, la polymérisation est amorcée par la formation d'une espèce active, généralement sous une forme radicalaire, dans la phase gaz. Ce radical est créé à partir d'une collision avec une particule énergétique (ions, métastables, électrons) ou par irradiation UV. Une liaison est

alors rompue suivi d'une polymérisation [102, 103]. Du fait que les films obtenus par polymérisation plasma sont souvent obtenu par recombinaison radicalaire aléatoire, il est généralement accepté que leurs structures sont différentes de celle des polymères conventionnels [104]. Elle est généralement plus désordonnée et présente un degré de réticulation et de ramification élevé. Il est toutefois important de déterminer les paramètres opératoires influençant la polymérisation. Ainsi, la puissance appliquée lors de la décharge et le temps de résidence du monomère dans le plasma font partie des paramètres ayant le plus d'influence sur la composition du film déposé à la surface. Yasuda et al. [105] ont montré que la vitesse de dépôt du polymère pouvait être reliée aux paramètres opératoires du plasma par la relation W/FM où W représente la puissance appliquée à la décharge, F le flux de monomère introduit dans la zone plasma et M la masse molaire du monomère. Ainsi cette relation correspond à l'énergie appliquée par quantité de monomères introduit dans le plasma. Afin d'optimiser le dépôt en réduisant la fragmentation du précurseur, l'utilisation d'énergie élevée est à proscrire. Il est aussi nécessaire de travailler à des faibles valeurs de W/FM correspondant à une région déficiente en énergie, région où la concentration en monomère est suffisante pour consommer la puissance appliquée. Ainsi dans cette région, la vitesse de dépôt augmente linéairement en fonction du W/FM . Dans la région déficiente en monomère, c'est-à-dire la région associée à des fortes valeurs de W/FM , la puissance appliquée est plus que suffisante pour fragmenter le monomère, et l'augmentation de ce ratio tendra à diminuer la vitesse de croissance du film. Un plateau est alors observé avant une chute de la vitesse de déposition pour des valeurs élevées de Yasuda. Il est ainsi important de considérer qu'à faible énergie, la structure du monomère est normalement préservée tandis qu'à plus forte énergie, la structure chimique peut être complètement différente. Il est souvent décrit que les polymères plasma peuvent être déposés sur n'importe quel type de substrat. Cependant, le procédé de déposition est un processus d'interaction entre les espèces en phase gaz et celle de l'extrême surface du matériau. La nature et l'étendue des interactions qui se produisent est un facteur important de la polymérisation plasma. C'est pourquoi, l'interface plasma polymère-substrat n'est pas composée uniquement des radicaux provenant de la décomposition du précurseur mais aussi des espèces gazeuses obtenues de l'interaction plasma-surface.

En fait, sans un certain degré d'interaction, une bonne adhésion sur le substrat ne peut pas être obtenue. Certaines interactions existent au début du processus, sur le substrat et continuent sur la couche plasma polymère déposée pendant la croissance du polymère menant à des scissions de chaîne, voire de l'ablation en même temps que la déposition. Yasuda a défini ce mécanisme comme une compétition entre ablation et polymérisation [106, 107].

C.2.4 Avantages et inconvénients du procédé plasma

Il est intéressant de comparer le plasma atmosphérique aux techniques conventionnelles de polymérisation ainsi qu'au plasma sous vide. Un plasma est basiquement un gaz dans lequel une fraction des particules est chargée électriquement. Cette fraction de particules chargées est très faible dans le cas du plasma froid (<1%) mais ces particules sont cruciales car elles peuvent être influencées par les champs électriques et magnétiques. Dans le cas du traitement des matériaux, le but est d'amorcer des réactions physico-chimiques. Ces réactions peuvent exister uniquement si l'énergie d'activation peut être atteinte. De façon traditionnelle, elle peut être atteinte grâce à l'énergie dégagée lors de la montée en température du matériau. C'est un processus moins efficace puisque toutes les particules récupèrent l'énergie alors que seulement une fraction d'entre elles est nécessaire pour la réaction. Dans un plasma, on fournit l'énergie uniquement à un groupe de particules pour amorcer la réaction grâce aux interactions des particules chargées avec le champ électrique appliqué. Cela a pour avantage d'améliorer le rendement. Un autre avantage du traitement plasma est que les propriétés de surfaces dépendent des paramètres de la décharge tels que la puissance électrique, le temps de traitement, la composition du gaz et la pression du gaz facilement ajustable par l'opérateur [108].

D'autres limitations existent quant à l'utilisation du plasma à pression atmosphérique, en particulier sur le contrôle de la structure chimique qui est dépendant des conditions extérieures tel que l'humidité ou encore la température dont le réglage fin apparaît difficile. Ainsi les décharges à pression atmosphérique mènent généralement dans le cas d'une décharge luminescente à des traitements moins homogènes sujet à des réorganisations de surface ainsi qu'à des effets de vieillissements comparée aux systèmes basse pression à décharge luminescente. Le plasma atmosphérique permet l'utilisation d'équipements moins onéreux que le plasma sous vide. Ils sont toutefois caractérisés par des coûts d'utilisations importants, comparés aux systèmes sous vide, principalement à cause de la consommation de gaz surtout si l'on utilise des gaz nobles. Les questions de sécurité peuvent aussi devenir importantes lorsque l'on travaille avec des précurseurs ayant un impact sur l'environnement et la santé à l'échelle locale ou globale. Contrairement aux systèmes sous vide, il est nécessaire, la plupart du temps, d'utiliser un gaz pour introduire le précurseur dans la zone plasma. Les plasmas à pression atmosphérique sont fortement dépendants de la tension appliquée entre les électrodes ainsi que de la pression et la distance qui les sépare.

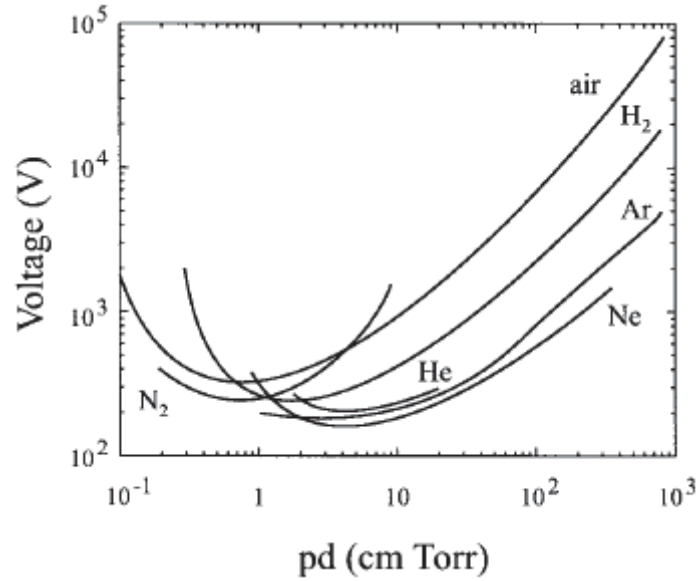


Figure 12. Courbe de Paschen présentant la tension appliquée en fonction du produit de la pression par la distance inter électrode [88].

La figure 12 montre que la tension de claquage est fortement dépendante de la pression et de la distance inter électrodes. En plus de ces deux paramètres, celle-ci est largement influencée par la composition du gaz. Cette relation montre bien les limites des systèmes opérant à pression atmosphérique. De plus, la géométrie du réacteur est limitée puisqu'il est nécessaire de conserver entre les électrodes des distances de l'ordre de quelques millimètres afin d'obtenir une décharge stable. Enfin, l'utilisation d'air comme gaz est à proscrire dans le cas où la consommation électrique est un paramètre important puisque la tension nécessaire pour amorcer la décharge est nettement supérieure à celle utilisée dans le cas des gaz nobles.

Nous avons pu voir jusqu'ici que certains types de polymères possèdent des propriétés relatives aux changements d'environnement. En effet, des transitions peuvent être observées (gonflement, contraction) lorsque par exemple un changement de température, de pH, de force ionique, de potentiel électrique, de champ magnétique ou encore de lumière est effectué. Parmi les différents systèmes capables de voir leurs structures modifiées face ces changements, c'est vers les hydrogels qu'on a décidé de s'orienter car ce sont des matériaux tridimensionnels, hydrophiles, dont le réseau polymère est capable d'absorber une grosse quantité d'eau ou de fluide biologique. D'autre part, les biocapteurs quant à eux sont des dispositifs constitués d'une partie biosélective (enzyme, anticorps, ARN) qui permet la reconnaissance spécifique d'une espèce immobilisée sur un transducteur qui transforme

l'interaction biochimique en un signal électrique pouvant ensuite être interprété par un opérateur. La difficulté dans la mise en œuvre de ce genre de système concerne surtout l'immobilisation de la partie biosélective sur le transducteur.

En tenant compte de ces applications, nous avons décidé de synthétiser des films permettant d'être utilisés pour des systèmes à libération contrôlée de molécules d'intérêts et comme couche active d'un biocapteur, le tout, par le biais d'une technique originale qui consiste en la polymérisation par plasma.

Comme nous l'avons vu dans ce chapitre, le plasma peut être utilisé pour différents traitements de surface. Cette méthode considérée comme une technique par voie sèche, c'est-à-dire en l'absence de solvant, permet le dépôt de films minces à des vitesses élevées, sans altérer les propriétés intrinsèques du substrat, ce qui en fait un outil performant pour le dépôt de films minces à l'échelle industrielle.

Les études développées dans les chapitres suivants seront focalisées sur l'élaboration de films possédant des groupements spécifiques aux deux applications visées. Pour ce faire, une attention particulière sera portée à la structure chimique des films obtenus par l'intermédiaire du prototype semi industriel.

Le chapitre suivant passe en revue les matériels et méthodes employés afin de mener à bien cette étude.

Chapitre 2

-

Matériels et Méthodes

Ce chapitre intitulé ‘Matériels et Méthodes’ sera divisé en deux parties. Tout d’abord les composés chimiques utilisés durant cette étude seront présentés. Tandis que la seconde partie décrira le prototype plasma à pression atmosphérique qui a permis la réalisation des dépôts. Nous présenterons ensuite les différentes techniques d’analyses utilisées pour caractériser les propriétés des couches obtenues : le microscope à force atomique, le microscope électronique à balayage et la spectroscopie de photoélectron X pour l’analyse de surface, la spectroscopie infrarouge, la résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse pour l’investigation de la structure chimique et pour terminer, l’UV-visible et la microscopie confocal pour ce qui concerne la mesure de concentration d’espèces en solution et l’observation par fluorescence des enzymes piégées dans les films polymère plasma.

A. Composés chimiques utilisés lors de l’étude

Lors de notre étude, différents monomères (précurseurs) ont été utilisés sans aucune purification. Les principales caractéristiques et les structures des principaux monomères et polymères sont donnés dans le tableau 1.

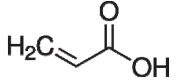
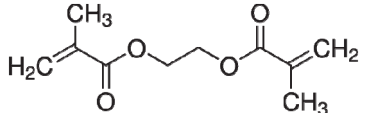
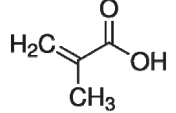
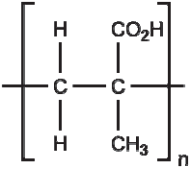
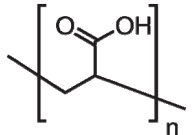
Nom du composé	Notation	Formule Chimique	Fournisseur et Référence	Masse moléculaire moyenne (en g/mol)
Acide acrylique	AA		Sigma Aldrich, 01730	72
Diméthacrylate d'éthylène glycol	EGDMA		Sigma Aldrich, 335681	198
Acide méthacrylique	MAA		Sigma Aldrich 155721	86
Acide poly (méthacrylique)	PMAA		Polysciences 00578	100000
Acide poly (acrylique)	PAA		Sigma Aldrich 181285	450000

Tableau 1. Monomères et polymères utilisés.

La justification des monomères cités dans le tableau 1 se trouve dans la nécessité d'obtenir des films à base de groupements carboxyliques, pour l'obtention de gels sensibles au pH comme présenté dans la partie bibliographique.

Les polymères commerciaux (PAA et PMAA) ont été utilisés afin de réaliser les tests de faisabilité concernant le marquage au trifluoroéthanol [109].

Dans le cadre de l'étude sur la couche active des biocapteurs, nous nous sommes proposé d'utiliser la phosphatase alcaline (PA, EC 3.1.3.1). En effet, la PA est une enzyme, c'est-à-dire une protéine qui joue le rôle de catalyseur dans les réactions chimiques chez les êtres vivants. Les enzymes sont des acteurs omniprésents dans la vie de la cellule. Sans ces éléments, aucune réaction du métabolisme des cellules ne serait possible. Les enzymes sont considérées comme des catalyseurs et de ce fait possèdent des propriétés qui leurs sont spécifiques. L'enzyme reste intacte une fois la réaction réalisée, elle n'est donc pas consommée et peut donc engendrer de nouvelles réactions. Elle ne modifie pas la nature de la réaction, ni son équilibre, ni son bilan thermodynamique. La réaction est possible même en l'absence de l'enzyme. L'enzyme modifie la vitesse de la réaction en diminuant l'énergie d'activation de la réaction. Les enzymes ont souvent besoin de cofacteurs non protéiques au sein de leur site actif. La phosphatase alcaline est une enzyme qui hydrolyse les phosphomonoesters en libérant du phosphate.

Les enzymes possèdent néanmoins certaines limitations liées à la conservation de leur activité. Celle-ci est fortement influencée par le pH, la température et la force ionique de la solution avec laquelle elle est en contact.

Nous avons donc préparé une solution tampon qui consiste en 10 mM de Tris (hydroxyméthyl) Aminométhane, 150 mM de NaCl et dont le pH a été fixé à 8.4.

Pour réaliser cette solution, nous avons utilisé une eau ultra pure délivrée par un système Milli-Q-plus (Millipore, Bedford, USA). La résistivité de cette eau étant de 18.2 MΩ.cm.

Nom du composé	Notation ou formule chimique	Fournisseur et Référence	Masse moléculaire (en g/mol)
Chlorure de Sodium	NaCl	Prolabo, 27 810.295	58
Acide Chlorhydrique à 37%	HCl	Prolabo, 20 252.290	36
Tris (hydroxy méthyl) Aminométhane	Tris	Merck, 108382	121
Hydroxyde de Sodium	NaOH	Prolabo, 28 244.295	40
Paranitrophenyl phosphate	PNP	Sigma-Aldrich, 71768	371

Tableau 2. Composés utilisés pour la préparation des solutions tampon et les tests enzymatiques.

Les polyélectrolytes sont des polymères dont les unités monomères présentent au moins un groupement ionisable. Lors de notre étude, les solutions de polyélectrolytes ont été préparées à une concentration de 1 mg.mL^{-1} . Les principales caractéristiques et les structures des polyélectrolytes utilisés pour l'étude des biocapteurs sont données dans le tableau 3.

Nom du composé	Notation	Fournisseur et Référence	Masse moléculaire moyenne en poids (en g/mol ou Daltons)
Acide Hyaluronique	HA	LifecoreBiomedical	420000
Poly-L-Lysine	PLL	Sigma Aldrich P7890	26500
Poly (Styrène Sulfonate) de sodium	PSS	Sigma Aldrich, 243051	70000
Poly (Hydrochlorure d'Allylamine)	PAH	Polysciences, 18378	120000 - 200000
Poly (Chlorure de Diallyldiméthyl Ammonium)	PDADMAC	Sigma Aldrich 409014	100000 - 200000

Tableau 3. Polyélectrolytes utilisés.

Les produits supplémentaires utilisés pour la préparation des solutions concernant les systèmes à libération de médicament sont détaillés dans le tableau suivant :

Nom du composé	Notation ou formule chimique	Fournisseur et Référence	Masse moléculaire (en g/mol)
Acétonitrile	C_2H_3N	Sigma Aldrich, 34998	41
Acétaminophène	$CH_3CONHC_6H_4OH$	Sigma Aldrich, A7085	151

Tableau 4. Produits utilisés pour les systèmes à libération de médicaments préparés en une seule étape.

L'acétaminophène a été choisie de par son intérêt en pharmacologie et son faible poids moléculaire. Les caractéristiques des autres réactifs utilisés dans les expériences pour le marquage des groupements carboxyliques sont données dans le tableau 5.

Nom du composé	Notation ou formule chimique	Fournisseur et Référence	Masse moléculaire (en g/mol)
<i>N,N'</i> -Di- <i>tert</i> -butylcarbodiimide	C ₉ H ₁₈ N ₂	Sigma Aldrich, 235563	154
2,2,2-Trifluoroéthanol	C ₂ H ₃ F ₃ O	Sigma Aldrich 96924	100
Pyridine	C ₅ H ₅ N	Sigma Aldrich 270407	79
Toluidine Blue O	C ₁₅ H ₁₆ ClN ₃ S	Sigma Aldrich T3260	306

Tableau 5. Produits utilisés pour la réalisation des méthodes de dérivation.

B. Méthodes

B.1 Déposition des précurseurs par plasma

Les films étudiés lors de ce travail de thèse ont été réalisés à l'aide d'un réacteur plasma semi-industriel à barrière diélectrique (Figure 13) [110, 111]. Cet outil autorise le traitement de surface à pression atmosphérique et à température ambiante. Un mélange gazeux constitué d'un gaz vecteur, ici de l'hélium, et de fines gouttelettes du monomère à polymériser (~100 nm), est introduit entre deux électrodes en aluminium dont une est recouverte par un diélectrique (Figure 14) en verre d'une épaisseur de 3,25 mm empêchant le passage à l'arc électrique lors de la décharge comme l'a montré la partie bibliographique traitant du rôle du diélectrique.

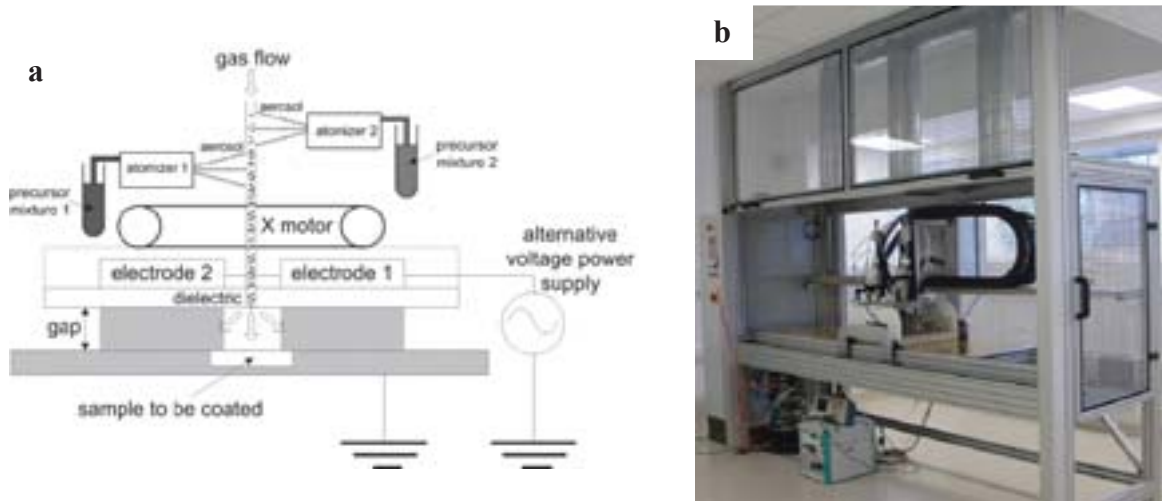


Figure 13. a. Représentation schématique du prototype plasma. b. Photographie présentant l'ensemble du prototype



Figure 14. Photo présentant l'électrode supérieure recouverte par le diélectrique.

Les différents précurseurs sont nébulisés par l'intermédiaire d'un second flux d'hélium ajustable entre 1 et 2 bars (Figure 15a). Les précurseurs sont ensuite introduits dans la zone plasma via le gaz vecteur dont le débit a été fixé à 10 litres par minute, pour les dépôts effectués durant ce travail de thèse, par un régulateur de débit.

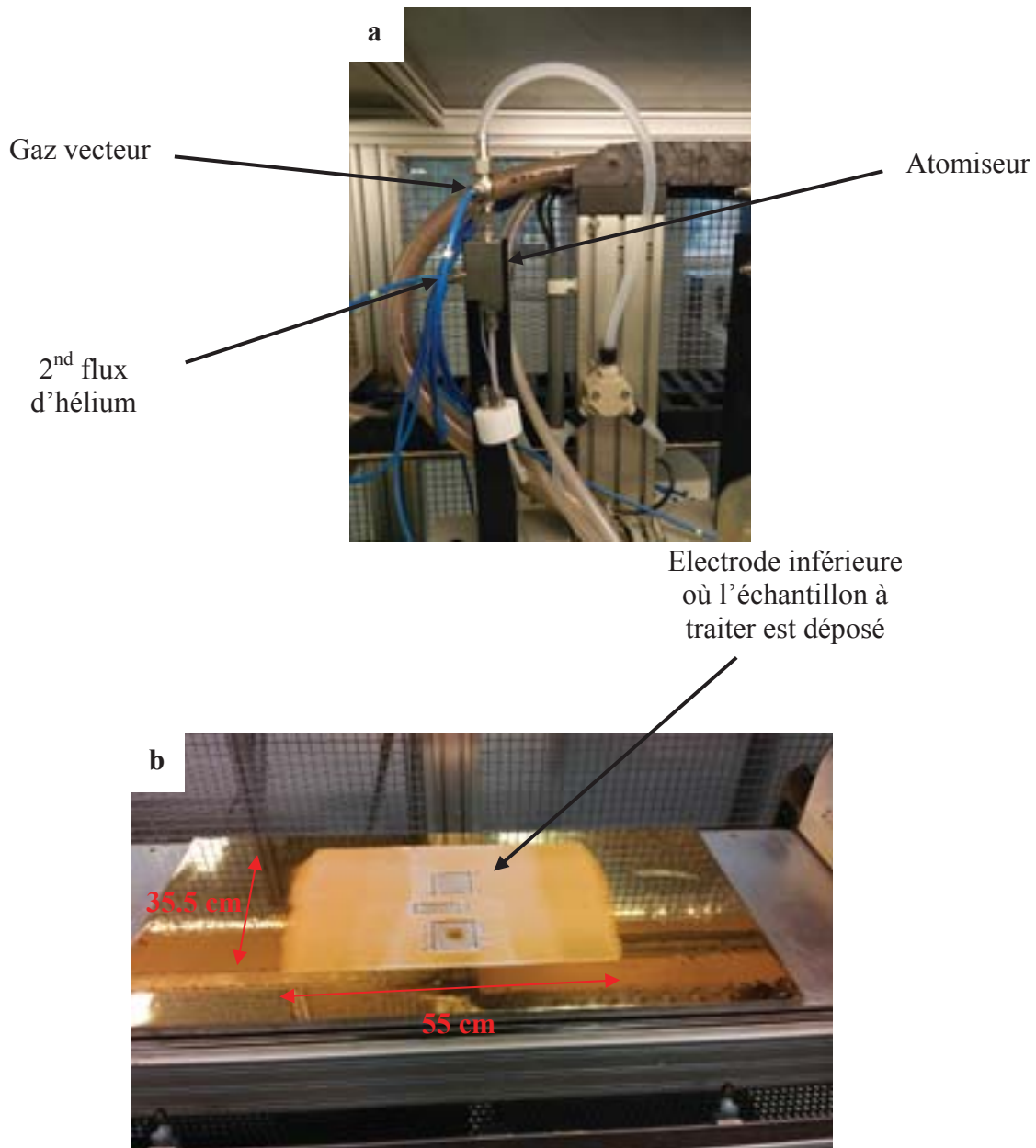


Figure 15. Photo présentant **a.** l'atomiseur et **b.** l'électrode inférieure sur laquelle les échantillons à traiter sont déposés.

La décharge plasma est ensuite générée par une alimentation en courant alternatif dont la fréquence a été fixée à 6 kHz et dont la puissance peut varier entre 60 et 120 W, ce qui correspond à une densité de puissance à travers les électrodes de 0,1 à 0,2 W.cm⁻². Il est néanmoins possible dans cette configuration et en mode statique, c'est-à-dire avec l'électrode supérieure immobile, d'observer certaines inhomogénéités dans le film déposé, principalement au niveau de l'épaisseur. Afin de diminuer au maximum ce phénomène, le

bloc supérieur, peut se déplacer au-dessus de l'électrode inférieure sur laquelle l'échantillon à traiter est déposé (Figure 15b). Des vitesses de l'ordre de 4 m.min^{-1} et plus, pendant la phase de déposition, peuvent être atteintes. En fonction des différents paramètres opératoires tels que la puissance, le flux ou encore le nombre de passe ajustable via la commande centrale, il est possible de jouer sur certaines propriétés des films déposés. Comme on a pu le voir dans la partie bibliographique, les paramètres opératoires peuvent être reliés entre eux par le paramètre de Yasuda qui correspond à l'énergie appliquée par masse de précurseur introduit dans la zone plasma. Cette valeur est, dans notre cas, déterminée en divisant la puissance appliquée par la masse de précurseur atomisé. Cette dernière est valable uniquement dans le cas où le flux d'hélium reste constant entre chaque expérience. On peut alors mesurer la différence de masse avant et après dépôt. Le paramètre de Yasuda est utilisé dans cette étude uniquement pour faire le lien entre les différents paramètres opératoires, et ainsi montrer l'influence de ces derniers pour ce prototype sur les propriétés physico chimiques des films obtenus. Il est aussi possible d'utiliser différents types de substrats. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes limités uniquement aux substrats en verre, silicium et polystyrène.

B.2 Techniques d'analyse de surface

Cette partie présente les différentes techniques d'analyses de surface utilisées sur les matériaux développés.

B.2.1 Microscope électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM en anglais) est une technique de microscopie basée sur le principe des interactions électrons-matière. Un faisceau très fin d'électrons monocinétiques balaye la surface de l'échantillon à analyser (Figure 16). Ces électrons proviennent généralement d'un filament de tungstène. Les électrons sont ensuite accélérés par le champ électrique appliqué (1 – 400 kV). L'interaction entre la sonde électronique et l'échantillon génère des particules et des rayonnements qui permettent d'obtenir différentes informations sur l'échantillon (topographique, composition...). Cette technique non destructive permet d'obtenir des images avec une résolution latérale de quelques dizaines de nanomètres. Le MEB permet d'avoir respectivement des informations topographiques et de voir les contrastes de composition du matériau. Le contraste dépend du type d'électrons sélectionnés, de la tension d'accélération choisie, de la nature des atomes

présents... On en distingue deux types : le contraste topographique (lié au taux d'électrons secondaires) et le contraste chimique (lié aux électrons rétrodiffusés).

Ce type d'analyse a été choisi afin d'observer la section des films obtenus par polymérisation plasma. Les analyses MEB ont été réalisées à l'aide d'un microscope électronique à balayage de chez Philips (Quanta 200 Field Effect Gun Scanning Electron Microscope). Pour ce faire, les films plasma ont directement été déposés sur des substrats en silicium avant d'être introduits dans la chambre où les analyses MEB en mode contraste chimique ont été effectuées.

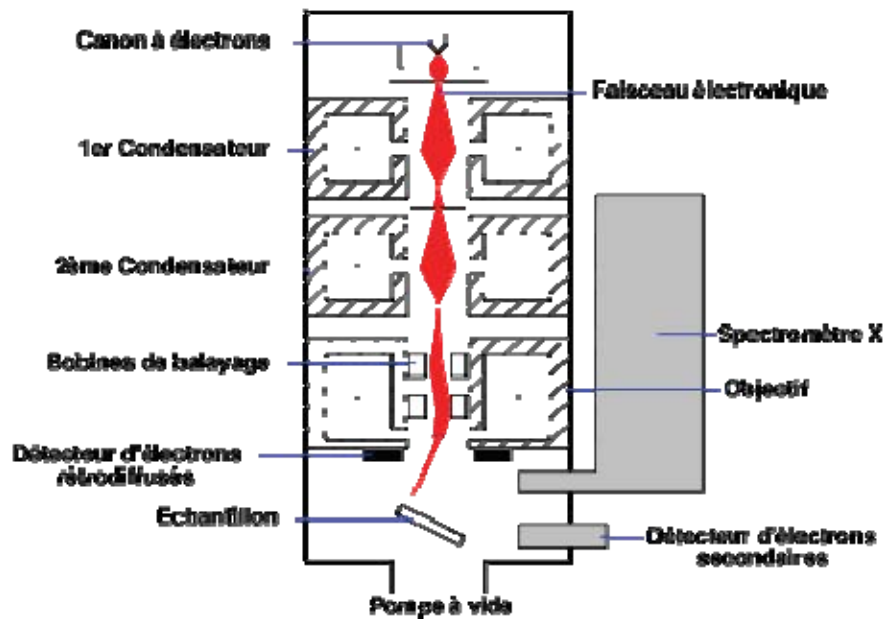


Figure 16. Schéma de principe d'un microscope électronique à balayage.

B.2.2 Microscope à force atomique (AFM)

Le microscope à force atomique (ou AFM pour Atomic Force Microscopy) permet d'imager à l'air libre la surface de différents types de matériaux. Le principe de l'AFM est basé sur la mesure des forces d'interactions (forces de van der Waals, forces électrostatiques, forces magnétiques, forces de frictions...) qui s'exercent entre une pointe idéalement atomique portée par un ressort (cantilever) et la surface de l'échantillon à analyser. Comme le montre la Figure 17, la déflexion ou la torsion du ressort est suivi en positionnant un faisceau laser sur la face supérieure de celui-ci. Le faisceau laser après réflexion sur la surface de la pointe est ensuite réfléchi sur un miroir (non présenté sur la Figure 17) puis arrive sur des photo-détecteurs qui enregistrent le signal lumineux sous forme d'un spot et son déplacement relatif. Cette méthode a été proposée dès 1988 par G. Meyer et N. Amer [112]. Les

déplacements latéraux et verticaux se font grâce à une céramique piézo-électrique. Le balayage en x,y peut aller de quelques nanomètres à plusieurs microns. La sensibilité en z pouvant varier de l'angström à 2-3 μm .

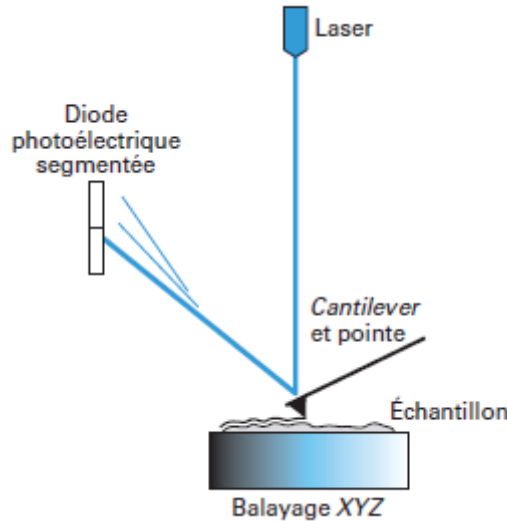


Figure 17: Principe du microscope à force atomique [112].

Il est possible, suivant la configuration adoptée, de différencier deux principaux modes de fonctionnement. On distingue alors le mode contact dont les principales forces d'interaction entre la pointe et la surface sont des forces répulsives de très courtes portées (quelques nanomètres au maximum). Le mode contact permet ainsi d'obtenir la meilleure résolution, mais les forces adhésives (forces de capillarité et électrostatiques surtout) et les forces de friction augmentent la force totale, ce qui peut endommager la pointe et l'échantillon, lorsqu'on travaille sur des matériaux fragiles. Pour pallier à cet inconvénient, des modes résonants ont été développés. Le mode 'tapping' permet d'éviter les forces de friction, car la pointe ne vient que périodiquement en contact avec l'échantillon. Un système d'asservissement ajuste en permanence la position de la sonde perpendiculairement à la surface et permet ainsi de suivre la morphologie de l'échantillon. Ce mode est le plus approprié pour l'analyse de surfaces polymère.

Dans le cadre de cette étude, l'AFM a été utilisée afin d'obtenir la morphologie et l'épaisseur des films plasma déposés. Les échantillons ont été directement déposés sur des substrats en silicium préalablement nettoyés. Afin d'obtenir l'épaisseur de la couche déposée, une rayure a été réalisée par l'intermédiaire d'une aiguille prévue à cet effet. Les échantillons ont ensuite

été analysés en utilisant un microscope Pico SPM (USA). Les images de topographie ont été effectuées à l'air en mode tapping à une fréquence de 1 Hz à l'aide d'un cantilever dont la pointe est constituée de nitrure de silicium (Park Scientific). Le cantilever oscille à la surface de l'échantillon à une fréquence proche de sa fréquence de résonance et l'amplitude d'oscillation est choisie suffisamment élevée de façon à ce que la pointe traverse l'extrême couche présente sur toute la surface analysée.

B.2.3 Spectroscopie de photoélectron X (XPS)

La dernière technique d'analyse de surfaces présentée est la spectroscopie de photoélectron X. Il s'agit ici de déterminer les proportions atomiques des éléments présents à l'extrême surface de nos échantillons dans le but de comparer les proportions de certains groupements en fonction des précurseurs utilisés et des paramètres opératoires appliqués. En effet, la spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS, aussi connue sous le nom d'analyse ESCA : electron spectroscopy for chemical analysis, spectroscopie d'électron pour analyse chimique) est une technique d'analyse chimique permettant de déterminer la composition élémentaire de la surface analysée [113]. Un faisceau de rayon X mono énergétique, d'énergie $h\nu$, est dirigé vers la surface de l'échantillon à analyser. L'énergie des photons est alors entièrement transférée aux électrons par le biais de collisions inélastiques. Si l'énergie du faisceau incident ($h\nu$) est supérieure à l'énergie de liaison (E_l) des électrons dans l'atome, ces électrons peuvent alors être arrachés de leur couche et possèdent une énergie cinétique (E_c) bien définie. Le bilan énergétique de ce phénomène est alors donné par la relation suivante :

$$h\nu = E_l + E_c + E_R$$

Avec E_R l'énergie de recul de l'atome, qui est généralement négligeable.

Le détecteur utilisé (Hemispherical Energy Analyzer SPECS, Phoibos 150) mesure l'énergie cinétique des photoélectrons émis, ce qui permet de calculer l'énergie de liaison de l'électron connaissant l'énergie des photons incidents.

L'énergie de liaison (en eV) étant caractéristique d'un élément, il est donc possible d'identifier les différents atomes présents en surface du matériau. Les résultats sont fournis sous forme de spectres représentant l'intensité des photoélectrons émis en fonction de l'énergie de liaison.

Ces analyses ont permis d'identifier la composition de la couche déposée en fonction des différents paramètres opératoires sur une profondeur d'environ 10 nm.

Dans le cas des films obtenus à partir d'acide acrylique et méthacrylique, il est souvent difficile de différencier le pic du groupement carboxylique de celui de l'ester. Il existe alors une méthode qui consiste à marquer les groupements carboxyliques à l'aide du trifluoroéthanol (TFE) [109, 114]. Cette technique permet ainsi d'avoir une idée de la proportion de groupements carboxyliques présents dans les premiers nanomètres de la couche. Néanmoins, cette étude nécessite l'utilisation de techniques complémentaires telles que la FTIR, ou la RMN (voir parties suivantes) afin de palier aux problèmes liés à des incertitudes observées suite à une adsorption et non une réaction du TFE avec la surface à analyser.

Les échantillons sous forme de dépôts sont introduits dans un tube à essai et exposés à une vapeur constituée de TFE, Pyridine et Di-Tert-Butyl-Carbodiimide. Le traitement de ces spectres a ensuite pu être réalisé à l'aide du logiciel Casa XPS (Casa software).

Les techniques qui vont être présentée dans la suite font référence aux techniques permettant plus spécifiquement de nous renseigner quant à la structure chimique des films déposés. Parmi elles, on peut alors citer la spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire au carbone 13 à l'état solide et la spectrométrie de masse.

B.3 Caractérisation de la structure chimique des films déposés

B.3.1 Spectroscopie infrarouge en transmission (T-FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier (FTIR) permet d'obtenir des informations sur la structure chimique du matériau à analyser. Cette technique correspond à l'étude de l'interaction entre un faisceau infrarouge et la matière. Elle est utilisée pour la caractérisation des matériaux car les liaisons chimiques présentes disposent de fréquences spécifiques pour lesquelles il est possible d'observer des vibrations correspondantes à leurs niveaux d'énergie. En effet, la mesure du spectre de vibration donne des informations sur les interactions intra et intermoléculaires. L'échantillon est soumis à un rayonnement électromagnétique dans la gamme de l'infrarouge ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), induisant des excitations vibrationnelles. Suivant la géométrie, la symétrie, la nature des liaisons et la masse du composé, ce rayonnement sera plus ou moins absorbé. Ainsi, un matériau de

composition et structure chimique donné peut être identifié en fonction de bandes d'absorption caractéristiques. Cette absorption a lieu lorsque le rayonnement incident excite une liaison avec différents modes vibrationnels tels que l'étirement, le cisaillement, ou encore l'agitation. [115].

Dans cette étude, les données expérimentales ont été obtenues à l'aide d'un spectrophotomètre Bruker Optics Tensor 27 en mode transmission.

Tous les dépôts plasma étudiés ont été directement déposés sur des pastilles de bromure de potassium (KBr), transparent au rayonnement infrarouge. Les pastilles ont été préparées à l'aide d'une pastilleuse. Une fois terminées, elles sont directement déposées sur l'électrode inférieure avant de procéder à l'étape de déposition. Lors de l'acquisition des spectres, une ligne de base est réalisée avec une pastille KBr de référence, sans dépôt. Tous les spectres ont été enregistrés en accumulant 50 scans avec une résolution de 4 cm^{-1} entre 4000 et 400 cm^{-1} . Une fois les spectres obtenus, les différentes vibrations des groupements carbonyles ($1730 - 1690 \text{ cm}^{-1}$) [116] permettent de distinguer les groupements esters, des groupements carboxyliques. Cette approche a été utilisée lors de l'étude des films obtenus à partir d'acide acrylique et méthacrylique, en fonction des paramètres opératoires afin de déterminer la proportion de groupements fonctionnels préservés après la phase de déposition (voir chapitre 3 de la partie qui traite des films obtenus à partir d'acide acrylique et méthacrylique). Cette méthode a aussi été utilisée pour distinguer la proportion d'acide méthacrylique dans les films obtenus à partir de mélange MAA-EGDMA (voir chapitre 3 de la partie qui traite des films plasma flexibles auto supportés pour les applications de type biocapteurs).

B.3.2 Spectrométrie de masse par temps de vol des ions produits par désorption laser assistée par matrice (MALDI-TOF) et d'ions secondaires (SIMS)

La spectrométrie de masse est basée sur l'ionisation d'un composé et de sa séparation en fonction de son ratio masse/charge. Il existe un certain nombre de méthodes permettant l'ionisation d'échantillons. Parmi elles, on peut citer l'impact électronique, l'ionisation chimique ou encore l'ionisation par bombardement d'ions rapides. Dans le cas du MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation), un laser pulsé est utilisé pour ioniser l'échantillon. Cette méthode est associée à un système à temps de vol ou à un spectromètre de masse à transformé de fourier. Deux types de lasers sont principalement utilisés : le laser

CO₂, qui émet des radiations dans la région infrarouge lointaine, et le laser (Nd/YAG) qui émet dans la région UV. Sans l'utilisation de matrice d'assistance, la méthode est limitée à des molécules de poids moléculaire < 2 kDa, c'est pourquoi il est préférable de travailler avec des matrices de types acide dihydroxybenzoïque, acide nicotinique ou encore acide sinapinique dont la bande d'absorption coïncide avec le laser utilisé permettant ainsi l'étude des molécules dont le poids moléculaire peut atteindre les 300 kDa tout en limitant la fragmentation ou la dégradation de l'échantillon. Le composé à étudier est introduit dans la matrice puis déposé sur un support avant d'être irradié par le laser UV pulsé. L'énergie thermique reçue est transférée par la matrice au composé qui se trouve désorbée et ionisée. Par ce procédé, on extrait de la phase condensée des ions en phase gazeuse.

Les divers spectres de masses réalisés ont été enregistrés sur un spectromètre MALDI-TOF AutoFlex III (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany) dans le but de différencier la structure chimique obtenue à partir d'acides acrylique et méthacrylique déposés par polymérisation plasma en fonction des paramètres opératoires. Il s'agit d'un spectromètre de masse équipé d'une source à 'désorption/ionisation LASER assisté par matrice' et d'un analyseur du temps de vol (Time-of-Flight, TOF). L'irradiation LASER est issue d'un LASER ultraviolet nanoseconde Nd-YAG triplé en fréquence ($\lambda = 355$ nm), opérant en régime pulsé à 200 Hz. Pour toutes les analyses effectuées, l'appareil a été utilisé en mode négatif. La gamme de masse limitée des plasma-polymères < 10 kDa a nécessité l'utilisation de l'analyseur à temps de vol en mode 'reflectron' afin de maximiser la résolution en masse (les ions formés en source effectuent un trajet aller-retour grâce à un ensemble de lentilles électrostatiques agissant en miroir, ce qui, grossièrement, double la distance de vol et réduit la dispersion cinétique des paquets d'ions). Une calibration externe par des clusters d'iodure de potassium (K_nI_n)I⁻ permet de calibrer indépendamment le spectromètre de masse (renouvelé à chaque analyse) ou les spectres enregistrés a posteriori.

La préparation des échantillons, étape clé d'une analyse MALDI, fait appel à la technique 'solvent-free' [117, 118] consistant à broyer intimement, au moyen d'un mortier/pilon en agate, une matrice MALDI solide, ici l'acide 3-indole acrylique (IAA, Bruker Daltonics) et l'échantillon préparé par polymérisation plasma. Quelques grains du mélange solide ainsi obtenus sont déposés puis pressés sur une cible en aluminium pour former un film mince de quelques dizaines de microns. Le ratio massique matrice/analyte, optimisé pour chaque analyse, est évalué à environ 20/1, très en deçà des ratios traditionnellement utilisés pour un

dépôt 'solvent-based'. L'iodure de potassium (KI) est également réduit en poudre puis déposé sur la cible, et soumis à analyse LDI, sans ajout de matrice.

Dans le cas de la spectrométrie de masse des ions secondaires (SIMS pour Secondary Ions Mass Spectrometry), un échantillon est bombardé non plus par un LASER mais par un faisceau d'ions primaires. Des ions secondaires sont ainsi émis de la surface et sont analysés par spectrométrie de masse. Par cette technique, on obtient une information détaillée de la composition chimique de la surface avec des profondeurs pouvant varier du nanomètre au micromètre. Cependant, cette technique ne permet pas une analyse quantitative absolue. Deux modes d'analyse existent : en ions positifs ou négatifs. Le mode est choisi suivant les éléments à analyser. D'une manière générale, les éléments électropositifs donnent principalement des ions positifs et les éléments à caractère électronégatif des ions négatifs.

L'analyse ToF-SIMS utilise un faisceau d'ions primaires pulsés. Chaque paquet interagit avec la surface à analyser et génère un paquet d'ions secondaires à un temps donné bien précis. Ces paquets sont ensuite extraits et accélérés jusqu'à la même énergie cinétique.

Pour la même énergie cinétique, les ions secondaires de masses différentes vont avoir des vitesses différentes et par conséquent des temps de vol différents entre le spectromètre de masse et le détecteur.

Dans le but de confirmer la présence de l'enzyme dans le film (voir chapitre 3 de la partie qui traite des films plasma flexibles auto supportés pour les applications de type biocapteurs), un profilage a été réalisé avec un spectromètre de masse d'ions secondaires (TOFSIMS.5, IonTOF, Muenster, Germany). Un faisceau d'érosion (C_{60} ou Césium) est utilisé pour éroder l'échantillon permettant de sonder l'épaisseur du film et un second faisceau est utilisé pour l'analyse. Le faisceau d'érosion (C_{60}) a montré, dans le cas de suivi d'acides aminés relatifs à la structure des enzymes, pour des plasma polymères constitués d'organosiloxane très réticulés, que des dommages moléculaires accumulés au bas du cratère pouvait être observés. Il a donc été choisi de réaliser une analyse élémentaire en suivant l'ion Mg^+ présent dans la PA. Pour notre étude, l'étape d'érosion a été réalisée par un bombardement de Cs^+ (10 kV) sur une surface de $150 \times 150 \mu m^2$. Le centre du cratère ainsi obtenu a été analysé par un faisceau de Bi^{3+} sur une surface de $50 \times 50 \mu m^2$.

B.3.3 Résonance Magnétique Nucléaire à l'état solide (Solid State NMR)

La spectroscopie RMN est une technique très utilisée en chimie organique pour obtenir des informations relatives à la structure chimique d'une molécule. Cette technique exploite les propriétés magnétiques du noyau de l'atome. En effet la RMN tire des informations de l'interaction qui peut apparaître entre les noyaux des atomes présents dans l'échantillon soumis à un champ magnétique intense et constant produit par un aimant. En fonction de l'environnement locale, l'isotope étudié résonne à des fréquences différentes. Cette fréquence est dépendante de la force du champ magnétique. L'interprétation des signaux (position, aspect, intensité), conduit à un ensemble de renseignements sur l'échantillon, d'autant plus facilement interprétables s'il s'agit d'un composé pur.

Les films étudiés sont déposés sur lame de verre puis récupérés avant d'être analysés. Toutes les expériences RMN ont été enregistrées sur un spectromètre BRUKER DSX 300 équipé d'une sonde BRUKER DVT MAS 4 mm double résonance opérant à une fréquence de 75,52735 MHz pour le carbone ¹³C. Les spectres ont été référencés en utilisant une référence externe (Adamantane à 38,2 ppm pour le ¹³C). Les expériences ont été enregistrées à une vitesse de rotation (MAS) de 10 kHz dans des rotors de 4 mm, à température ambiante. Une séquence de polarisation croisée (CP) a été employée avec les paramètres typiques suivants : impulsion proton de 90° de 5 microsecondes, temps de contact 2 ms avec une modulation tangentielle sur les deux canaux, temps d'acquisition 60 ms, temps de recyclage 2 s, découplage proton à 100 kHz.

B.4 Techniques optiques d'analyses en solution et par fluorescence

B.4.1 Spectroscopie UV/Visible

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode très commune dans les laboratoires. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée.

Il s'agit d'une méthode d'analyse beaucoup plus sensible que la spectrométrie infrarouge. Elle n'est pourtant pas utilisée comme une méthode de routine d'identification des polymères. En effet, contrairement aux spectres infrarouges, les spectres UV-visible des polymères ne présentent généralement pas de bandes d'absorption suffisamment caractéristiques pour permettre l'identification des échantillons.

Les principales applications de la spectrométrie UV-visible dans le domaine des polymères concernent plus spécialement l'analyse d'adjuvants, colorants et pigments. En pratique, on opère dans le domaine spectral de l'ultraviolet (180 - 400 nm) et dans celui du visible (400 - 800 nm).

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu les énergies les plus importantes de la chimie (soit 200 à 800 nm qui correspondent à des énergies de 6,5 à 1,5 eV environs). L'ordre de grandeur des énergies mises en jeu est celui des énergies de liaison des molécules aussi, ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons. Plus généralement, ils provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules. Les molécules vont donc pouvoir absorber des photons UV-Visibles et changer leurs états énergétiques électroniques, vibrationnels et rotationnels. L'absorption du rayonnement par les molécules va permettre de déterminer leurs concentrations. Il est alors nécessaire de procéder à un étalonnage avec un ensemble de solution de référence. La loi de **Beer-Lambert** donnée par la relation $A = \epsilon.c.l$ va pouvoir être utilisée.

Connaissant ϵ , on va remonter à la concentration en espèces présentes dans la solution à analyser.

La loi de Beer-Lambert s'applique pour des radiations monochromatiques et sa validité est bonne lorsque l'on travaille avec des solutions suffisamment diluées.

Dans le cadre des systèmes à libérations de molécules d'intérêts et pour les tests de coloration, des étalons ont préalablement été préparés afin de déterminer au mieux les ϵ de l'acétaminophène et du bleu de toluidine.

Dans un premier cas, 2 films contenant respectivement un mélange de MAA/EGDMA/acétonitrile et MAA/EGDMA/acétaminophène/acétonitrile ont été préparés puis immergés dans une solution aqueuse à pH 8. Un suivi de la longueur d'onde caractéristique de l'acétaminophène (245 nm) en fonction du temps est ensuite réalisé afin de déterminer la vitesse de relargage (voir chapitre 3 de la partie traitant des films obtenus en une seule étape par plasma pour les systèmes à libération de médicaments). L'échantillon préparé sans acétaminophène sert uniquement de référence.

Dans un second cas, différents films obtenus à partir de différents mélanges de MAA et EGDMA ont été déposés sur des substrats en polystyrène. Les groupements carboxyliques sont alors complexés dans une solution contenant 5×10^{-4} M de bleu de toluidine à pH 10

pendant une nuit [119]. Les molécules de colorant qui n'ont pas réagi sont ensuite éliminées en plongeant l'échantillon dans une solution contenant 10^{-4} N de NaOH. Afin de déterminer la concentration en groupements carboxyliques, l'échantillon est de nouveau plongé dans une solution acide, permettant la reprotonation des groupements carboxylates, avec une libération des molécules de colorant dans la solution (rupture des liaisons électrostatiques). La solution est ensuite analysée par l'intermédiaire d'un spectrophotomètre UV (Perkin-Elmer model Lambda 35) à une longueur d'onde de 633 nm (longueur d'onde d'absorbance du bleu de toluidine).

B.4.2 Microscopie confocale

La fluorescence est un phénomène d'émission lumineuse qui se produit à travers la désexcitation d'une molécule fluorescente excitée par une source lumineuse extérieure. Contrairement aux microscopes à fluorescence classique dont le principal problème réside sur la superposition d'images obtenues à différentes profondeurs, la microscopie confocale permet d'isoler différentes sections de l'échantillon à analyser, en faisant des coupes optiques dans le matériau. Pour ce faire, une source laser est utilisée.

Le faisceau focalisé à l'aide d'un objectif, excite les fluorophores à un point de l'échantillon, plus précisément, dans un volume de l'élément centré sur le point à observer (Figure 18).

Un trou d'aiguille (pinhole) est placé devant un tube photomultiplicateur capable de détecter la lumière en éliminant celle qui ne fait pas partie de la zone focalisée. Une image fluorescente de cette section peut être construite point par point en scannant l'échantillon dans les deux directions du plan focal. Les autres sections sont ensuite observées en translatant verticalement l'échantillon.

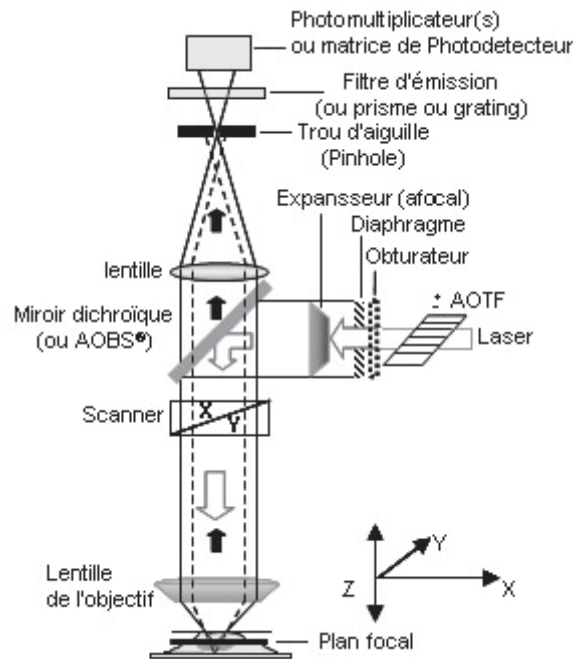


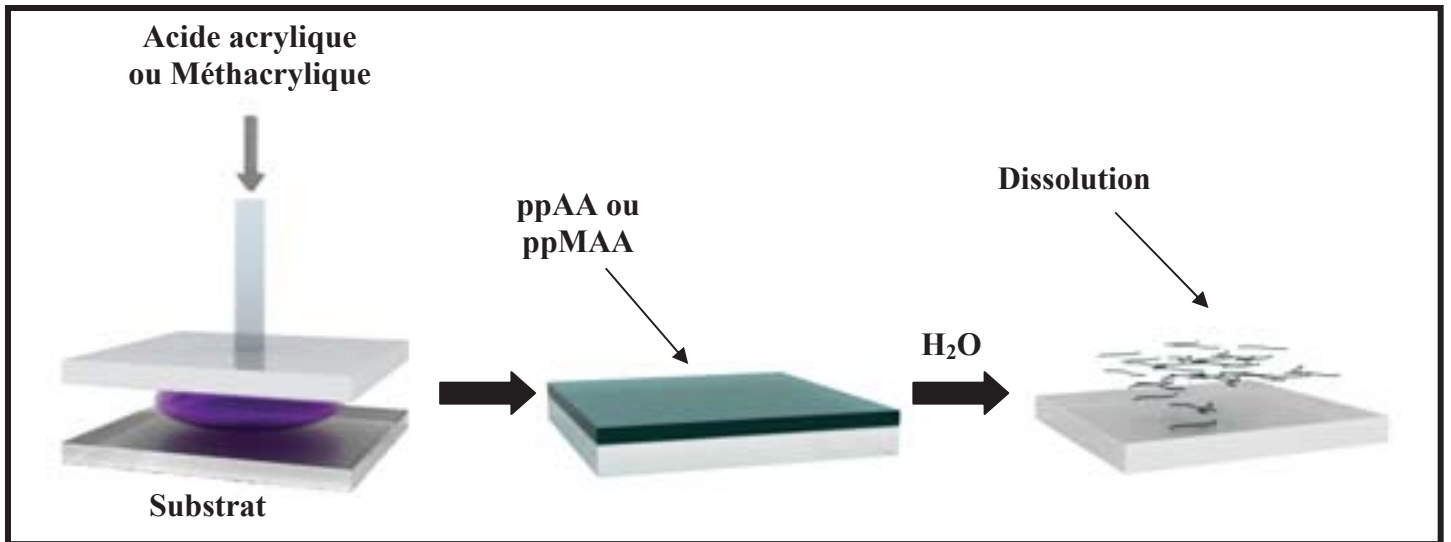
Figure 18. Représentation d'un microscope confocal à balayage laser. La présence du trou d'aiguille permet de ne capter que les signaux lumineux venant du plan focal, améliorant ainsi la résolution de l'image [120].

Les échantillons ont été déposés sur des substrats en verre et en polystyrène. Afin d'obtenir un nombre de section en z significatif, des films avec des épaisseurs de 4 μm et plus ont été préparés. Les enzymes immobilisées ont été marquées à la rhodamine B isothiocyanate dont la longueur d'onde d'absorption est centrée sur 550 nm. Les échantillons ont ensuite été observés à l'aide d'un microscope Nikon TE 2000U Eclipse équipé d'une tête confocal à balayage laser Biorad radiance 2100 Rainbow AGR3Q/BLD.

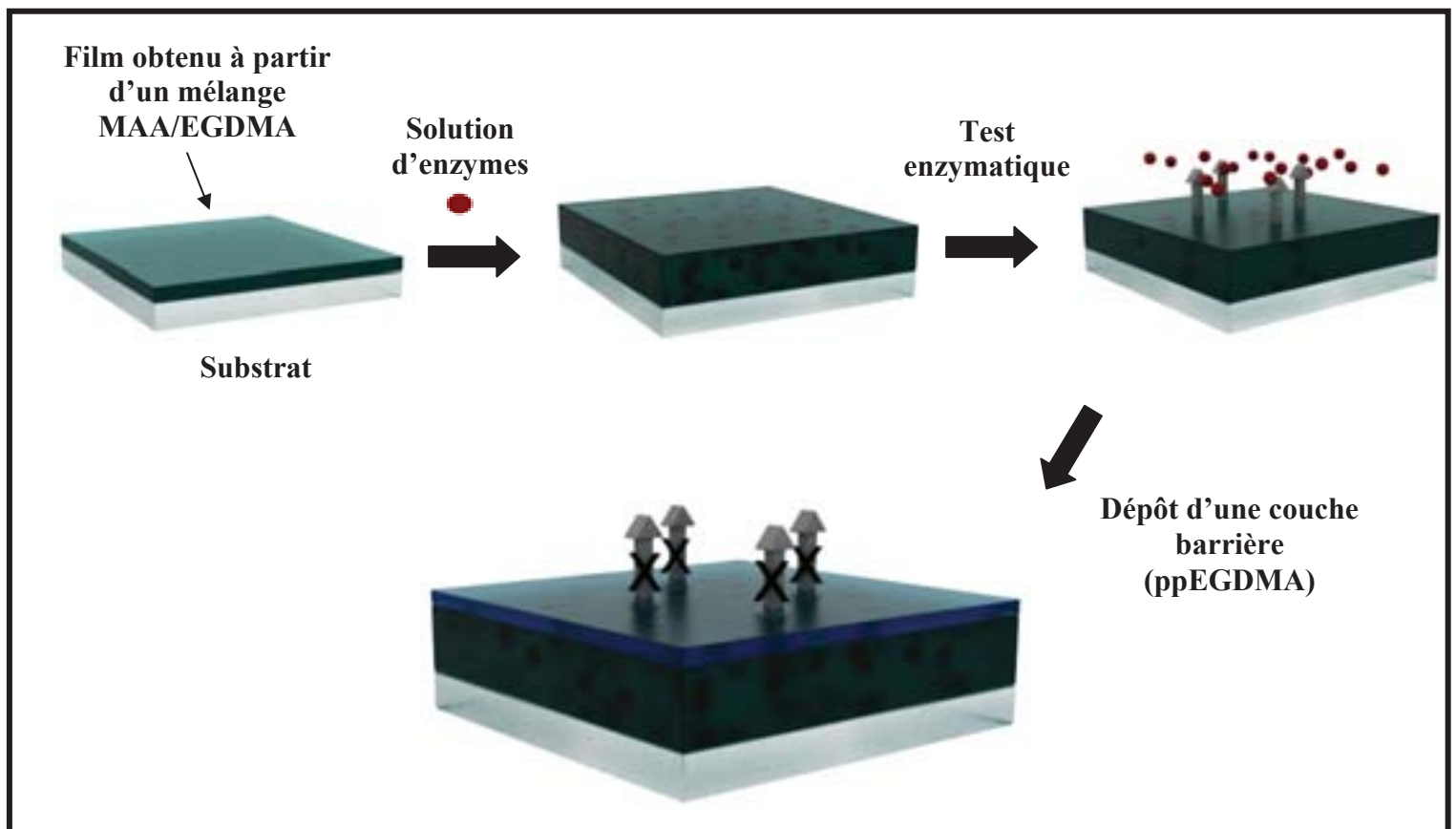
Chapitre 3

-

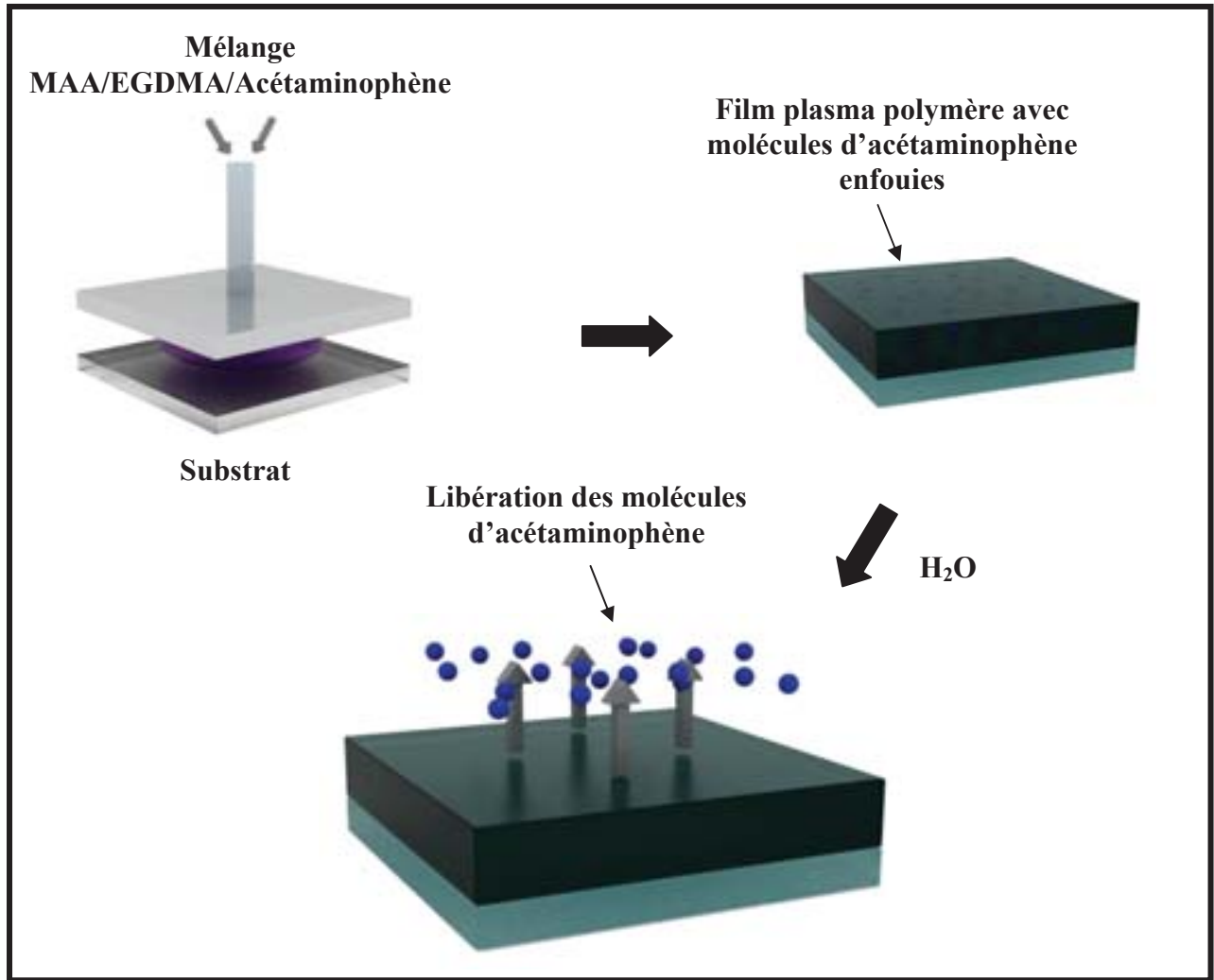
Résultats et Discussions



1ère Partie



Partie 2 et 3



4ème Partie

Infographie synthétique représentant la démarche d'ensemble de ce travail de thèse

Ce chapitre intitulé 'Résultats et Discussions' présente l'ensemble des résultats obtenus avec leurs propres interprétations et discussions. Il présente 4 différentes parties intitulées :

- Caractérisation de films polymères plasma obtenus à partir d'acide acrylique et méthacrylique : vitesse de croissance, morphologie, composition chimique et oligomérisation
- Conception d'un film polymère plasma flexible auto supporté comme support pour l'immobilisation d'enzymes
- Films polymères plasma : une alternative aux films (PSS-PAH)_n ou (PSS-PDADMAC)_n pour retenir l'activité enzymatique dans des polyélectrolytes assemblée en multicouches
- Préparation en une étape d'un film polymère plasma pour la libération de médicaments

La première partie de ce chapitre permet de mettre en évidence, la possibilité d'obtenir des films dont la teneur en groupements fonctionnels peut être modifiée en fonction des paramètres opératoires et du précurseur utilisé. Cette partie montre plus particulièrement le développement des outils nécessaires à la caractérisation des films polymères obtenus par polymérisation plasma. La partie 2 montre l'intérêt d'ajouter un agent réticulant lors de la phase de polymérisation pour l'obtention d'un support permettant l'immobilisation d'enzymes, dans le cadre de la création de la couche active d'un biocapteur. En effet, pour des applications de types biocapteurs ou systèmes à libération contrôlée, il est nécessaire de fabriquer des couches stables en milieu aqueux. La troisième partie met en évidence la possibilité de créer des systèmes barrières à la libération d'enzymes par procédé plasma à pression atmosphérique.

Pour finir, la dernière partie met en évidence la possibilité de piéger, durant la phase de déposition, une molécule de faible poids moléculaire. Une partie des molécules introduites durant la phase de déposition peuvent ensuite être libérée de façon lente et progressive lorsque l'échantillon est immergé dans une solution aqueuse.

1. Caractérisation de films polymères plasma obtenus à partir d'acide acrylique et méthacrylique : vitesse de croissance, morphologie, composition chimique et oligomérisation. Discussion et commentaires

Cette étude a pour but de mettre en évidence, la possibilité d'obtenir des films par l'intermédiaire d'un prototype plasma semi industriel à pression atmosphérique dont la structure chimique peut être modifiée en fonction des paramètres opératoires utilisés. En effet, comme on a pu le voir dans le chapitre 1, si des groupements polaires tel que les groupements carboxyle, hydroxyle ou amine sont introduits à la surface d'un matériau, une amélioration de certaines propriétés existantes, voire de nouvelles propriétés, peuvent être obtenues (meilleure mouillabilité, un meilleur caractère polaire et de meilleures propriétés hydrophiles par exemple). C'est pourquoi, l'utilisation de précurseurs à base de groupements carboxyliques (hydrophiles) est devenue une voie intéressante pour l'obtention de surfaces spécifiques dans différents domaines d'applications (biomédical, agroalimentaire,...).

Dans cette étude, les propriétés des dépôts obtenus par polymérisation plasma à partir de deux précurseurs (acide acrylique et méthacrylique) ont été étudiées en fonction des différents paramètres opératoires tels que la pression, la puissance et le temps, reliés entre eux par le paramètre de Yasuda (voir chapitre 1), dans le but de déterminer les conditions optimales pour l'obtention de surfaces riches en groupements carboxyliques.

Growth rate, morphology, chemical composition and oligomerization state of plasma polymer films made from acrylic and methacrylic acid under dielectric barrier discharge

Cédric Amorosi^a, Thierry Fouquet^a, Valérie Toniazzo^a, David Ruch^a, Luc Averous^b, Vincent Ball^{a}, Marc Michel^a, *Reactive and Functional Polymers*, 2012. 72: p. 341-348*

a : Department of Advanced Materials and Structures, Centre de Recherche Public Henri Tudor, 66 rue de Luxembourg, Esch-sur-Alzette, Luxembourg.

b : LIPHT-ECPM, Laboratoire d'Ingénierie des Polymères pour les Hautes Technologies, EAc(CNRS) 4379, Université de Strasbourg, 25 rue Becquerel 67087 Strasbourg Cedex 2 France.

1. Introduction

For various industrial applications, there is an urgent need to obtain cost effective coatings having the desired functional groups. The deposition methods which allow to obtain such coatings should be fast and performed in environmental friendly conditions. Among such methods, dielectric barrier discharge (DBD) at atmospheric pressure [121] makes it possible to modify the physical properties and the chemical composition of various substrates [122]. It is possible to control the chemical nature of the resulting plasma polymer by using appropriate plasma parameters (e.g., monomer flow rates, applied power) to provide homogeneous and pinhole free films with good surface coverage and preservation of the functional groups present in the used monomers [123]. In this way different articles show the possibility of using plasma deposition to obtain coatings with different chemically reactive moieties such as primary amine (-NH₂) and carboxyl (-COOH) groups which are widely used for applications in sensor technology and in life science [116, 124-127]. It has been established that through the control of the plasma parameters it is possible to produce plasma polymers coatings from acrylic acid with a high fraction of carboxylic functionality retained from the monomer [116]. Nevertheless, the properties of the films produced via atmospheric plasma polymerization do not only depend on their composition but also on their morphology and degree of oligomerization. The morphology and surface roughness are important for functional properties like the adhesion of the film with cells or colloids and the

oligomerization state of the deposited polymers plays a huge role in the long term stability of the coating. Very few investigations address the full characterization of films produced under atmospheric pressure dielectric barrier discharge (APDBD) and it is mandatory to address this question for improving the applications of those coatings.

The APDBD method constitutes a promising method of preparation [2], compared to low pressure processes. Indeed, it can afford an in-line deposition process because it is compatible with a roll-to-roll process [95]. Moreover, it has been observed that in most cases, APDBD allows for a low degree of monomer fragmentation thanks to a pressure sufficient for limiting the kinetic energy of charged species producing then less excited species [128].

Moreover, thanks to this advanced technique which is completely different from the conventional polymerization methods, we can tune the chemical surface composition without affecting its bulk properties. The aim of this study is to investigate plasma coatings made from acrylic acid (AA) and methacrylic acid (MAA) in order to determine how the addition of a methyl group on the acrylic acid to yield methacrylic acid from acrylic acid will affect the deposition rate as well as the film morphology and its chemical composition. Such an investigation is mandatory to get a better understanding of structure deposition mechanism and coating properties relationships. Indeed, only very few reports were devoted to a careful and multi-technique characterization of coatings produced from acrylic acid or its derivatives under atmospheric pressure conditions [129].

In addition, this paper will focus on a physical and chemical characterization of the films obtained under three different operational conditions in the plasma phase. The films were deposited by working at three different values of the Yasuda parameter [105, 106]. The value of this parameter corresponds to the ratio between the energy applied between the two dielectric plates of the reactor and the precursor's mass flow.

The full characterization of the coatings was performed using a combination of surface and volume sensitive techniques such as Scanning Electron Microscopy (SEM), Atomic Force Microscopy (AFM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), X-ray photoelectron spectroscopy combined with chemical labeling and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight (MALDI-TOF). This last method will allow to determine the oligomerization state of the obtained polymers which is only rarely investigated. In addition, in a previous attempt by our team, only the mass distribution of the soluble fraction of plasma polymerized hexadimethylsiloxane could be determined [111]. The aim of this work is to investigate the mass distribution from the polymers present in the solid

state. A real picture of the mass distribution of the polymer species without possible bias due to selective extraction of oligomers by the solvent will hence be obtained.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and plasma polymerization

Methacrylic acid (MAA) and acrylic acid (AA) were purchased from sigma Aldrich and used without any further purification. Silicon wafers and glass were purchased from Siltronix (Archamps, France) and Carl Roth, respectively. In this investigation, the deposits produced from MAA and AA monomers will be called ppMAA and ppAA respectively where pp means “plasma polymer”. Silicon substrates were cleaned in a freshly piranha solution (3:1 v/v in concentrated sulfuric acid and 30% hydrogen peroxide solution) during 15 min, rinsed in H₂O and ethanol prior to the deposition process (extreme care should be taken during the manipulation of piranha solution which may turn to be explosive in the presence of organic compounds). KBr pellets were prepared before the deposition experiments for the film characterization by means of infrared spectroscopy in the transmission mode.

The poly (acrylic acid) (MW 450,000) was supplied from sigma Aldrich and the poly (methacrylic acid) (MW 100,000) by Polysciences. The polymers were dissolved in methanol (20 µl per sample of 5% solution) and spun cast at 4000 rpm for 60 s onto 2 cm² silicon wafer substrate.

The different films were deposited using a semi dynamic atmospheric pressure dielectric barrier discharge (DBD) open air plasma reactor from VITO. This reactor has already been described in a previous paper [110]. During plasma polymerization, a gas mixture consisting of the carrier gas, helium, and small precursor particles (~100 nm) is allowed to flow between two aluminum plate electrodes in which a 3.25 mm thick glass plate prevents from direct arcing. The precursor is nebulized via a glass bubbler carried by a secondary flow of helium adjustable in the range of (1 to 2 bars) at room temperature. Then the mixture is introduced in the plasma area by the main flow of helium at 10 slm (standard liters per minute). The flow of carried gas is controlled using a mass flow controller (MKS instruments). The sample is placed between the electrodes and thus in the plasma area which is at atmospheric pressure and ambient temperature in an open air reactor.

To avoid a variation in film thickness which can occur during the process, the upper electrode is able to move at a constant speed (4 m min⁻¹) above the bottom electrode. The power and atomization pressure are controlled to check the influence of the operating parameters on the

final coating. These two latter parameters are linked to the Yasuda parameter ($Y = W/FM$). In the definition of this parameter, W is the electrical power absorbed by the plasma, F the flow of monomer, and M its molar mass. The average value of the monomer mass flow can be directly obtained by weighing the tube containing the monomer before and after plasma polymerization taking time for a duration of Δt . The electrical power is directly obtained from the voltage difference and the current circulating. The value of the Yasuda parameter describes the ratio between the energy applied and the precursor's mass flow and constitutes an important parameter allowing to produce reactive species able to undergo polymerization. The plasma polymers have been deposited under 3 different conditions corresponding to 3 different values of the Yasuda parameter: $Y_{low} < Y_{intermediate} < Y_{high}$. The corresponding Y values are given in Table 6. Note that in the configuration of an atmospheric plasma chamber, the value of the Yasuda parameter can only be approximate because there exist a probability that non ionized molecules may diffuse out of the plasma zone to the open air without being ionized, meaning that the same plasma power is distributed over a smaller number of monomers. This would mean that the given value of Y is an overestimation of the accurate value. The probability of molecules to escape from the plasma zone without undergoing energetic collisions is however small when the flow of monomer droplets is close to the power supply, which is the case in the configuration of the plasma reactor used in this investigation [110].

Samples	Yasuda (kJ/g) MAA	Yasuda (kJ/g) AA
Y_{low}	16.8±2	11±2
$Y_{intermediate}$	40.8±2	22±2
Y_{high}	73.3±8	42±3

Table 6. Values of the Yasuda parameters applied in this investigation. Note that for a given pressure and plasma power, the values of Y are not the same for MAA and AA.

The thickness of the plasma coatings was investigated as a function of the number of passes of the upper electrode above the substrate to be coated. One pass correspond to a polymerization time of about 6 s.

2.2. Characterization of the plasma polymer films

The chemical structure of the coating was investigated by an FTIR Bruker Optics Tensor 27 spectrophotometer which allows for the characterization of the functional groups which have been generated during the plasma polymerization. Plasma polymer films were directly deposited on KBr pellets and their infrared spectra were recorded in the transmission mode by accumulating 50 scans with a resolution of 4 cm^{-1} between 4000 and 400 cm^{-1} . The spectral region corresponding to the carbonyl groups (1600 - 1800 cm^{-1}) was decomposed in order to determine the fraction of carboxylic acid and ester moieties using the Casa XPS software. To determine the number of spectral components, the secondary derivative of the spectrum was calculated. Each minimum in the second derivative corresponds to one spectral component which was fitted with a Gaussian curve. The fraction of $-\text{COOH}$ groups in the film was determined by dividing the area of the fitted component at 1730 cm^{-1} to the whole area of the carbonyl band.

MALDI-TOF mass spectra were recorded using a Bruker Autoflex III mass spectrometer (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany) equipped with a Nd-YAG laser ($\lambda=355\text{ nm}$) operating at a pulse rate of 200 Hz . The analyzer was operated in the negative reflectron mode and ions were detected using a microchannel plate detector. External calibration was performed using potassium iodide clusters $[\text{K}_n\text{I}_{n+1}]^-$. The FlexControl software (version 3.0 from Bruker Daltonics) was used for instrument control and data acquisition, and the FlexAnalysis software (version 3.0 from Bruker Daltonics) for data processing.

Both acrylic and methacrylic acid plasma polymer samples were submitted to a solvent free preparation, consisting of grinding the matrix (IAA, Bruker Daltonics) together with the plasma polymer scratched away from the substrate. The matrix/polymer molar ratio was optimized for each polymer system. A few grains of the solid mixture were applied to the MALDI target then pressed with a small spatula to form a thin film. Potassium iodide pellets (from SDS, France) were similarly ground and applied to the target, and directly submitted to LDI analysis. Hence, the preparation method used herein allows to have access to the real distribution of the molar mass of the plasma polymers, ppAA and ppMAA, without a bias induced by the fact that solvent extraction allows only the m/z of the soluble oligomers to be measured [111].

The morphology of the plasma polymerized films was investigated by Atomic Force Microscopy (AFM). The AFM topographies of the dried films were acquired in the tapping mode with a Pico SPM microscope (Molecular Imaging) at a frequency of 1 Hz . Each AFM

image was acquired with a new pyramidal silicon tip. The line profiles of the obtained sections were averaged over 30 line scans.

The observation of the coatings was completed with a Quanta 200 Field Effect Gun Scanning Electron Microscope (FEG SEM) from Philips-FEI.

The surface chemical compositions was investigated by XPS (Hemispherical Energy Analyzer SPECS, Phoibos 150) employing a monochromatic Al K radiation operating at 200 W with an anode voltage of 12 kV. The pressure in the analysis chamber was of 6×10^{-8} mbar. The XPS spectra were referenced with respect to the C1s peak at 284.6 eV.

Because of the difficulty to distinguish the contribution of the acid from that of the ester in the carboxylic peak, trifluoroethanol (TFE) was used to label -COOH surface groups according to protocol described in literature [130, 131].

To that aim, samples were introduced into a glass test tube and exposed to the vapors of a solution containing TFE (0.9 mL), Pyridine (0.4 mL) and di-tert-Butyl-Carbodiimide (0.3 mL). All these compounds were purchased from sigma Aldrich. According to the stoichiometry of the reaction between carboxylic groups and TFE, three fluorine atoms are introduced per carboxylic acid group present on the surface of the film. Hence, the derivatization reaction leading to ester groups carrying a -CF₃ group was analyzed by quantification of the F1s, C1s and O1s XPS peaks. The optimal reaction time insuring complete reaction, hence access to all available and accessible carboxylic groups, was determined up to the level where no further fluorine uptake could be detected.

3. Results and discussion

3.1 Film thickness and morphology

Figure 19 shows the evolution of the film thickness as a function of the number of upper electrode passes above the bottom electrode onto which the substrate was deposited during the plasma polymerization. For both monomers, the films thickness grows linearly in proportion with the number of passes whatever the conditions used during the process. Nevertheless, a higher thickness increment, the slope of the thickness versus number of passes, can be obtained by using AA in comparison with MAA under the same operating parameters. The differences between the two monomers can partially be due to their different vapor pressure: 500 Pa for AA at 20°C and 100 Pa for MAA at 20°C. Hence, the monomers in the small AA droplets evaporate easier from the liquid state to the gas state than MAA molecules. This allows to produce a higher number of AA precursors available for ionization

in the presence of the active species in the plasma phase. This difference in volatility between both monomers is partially related to their difference in molar mass, MAA having a molar mass higher than that of AA by about 20%.

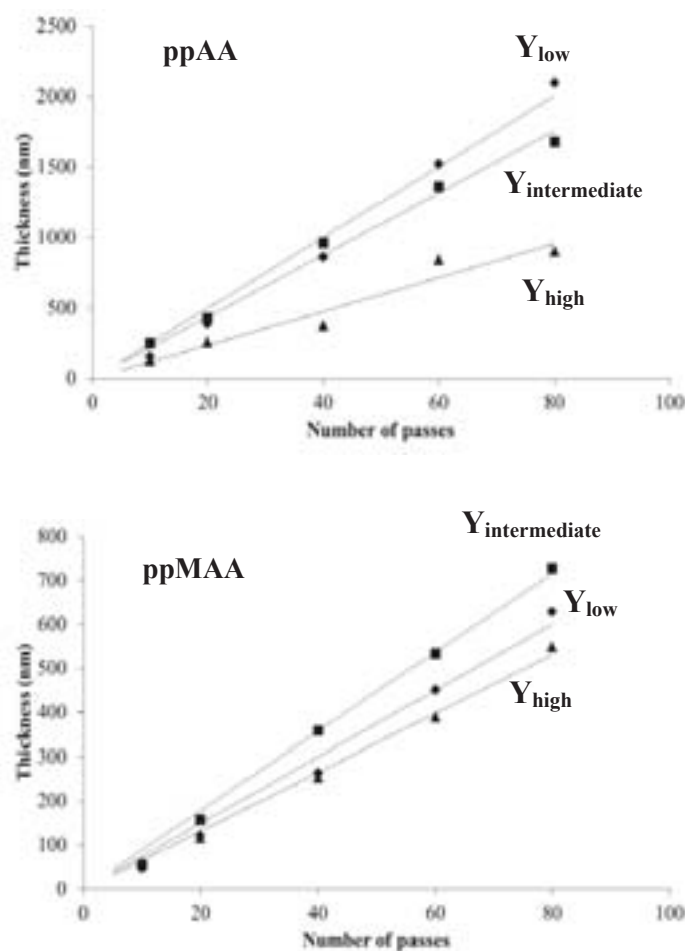


Figure 19. Thickness (measured by AFM) as a function of number of passes for AA and MAA to obtain ppAA and ppMAA plasma polymers deposited in conditions corresponding to different Yasuda parameters ($Y_{low} < Y_{intermediate} < Y_{high}$). The lines correspond to a linear regression to the experimental data. The Y values are listed in Table 6.

Moreover, high deposition rates can be observed for both precursors (from 100 to 242 nm min⁻¹ for ppAA and from 61 to 81 nm min⁻¹ for ppMAA). The highest thickness can be obtained when the deposition is performed under conditions corresponding to $Y_{intermediate}$ in the case of MAA. This observation is in-line with other investigations and can be explained by the different film growth regimes obtained when increasing Y as a function of time as described in the literature [107, 132].

The regime in which the film thickness increases with Y corresponds to operational conditions where the activated species have a far lower concentration than the monomer in the plasma phase. This region called the “monomer sufficient region” corresponds to the Y_{low} parameter (for ppMAA).

However for higher values of the Y parameter, the plasma polymer formation rate levels off. This regime corresponds to the beginning of the “competition region” where the deposition rate appears to be the highest ($Y_{intermediate}$). Above this region, the film thickness decreases with increasing further the value of the Y parameter. This is due to a lack of monomers in this “monomer deficient region” (Y_{high}).

In opposition to the behavior of MAA, when the coatings are produced from AA, it appears that the deposition rate decreases when the value of the Y parameter increases, at least in the range of Y values accessible with our plasma conditions. This difference observed between MAA and AA on the deposition rate of the coatings as a function of the Y parameter can be explained by the fact that for AA, the operating conditions all correspond to the “monomer deficient region” whereas for MAA it is possible to reach the “competition region” and the “monomer deficient region” under the same plasma conditions. This indicates that the curve representing the deposition rate as a function of the Yasuda parameter, for AA deposition, is shift to lower values of Y compared to the case of MAA. The deposition of MAA based coatings is done by applying a higher energy per molecule than for AA, as shown in Table 6. Figure 20 shows typical AFM topographies ($10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$) of the different coatings obtained for the different operating parameters after 80 passes corresponding to a total deposition time of 506 s. The film made from AA present different morphologies in comparison with those made from MAA. In this latter case, almost the same average roughness (13, 7 and 10 nm for Y_{low} , $Y_{intermediate}$ and Y_{high}) was obtained whatever the parameters used which indicates that the roughness of ppMAA coatings is not influenced markedly by the operating parameters. However, for AA based coatings, the average roughness is markedly impacted by the operating parameters (119, 49 and 2.5 nm for Y_{low} , $Y_{intermediate}$ and Y_{high}). For the lowest Yasuda values, the coating shows the presence of clusters which can be attributed to a growth mechanism different than that leading to the coatings produced under at higher energetic conditions.

The SEM micrographs (Figure 21) are consistent with the AFM topographies in the sense that films made from AA are much more porous than their counterparts made from MAA in conditions where the deposition is made under low energetic conditions.

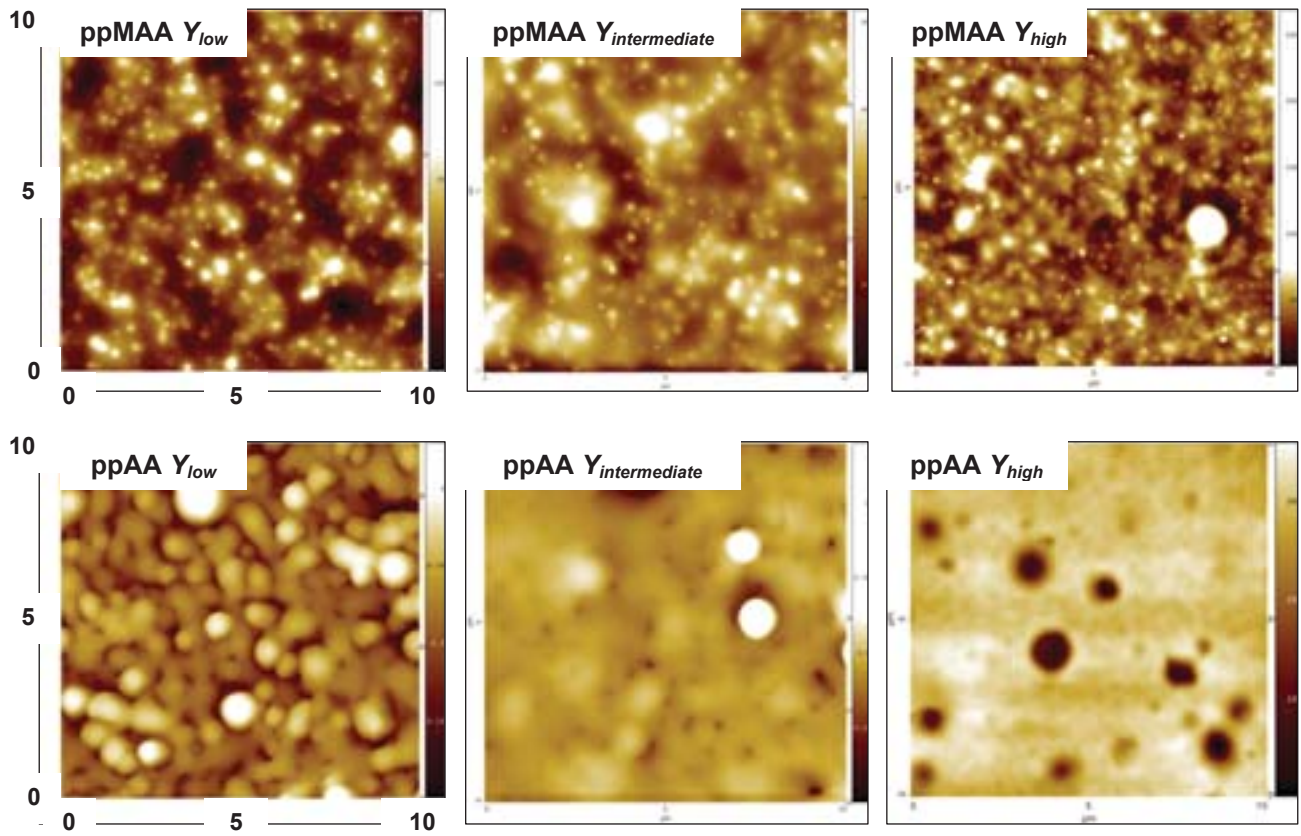


Figure 20. Typical AFM topography images (10µm x 10µm) obtained from coatings made from AA and MAA under different value of Y and after 80 passes.



Figure 21. Cross sectional SEM images obtained from the plasma polymers ppAA under conditions corresponding to the Y_{low} values and after 80 passes.

Cross sectional SEM images (Figure 21 and Figure 1 of the Supporting Information) reveal not only that the ppAA films are rougher than those produced from MAA under Y_{low} conditions but also that they are much more porous. This finding suggests that the different film growth regimes can lead to different roughness and porosity values and that the nature of the precursor used to produce the coatings is of major importance. The reason why AA leads to rough and porous coatings specifically under low plasma power will deserve further investigations.

3.2 Chemical composition of the plasma polymer films

In addition to the roughness and porosity, the films obtained through atmospheric plasma polymerization in DBD conditions should possess a tunable composition closely reflecting or differing from that of the used precursor. Hence, the deposited films were also investigated by means of FTIR spectroscopy allowing the determination of the chemical structure across the whole film.

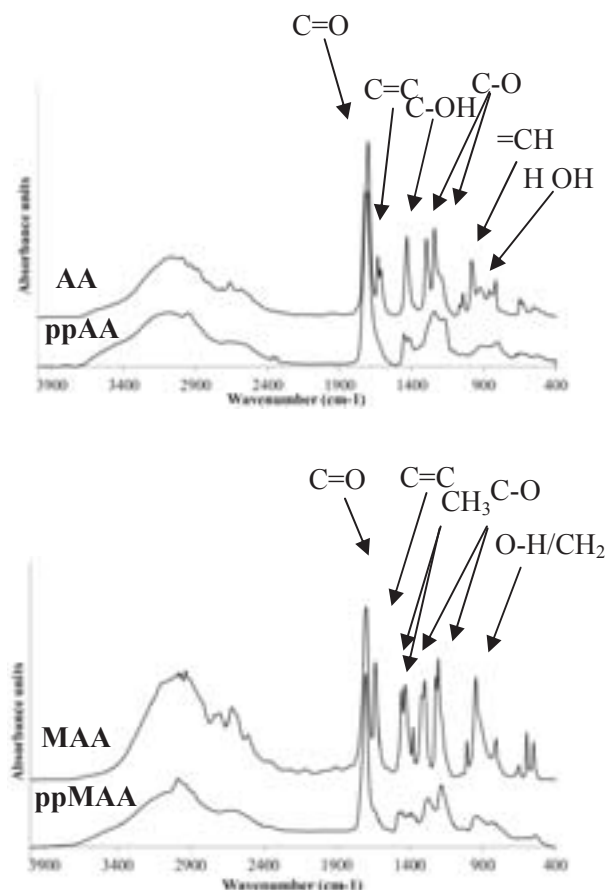


Figure 22. FTIR spectra acquired in the transmission mode for plasma polymer films made from AA (upper panel) and MAA (bottom panel) under energetic conditions corresponding to $Y_{intermediate}$. The FTIR spectrum of the monomer is displayed as a reference. The spectra are up-shifted for clarity.

The plasma polymers made from AA and MAA present the main signature [115] of the corresponding monomers, as observed in Figure 22, only showing the FTIR spectra of ppAA and ppMAA deposited under energetic conditions corresponding to $Y_{intermediate}$ value. The FTIR spectra of the coatings obtained under lower and higher energetic conditions are given in Figure 2 of the Supporting Information.

The band at 1700 cm^{-1} associated with the broader band centered at 3500 cm^{-1} is characteristic of the carboxyl groups and can be observed for both plasma polymers showing a good preservation of the functional group into the bulk. This band between 1800 and 1600 cm^{-1} appears to be quite complex and shows different contributions which can be associated to the C=O from ester and carboxylic groups as well as of the dimers formed by the C=O groups or the C=C double bonds or the ester groups formed by self-condensation [116].

The strong decrease of the vinyl group at 1640 cm^{-1} and at 930 cm^{-1} with respect to the monomer shows that the polymerization of the acrylate monomer occurs mainly through their double bond.

Several other characteristic features of the monomer FT-IR spectra were lost or modified by deposition i.e., the C-OH bend at 1430 cm^{-1} , the C-O stretching doublet at 1260 cm^{-1} , and the O-H out-of-plane bend at 930 cm^{-1} . Hence, the IR spectra show some differences with respect to the spectra of AA and MAA, showing that some fragmentation occurs during the deposition of the plasma polymers. The extent of this fragmentation will be investigated by means of XPS.

Overall, the strong correspondences of the IR spectra of the polymers synthesized by plasma polymerization and that of acrylic acid and methacrylic acid counterparts, tends to confirm that atmospheric pressure plasma deposition can lead to the formation of targeted polymeric structures. Taking the FTIR spectra into account, it appears that both for AA and MAA, the structure of the plasma polymers is very close to that of the respective monomers with exception of the quasi quantitative disappearance of C=C bonds as also observed with ^{13}C CPMAS NMR (data not shown).

In order to determine the proportion of the preserved carboxylic acid functions, it is necessary to distinguish the contribution of the acid from that of the ester in the band between 1800 and 1600 cm^{-1} . Figure 23 shows the results obtained concerning the carboxylic function preservation for ppAA and ppMAA under different conditions and after spectral deconvolution of the band between 1600 and 1800 cm^{-1} . It appears in both cases that carboxylic function is decreasing when the value of the Y parameter increases: 54 ± 2 , 58 ± 2 and $53\pm 2\%$ for ppAA and 70 ± 2 , 70 ± 2 and $46\pm 5\%$ for ppMAA for Y_{low} , $Y_{intermediate}$ and Y_{high} respectively. The decrease in the fraction of remaining carboxylic groups is more pronounced for ppMAA because of the higher energy applied per molecule in contrast with ppAA under Y_{high} conditions (see Table 6). Nevertheless, a high concentration of carboxylic functions is preserved during the process whatever the precursor used. This high level of carboxylic retention confirms the fact that APDBD allows for a low degree of monomer fragmentation thanks to a pressure sufficient for limiting the kinetic energy of charged species producing then less excited species.

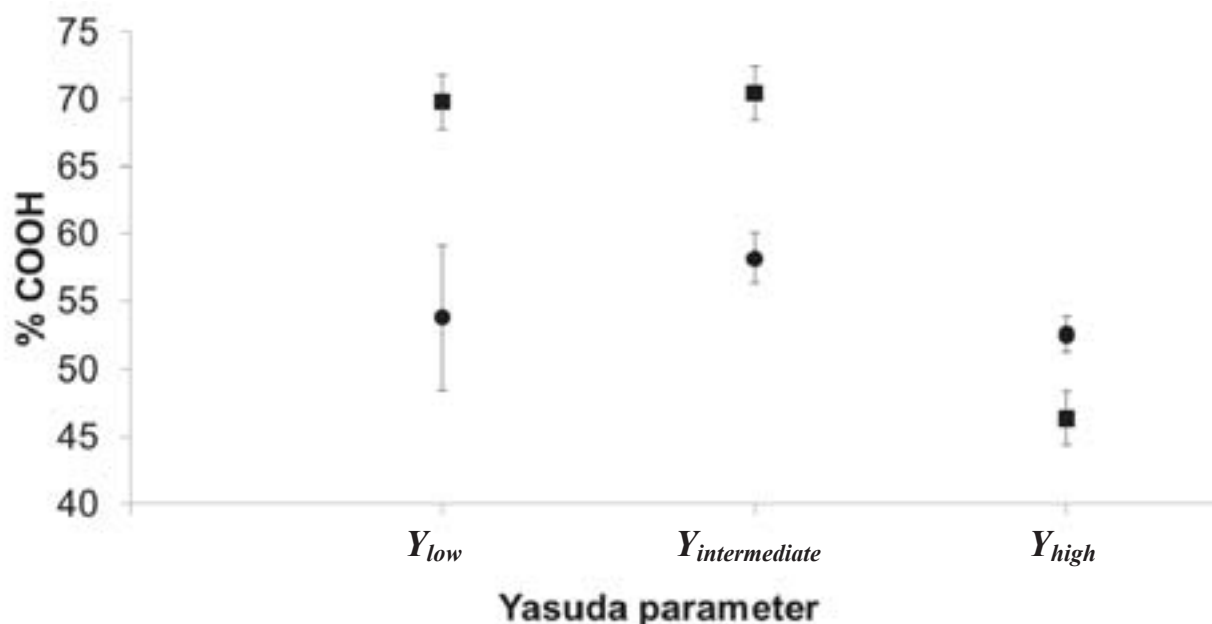


Figure 23. Percentage of COOH group preservation as a function of the Y parameter for ppAA (●) and ppMAA (■) as obtained from a spectral decomposition of the carbonyl bands measured in the FTIR spectra.

The experiment described previously shows a preservation of the functional group across the entire film thickness. Moreover, for different applications, as for example for surfaces interacting with biomolecules, it is mandatory to determine the amount of carboxylic groups at the extreme surface of the coating. To that aim, we used a more accurate compositional characterization of the plasma polymer films which consist in the use of trifluoroethanol (TFE) as an agent able to label the carboxylic groups in a specific manner. Similar group specific labeling techniques have been used to distinguish between and to quantify chemical moieties by means of XPS on the surface of plasma polymer films [133].

3.3. Derivatization of the plasma polymer films with TFE

To determine the optimal reaction times between the different reactants in the gas phase and the carboxylic functions in/on the film, commercially available poly (acrylic acid) and poly (methacrylic acid) were spin coated onto silicon substrates, exposed to TFE and characterized with XPS after different reaction times (Figure 3 of the Supporting Information). We found that a stoichiometric reaction, characterized by an F/O ratio of 1.5, can be obtained between pAA and TFE after ~9 h. Nevertheless, a slightly higher ratio than the theoretical value of 1.5 is found. It can be attributed to the relatively high adventitious

hydrocarbon contamination resulting from the high surface energy of the carboxylic acid polymers. In contrast to poly (acrylic acid), the expected F/O ratio of 1.5 is not reached for spin coated poly (methacrylic acid) and only 60% of carboxylic groups were labeled after 30 h of reaction. To explain this difference between poly (acrylic acid) and poly (methacrylic acid), Alexander et al. [109] proposed that the steric hindrance afforded by the methyl group of methacrylic acid may hinder the formation of the intermediary compound between the di-tBuC and the carboxylic acid.

Owing to these results, only ppAA was investigated for its ability to bind TFE. The derivatization reaction was allowed to proceed for 12 h, corresponding to the plateau value observed in Figure 3 of the Supporting Information. Hence, the chosen reaction time is sufficient to insure complete reaction between carboxylic groups and TFE.

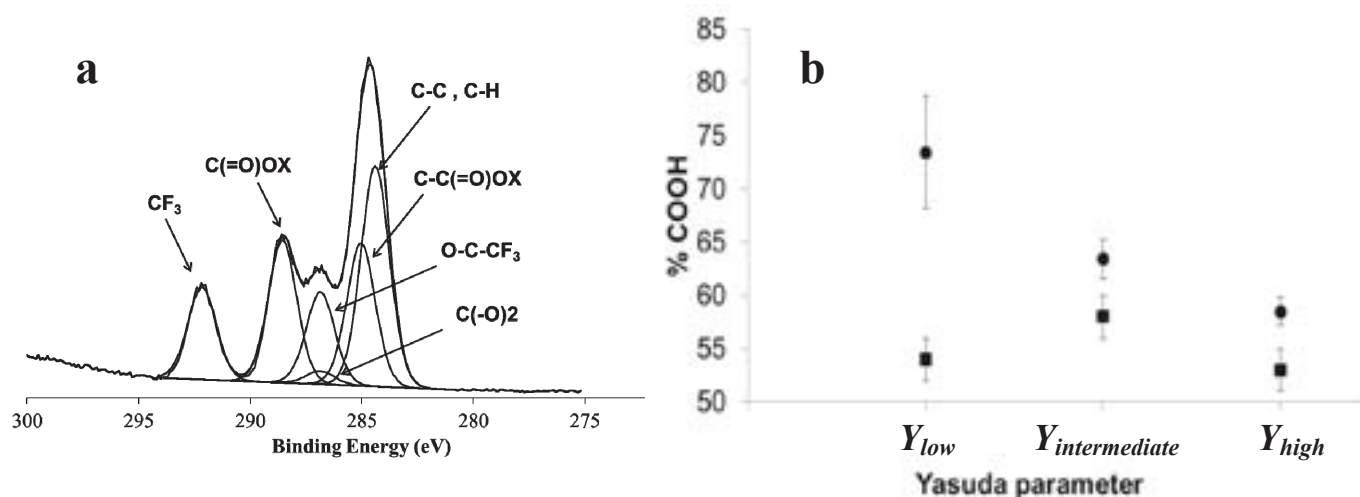


Figure 24. (a) XPS spectra highlighting the C1s core level and the fits to the peaks for ppAA after TFE reaction in conditions where the film was deposited under $Y_{intermediate}$ value. (b): percentage of carboxylic group preservation determined with (●) XPS and (■) FTIR in the case of ppAA films.

Only carbon and oxygen were detected before labeling as apparent from the C1s and O1s levels at 280 and 528 eV, respectively (Figure 4 of the Supplementary Data). The peak shape is influenced by the change of operating parameters, and changes in peak shape were quantified by curve fitting. In the C1s region, carbon environments from C-H/C-C, C(=O)OX, C-C(=O)OX, C-O, and -COO- groups (where X corresponds to an alkyl group or to H) are present on the film's surface before labeling (Table 1 of the Supporting Information). New chemical groups as -CF₃ and O-C-CF₃ can be observed after labeling with TFE (Figure 24a). It is then possible to calculate the ratio CF₃/C(=O)OX to determine the

proportion of carboxylic functions on the film's surface. Furthermore, the “C(=O)OX with C-C(=O)OX” and “CF₃ with O-C-CF₃” components will necessarily have approximately equal intensity. To simplify the fit, and to obtain a result which is acceptable on a chemical basis, the full widths at half maximum (FWHM) of all components in a given region were taken at the same value (1.28 eV before and 1.48 eV after derivatization). The same experiments were performed on films prepared in conditions of Y_{low} and Y_{high} . The proportion of carboxylic groups was found to be 73±5, 63±3 and 58±1% for Y_{low} , $Y_{intermediate}$ and Y_{high} respectively (Table 2 of the Supporting Information). These values have been compared with the results obtained with FTIR (Figure 24b). Note that the concentration obtained with XPS follows the same trend as the one obtained with FTIR, namely a decrease in the fraction of carboxylic groups upon an increase in the applied plasma power. The differences observed between FTIR and XPS can be due principally to the higher resolution obtained with XPS which allows to clearly distinguish the nature of carbonyl groups present at the surface of the film (~10 nm) which is not possible with FTIR spectroscopy. It has also to be remembered that FTIR is a bulk analysis technique whereas XPS is a surface sensitive technique and that some differences in chemical composition may exist between the film/air interface and the bulk of the film. This is possible owing to the dynamic aspect of the atmospheric plasma process, the film/air interface being exposed the last to the active species from the plasma (electrons, metastable species...) whereas the bulk of the film is already in a steady state and partially shielded from those active species. A more important difference is observed for energetic conditions corresponding to Y_{low} which can be attributed to the high roughness of plasma deposited film obtained in this condition. Taking into account this last point, deviation with stoichiometric TFE labeling reaction can be expected. Nevertheless, the fractions of carboxylic groups determined from FTIR and XPS spectroscopies are very close for the other energetic conditions, as was obtained by Friedrich et al. for plasma polymer films made from pulsed plasma deposition [116]. As previously described in the literature, by increasing the energy applied per molecule, the proportion of carboxylic group decreases to the benefit of ester groups which can lead to a higher crosslink density in the films [130].

3.4. Molecular weight distribution in the plasma polymer films

Complementary, the chemical structure analysis was completed by MALDI-TOF mass spectrometry to get information about the degree of polymerization of the polymers present in the deposits produced through atmospheric plasma polymerization. The negative MALDI-

MS spectra of plasma-polymerized acrylic acid and methacrylic acid polymers obtained from the films display numerous polymeric distributions of mono deprotonated ppAA (Figure 25a) monomer of 72 Da and mono deprotonated ppMAA (Figure 25b) monomer of 86 Da in the 100 to 1500 m/z range. The analysis was performed under two different conditions corresponding to Y_{low} and Y_{high} and was limited to the 400 to 1500 m/z range for sake of clarity, because no peaks were apparent at higher m/z values. A set of three distributions spaced by 2 Da to each other dominate the spectra in both cases, being detected up to the 16-mer and annotated with grey filled square, triangle and circles (■, ▲ and ●) for AA and black filled square, triangle and circles (■, ▲ and ●) for MAA. Hypothetic structures for these series are depicted below the MS spectra, exhibiting a linear backbone terminated by different end groups: two unsaturated (M)AA units (■, ■), both unsaturated and saturated (M)AA units (▲, ▲) and two saturated (M)AA units (●, ●) accounting for the 2 Da shift between oligomers. Such structures are thus suspected to emerge from radical driven monomer addition and termination reaction implying hydrogen radicals or unreacted monomer units. The other distributions detected in both ppAA and ppMAA are originally present in the plasma polymer thin films and do not arise from consecutive dissociations of the three main series. The fragmentation routes previously described [134, 135] indicate water eliminations eventually combined with carbon dioxide releases to be the main dissociation pathways for both deprotonated ppAA and ppMAA. The m/z shift between main and the secondary oligomers in MALDI-MS spectra differs from 18 or 44 Da. These minor distributions could thus roughly be described as a pp(M)AA linear and/or ramified backbone with unidentified chain ends. Interestingly, as depicted in the inset on Figure 25a, the ppAA MS spectra remain quite similar in terms of detected oligomers and relative abundances of the distributions regardless of the Y parameter used during the plasma polymerization step, even if the water insoluble part increases with the plasma power owing to a higher fraction of ester groups (as expected from Figure 24). On the contrary for the ppMAA, the distribution noted with black squares (■) and containing the two unsaturated MAA end-groups vanishes when increasing Y parameter, while the relative abundance of the mono- and di-saturated distributions increases (▲ and ●, Figure 25b inset). Such an evolution could be associated to higher activation energy for the MAA monomer requiring a higher Y value to activate the double bond and allowing a more efficient monomer consumption to take place as observed in the previous section. In this way, for both ppAA and ppMAA, oligomers made of up to 16 monomers can be detected which is similar to the result obtained upon the APDBD polymerization of hexamethyldisiloxane [111].

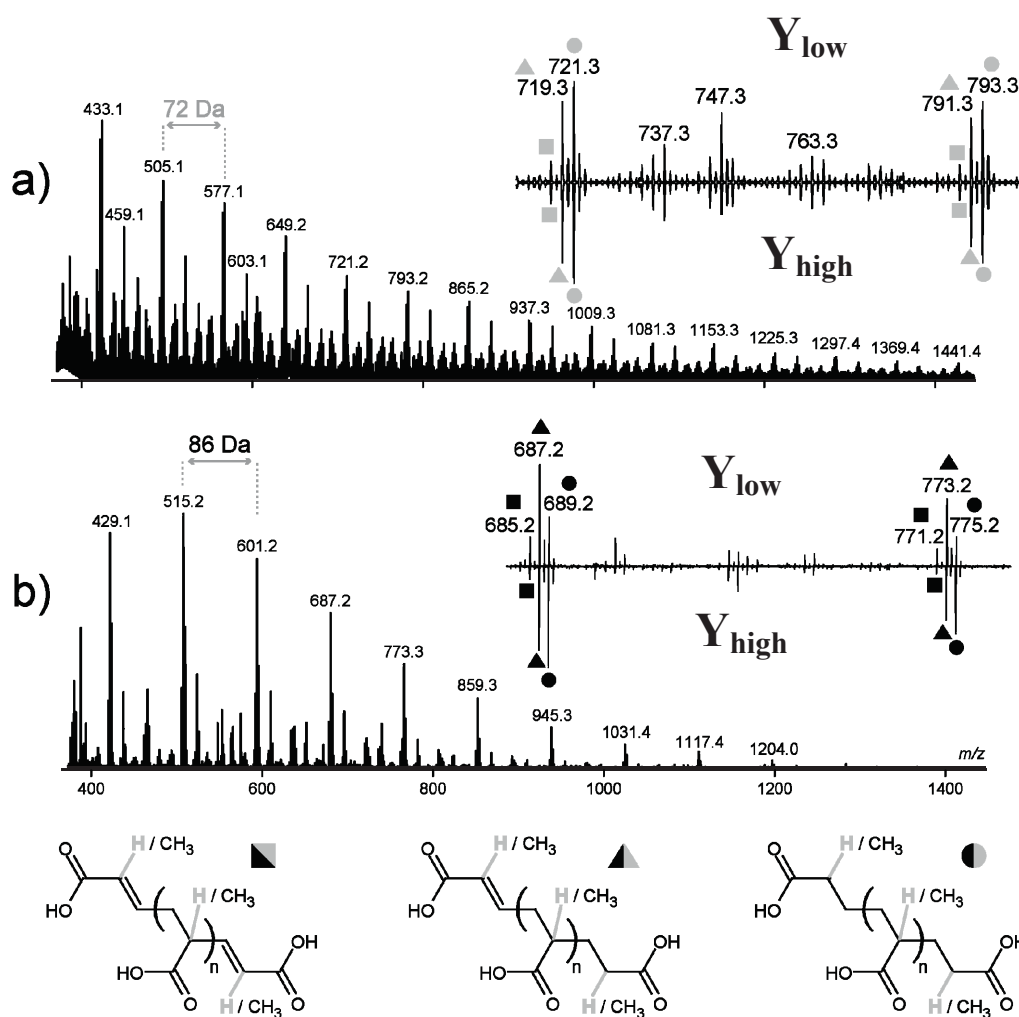


Figure 25. Solvent-free MALDI mass spectra of the whole plasma-polymers deposits from **a)** acrylic acid and **b)** methacrylic acid monomers. The inset shows the zoom on the m/z 650-800 range of low and high Yasuda parameter plasma conditions. Hypothetic structures for the three main distributions spaced by 2 Da are depicted below the spectra and annotated with grey (PAA) and black (PMAA) filled squares, triangles and circles in the inset (■, ▲, ● and ■, ▲, ●).

4. Conclusion

In the present work, films made from AA and MAA via APDBD plasma polymerization were compared by varying the value of Yasuda's parameter (W/FM). Depending on the conditions of the process, the deposition rate, the roughness and the functional group preservation could be influenced.

Indeed, according to the precursor used, some differences can be observed. Relatively smooth coatings can be obtained using methacrylic acid. On the other hand, acrylic acid monomer tends to create relatively rough coatings with high deposition rate which are mostly influenced by the operating parameters. The roughness and the thickness of the film made from acrylic acid tend to decrease when increasing Yasuda parameter. In addition, MALDI-TOF mass spectrometry allowed to show that different end groups can be obtained for ppAA than for ppMAA. Nevertheless, similar proportion of functional group preservation and chain length can be observed in the films made from both precursors.

The main message of this work is that optimal plasma polymerization parameters have to be carefully adjusted for each precursor which is introduced into the plasma, in order to control the film morphology as well as the preservation of functional groups. The addition of one methyl group to the acrylic acid monomer to yield methacrylic acid has important consequences in term of film morphology and growth regime as well as in the oligomerization state of the species present in the film.

The approach presented herein highlights the fact that atmospheric plasma polymerization is a straightforward tool allowing to design fast prepared architectures for specific applications. Further studies are in progress to control plasma copolymerization where the plasma is sustained in a mixture of functional and non-functional hydrocarbon monomers [136, 137]. One particular aim is to improve the adhesion of the plasma polymer films to the silicon substrate as well as their stability in the presence of water.

Dans cette étude, l'influence des paramètres opératoires et le choix du précurseur ont été investis afin d'obtenir des surfaces riches en groupements carboxyliques, le tout grâce à un prototype plasma semi industriel. En effet, ces groupements sont capables d'interagir avec leur environnement (en modifiant le pH) ainsi qu'avec une large variété d'enzyme.

Pour ce faire, différents outils de caractérisation ont été utilisés afin de comparer les propriétés des dépôts obtenus. Ainsi, en fonction des précurseurs utilisés et des paramètres opératoires appliqués, des différences sur les structures chimiques finales ont pu être observées. En effet, les dépôts obtenus à partir d'acide méthacrylique apparaissent peu rugueux. Par contre, l'acide acrylique tend à créer des dépôts beaucoup plus rugueux dont les vitesses de croissance sont nettement supérieures et qui sont largement influencées par les paramètres opératoires. De plus, la rugosité et l'épaisseur tendent à diminuer avec l'augmentation du facteur de Yasuda. Les analyses en spectrométrie de masse ont révélé l'obtention, dans les deux cas, d'oligomères.

Cette partie présente les différents outils nécessaires à la caractérisation des films polymères obtenus par polymérisation plasma. Dans le but de déterminer la quantité de groupements carboxyliques présents à la surface du dépôt, un marquage au trifluoroéthanol a été réalisé. Les résultats obtenus montrent une bonne conservation des groupements fonctionnels avec une influence des paramètres opératoires plus marquées dans le cas des films obtenus à partir d'acide méthacrylique.

Cependant, il semble que quelque soit les paramètres appliqués, les films obtenus ne possèdent pas une stabilité chimique et un degré de réticulation suffisant pour être utilisés pour des applications de types biocapteurs. Aussi, afin d'obtenir une structure suffisamment réticulée et stable, des travaux complémentaires ont été réalisés. Ils portent notamment sur l'ajout d'un agent de réticulation lors de la phase de déposition.

2. Conception d'un film polymère plasma flexible auto supporté comme support pour l'immobilisation d'enzymes. Discussion et commentaires

Comme on a pu le voir dans la partie précédente, il est possible, grâce au prototype plasma, utilisé pour notre étude, à pression atmosphérique, d'obtenir à partir d'acides acrylique et méthacrylique, des surfaces riches en groupements carboxyliques. Ces derniers étant capables d'interagir avec une large variété de protéines. Néanmoins, la stabilité chimique des dépôts observés lors de nos tests d'immersion en milieu aqueux est insuffisante pour qu'ils puissent être utilisés dans le cadre de nos applications.

Dans cette partie, nous avons donc décidé d'introduire à la solution de départ, un agent réticulant (EGDMA) dont l'influence a été étudiée à travers les films obtenus après polymérisation plasma, pour des paramètres opératoires donnés. La quantité de groupements fonctionnels présents dans le film et le degré de réticulation du film sont autant de paramètres qui peuvent influencer la quantité d'enzymes immobilisées ou encore son pouvoir catalytique dans le cadre des applications de type biocapteur. De plus comme on a pu le voir dans le chapitre 1, les enzymes possèdent certaines limitations liées à la conservation de leurs activités. Celle-ci est fortement influencée par le pH, la température et la force ionique de la solution avec laquelle ils sont en contact. Afin de préserver au mieux les propriétés catalytiques des enzymes, il est alors nécessaire de les immobiliser tout en préservant leurs conformations spécifiques. C'est pourquoi, nous avons décidé dans cette partie, d'étudier des films plasma polymères obtenus à partir d'un mélange d'acide méthacrylique et de diméthacrylate d'éthylène glycol. Ce film devra ensuite servir à l'immobilisation de la phosphatase alcaline, qui hydrolyse les phosphomonoesters en libérant du phosphate, pour l'obtention de la couche active du biocapteur. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'étude de la matrice en analysant la structure chimique et en déterminant les groupements fonctionnels présents dans le film. La méthode utilisée a été développée par Shushi Sano et al. Elle permet la quantification des groupements présents dans le film grâce à l'utilisation d'un colorant capable d'interagir via des liaisons faibles (de type électrostatique) avec les groupements acrylate présents à $\text{pH} > 4$. Afin de rendre la couche obtenue par plasma active, cette dernière est mise en contact avec une solution de PA à $\text{pH} 8.4$ puis analysée par TOF-SIMS et microscopie confocale afin de vérifier la bonne distribution de l'enzyme dans le film. Pour finir des tests d'activités enzymatiques ont été réalisés en immergeant les échantillons dans une solution contenant du paranitrophenyl phosphate.

Design of flexible free standing plasma polymer-based films as hosts for enzyme immobilization

Article accepté dans The Journal of Physical Chemistry C

Cédric Amorosi^a, Christian Mustin^b, Gilles Frache^c, Ahmad Fahs^f, Grégory Francius^f, Valérie Toniazzo^a, David Ruch^a, Philippe Bertani^d, Vincent Ball^a, Luc Averous^e, Marc Michel^{a*}

a : Department of Advanced Materials and Structures, Centre de Recherche Public Henri Tudor, 5 rue Bommel, L-4940 Hautcharage, Luxembourg.

b : Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols (LIMOS), Université Henri Poincaré, Nancy, France.

c : Département Science et Analyse des Matériaux, Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann, 41, rue du Brill L-4422 Belvaux, Luxembourg.

d : Laboratoire de RMN et Biophysique des Membranes, UMR 7177 LC3 Chimie Université de Strasbourg, 8 allée G. Monge, 67083 Strasbourg.

e : LIPHT-ECPM, Laboratoire d'Ingénierie des Polymères pour les Hautes Technologies, EAc(CNRS), 4379, Université de Strasbourg, 25 rue Becquerel 67087 Strasbourg Cedex 2 France.

f : Laboratory of Physical Chemistry and Microbiology for the Environment, LCPME-CNRS UMR7564, 405 rue de Vandoeuvre, 54600 Villers-lès-Nancy, France.

1. Introduction

Proteins and enzymes, used as biocatalysts and/or as biological affinity species for recognition and detection of analyte, have been used by researchers for many years [138-140]. This is due to their unique properties in terms of specificity, mild reaction conditions, and stereoselectivity, making enzymes good candidates for a plethora of applications and for the design of ultra-sensitive biosensors [141-143]. Unfortunately, protein engineering and enzyme production still remains extremely costly with low stability for being considered usable at a large scale. Consequently, and for this reason, immobilization and re-utilization techniques have been developed [55, 144]. For example, the immobilization of enzymes on a carrier has shown to be a pretty elegant method allowing to increase the stability and the reusability of the enzyme. Nevertheless, and despite promising developments, immobilization methodologies still remain challenging and present some lacks. For example, the use of a

solvent along with methods demanding several steps, tend to limit straightforward production of biosensors or biochips [140].

In addition, the covalent immobilization of the enzyme, even if it allows to reduce the probability for conformational changes of the immobilized enzyme, requires a good control over the orientation and hence the grafting to the substrate requires a specific amino acid. Such a site can be the N terminus of the protein that can be modified with a histidine (His) tag. The His tagged protein can then be fixed to a substrate modified with a bifunctional ligand carrying a nitrilotriacetic (NTA) binding site. The coordination sphere of Ni^{2+} cations will then be completed by both the NTA and a Histidine bound to the protein to be immobilized. Even if such strategies are highly elegant and allow for a reversible immobilization of the enzyme, they require sophisticated surface modification technologies and protein engineering.

As alternatives to highly specific surface functionalization methods as the one used to immobilize NTA on metal surfaces, namely self-assembled monolayers, considerable efforts have been made to coat surfaces by means of plasma polymerization. Such functionalization methods allow to tailor the surface in a non-specific and versatile manner by introducing functional groups creating an adequate environment allowing many analytes to be incorporated on or in the plasma polymer matrix [145, 146].

In this frame, the last years have seen the apparition of new coating methods based on the so called “plasma deposition” [105]. This technique allows the deposition of plasma polymer-based films onto a wide range of substrates through polymerization initiated by radical, ionic, and other active species from a plasma discharge. Compared to electropolymerization of the host matrix, plasma polymerization does not require a conductive substrate and is therefore more versatile to immobilize active biomolecules. Nevertheless, it has been shown that harsh conditions occurring during the plasma process tend to affect the biological activity of fragile species such as enzymes and proteins. Among various plasma processes, the so called Atmospheric Plasma Dielectric Barrier Discharges (APDBDs) have recently received a lot of attention due to the easy formation of a stable discharge usually generated in the space between two parallel electrodes, at least one of them being covered with a dielectric layer [89]. This technique is nowadays considered as a promising and versatile technique to manufacture plasma polymer films with functional properties without affecting the intrinsic structure of the substrates. Another advantage of such a coating method concerns the fact that APDBD can afford an in-line deposition process. Moreover, it has been observed that in most

cases, APDBD allows for a low degree of monomer fragmentation thanks to a pressure sufficient for limiting the kinetic energy of charged species producing then less excited species. Up to now, only few papers reported on the successful deposition of enzymes and proteins after plasma deposition due to a water-free environment forcing the enzymes to adopt a stable conformation in the coating. Recently, Heyse et al. [143] used atmospheric pressure plasma deposition for the design of films containing an enzyme, glucose oxidase (GOx), which was directly introduced during the plasma process. They demonstrated that GOx was protected against the harsh plasma environment by the surrounding monomers, acting as “shuttles” while being entrapped in the growing polymer network. The originality of this work was to show that enzymes can be incorporated directly in a plasma polymer matrix in a one-pot approach by means of atmospheric plasma deposition [143].

Inspired by this previous work, the present study aims at showing the possibility to design free standing plasma polymer matrices able to entrap enzymes through specific interactions to create flexible biosensors. The enzyme will be entrapped in the plasma polymer matrix by single diffusion from the solution in contact with the plasma polymer coating, in analogy to similar diffusion processes that have been observed in polyelectrolyte multilayer films [147]. Provided the plasma coating is porous enough and/or if stimuli responsive porosity is initiated in the presence of water, the enzyme could find highly hydrated traps allowing for its immobilization in functional conformations while access to the enzyme's substrate still remains possible. Such a strategy would allow to considerably reduce the experimental efforts required to immobilize the enzyme in its native state and accessible to its substrate without the use of complicated synthetic strategies. Such films based on plasma polymer coatings and entrapping functional enzymes could be useful as biosensors, the more so if the composite films could be produced as flexible and free standing membranes. Indeed, one of the ways to make a sensor flexible is to fabricate the sensor device directly on flexible substrates. By designing flexible sensors one could imagine a plethora of possibilities for biomedical applications with implanted chips that could be used to detect molecules being labels of specific diseases, in the textile industry with flexible sensors embedded into the fibers or clothes to make clothing with the ability to monitor biological constants. Fortunately APDBD allows to coat flexible substrates. It is also of the highest interest to be able to detach the enzyme loaded coating as a free standing membrane. This point will be addressed in the present article.

Herein, to obtain a coating with tunable functional groups able to interact with enzymes as well as high water stability, a chemical copolymerization of Methacrylic acid (MAA) with

ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as a “crosslinker” co-monomer was initiated using the atmospheric pressure plasma technique in the continuous mode. As previously described [148], we intended to initiate the polymerization thanks to the use of a plasma discharge. The distribution of the model enzyme, alkaline phosphatase, across the section of the film, after its diffusion from solution was investigated by using Laser Scanning Confocal Microscopy and Time of Flight Secondary Ions Mass Spectrometry.

In order to show that the plasma based film can be used as a biosensor, the coating was finally put in contact with Alkaline Phosphatase (AP), and used as sensor. The Enzymatic activity was followed through the production of paranitrophenol from the hydrolysis of paranitrophenyl phosphate (PNP).

2. Materials and methods

2.1 Plasma copolymer preparation

MAA and EGDMA (from Sigma Aldrich) were chosen because of their ability to create highly crosslinked networks containing carboxylic groups. Both chemicals were simply mixed together taking into account their reactive group (C=CH₂) but without any consideration of their chemical reactivity parameters [149]. Both components were mixed together for 15 min and put in a 25 ml volumetric flask before being introduced in the chamber consisting in a semi dynamic (APDBD) open air reactor [110]. The molar fractions of both MAA and AGDMA were varied but most experiments were performed for a mixture of 80% MAA and 20% EGDMA. The monomer mixture is introduced in the plasma area thanks to a carrier gas, Helium (AirLiquide). The mixture consisting of solution droplets under Helium gas is then submitted to a discharge between two aluminum plate electrodes in which a 3.25 mm thick glass plate prevents from direct arcing. Plasma discharge is then generated by an AC power supply with a frequency of 6 kHz. To avoid a variation in film thickness which can occur during the plasma polymerization process, the upper electrode is able to move at a constant velocity (4 m.min⁻¹) above the bottom electrode depending on the expected film thickness. The glass (Carl Roth) and silicon (Silicon Materials) substrates were cleaned with a freshly prepared piranha solution (H₂O₂ at 30% and H₂SO₄ in a 1:3 volume ratio), during 15 min and intensively rinsed with distilled water just before the deposition of the plasma film (*Caution*: piranha solution is extremely corrosive and should be freshly prepared before each experiment). The deposition rate of the plasma polymer films was investigated by Atomic Force Microscopy (AFM) allowing to measure the film thickness as a

function of the deposition time or the number of passes of the upper electrode above the substrate to be coated. Images were acquired in the tapping mode with a Pico SPM microscope (Molecular Imaging) at a frequency of 1 Hz. Each AFM image was acquired with a new pyramidal silicon tip. The line profiles of the obtained sections were averaged over 30 line scans. Experiments were performed in air at room temperature.

The IR analysis was performed with an FTIR Bruker Optics Tensor 27 spectrophotometer. KBr pellets were used as substrates during the deposition because of its transparency in the IR domain. Infrared spectra of the plasma polymer films were recorded in the transmission mode by accumulating 50 scans with a resolution of 4 cm^{-1} between 4000 and 400 cm^{-1} . The NMR spectra were taken with a Bruker Solid State DSX 300 MHz NMR spectrometer. Films were directly scrapped from the upper dielectric after plasma polymerization and transferred to a 4 mm NMR rotor. The ^{13}C CP-MAS experiments spectra were recorded at 298 K on a Bruker Solid State DSX 300 MHz NMR spectrometer equipped with a Bruker 4 mm $^1\text{H}/\text{X}$ CP/MAS probe. A shaped Cross-Polarization pulse sequence with tangential modulation on both channels was used. The spinning rate was set to 10 kHz, the spectral width was of 30 kHz, the contact time was 1.6 ms, proton RF field was around 100 kHz for decoupling and 40 kHz for contact, with a recycle delay of 2 s.

The amount of carboxylic groups before and after water immersion for 12 hours was determined in the whole volume of the film and on its surface according to the method described by Sano and al. [119]. This method is based on Toluidine Blue binding to the deprotonated carboxylic groups of the film. The optimal reaction time ensuring complete reaction, hence access to all available and accessible carboxylic groups, was determined up to the level where no further variation in dye concentration was found. Carboxyl groups on deposited coating were complexed with Toluidine Blue O ($5 \times 10^{-4}\text{ M}$, from Sigma Aldrich) at pH 10.0 ± 0.1 , overnight. Non-complexed dye was removed with NaOH (10^{-4} N) and desorption of dye molecules complexed to the carboxyl groups on the film was conducted with a solution at pH 3.0 ± 0.1 . Absorbance at 633 nm was used to quantify the bound dye. The absorbance measurements were performed thanks to a UV spectrophotometer (Perkin-Elmer model lambda 35) equipped with quartz cuvettes.

2.2 Enzyme immobilization

Alkaline phosphatase (AP) from bovine intestine mucosa was purchased from Sigma Aldrich (90% in purity) and used without purification. Fresh AP solutions were prepared at 0.5

mg.mL⁻¹ in a 0.15 M NaCl solution before each new experiment. The sodium salt of paranitrophenyl phosphate hexahydrate (Sigma-Aldrich) was dissolved at a concentration of 3 mM in a 10 mM Tris buffer + 0.15 M NaCl and the pH was adjusted to 8.4.

The AP solution was put in contact for 15 h with different films deposited by APDBD plasma polymerization. The films were then rinsed with the Tris buffer solution for 1 min and either directly used for enzymatic assays.

2.3 Characterization of the plasma film containing AP

The surface chemical compositions was investigated by means of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) (Hemispherical Energy Analyzer SPECS, Phoibos 150) employing a monochromatic AlK α radiation operating at 200 W with an anode voltage of 12 kV. The pressure in the analysis chamber was set at 6.10⁻⁸ mbar. The XPS spectra were referenced with respect to the C1s peak at 284.6 eV.

Because the XPS is a technique sensitive to only the first few nanometers at the film/vacuum interface, it does not allow to give the distribution of the enzyme through the whole film thickness. Hence, complementary analytical methods were used to follow the distribution of AP inside the coating. In this way, AP was labeled with Rhodamine B Isothiocyanate to be detected with confocal microscopy. A standard labeling procedure was employed for that aim, the enzyme being solubilized at 1 mg.mL⁻¹ in a sodium carbonate buffer at pH 8.5. The dye was dissolved in dimethylsilfoxide and added to the aqueous solution to reach a dye/protein ratio of 1/60 (on a molar basis). The labeling of the protein was allowed to proceed for one hour at ambient temperature and in the dark. The excess of unbound dye was removed by means of dialysis using a membrane with a molecular weight cut off of 10⁴ g.mol⁻¹ (Spectra Por). The absence of dye in the final protein containing solution was checked by means of UV-vis spectroscopy.

The samples carrying the plasma polymer film and put in contact with the enzyme solution during 15h were observed with an inverted microscope (Nikon TE 2000U Eclipse) equipped with Biorad Radiance 2100 Rainbow AGR3Q/BLD laser scanning confocal head. Complementary, to check the presence of the enzymes in the coating, depth profiling has been performed by Time-Of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOFSIMS.5, IonTOF, Muenster, Germany). In this so-called non-interlaced dual-beam approach, a sputter gun (C₆₀⁺ or Cs⁺) is used to erode the sample, and, then, a second gun (bismuth liquid metal ion gun) is used for analytical purpose. Molecular depth profiling has been tested using C₆₀⁺ as a sputter

gun, in order to monitor amino acids related to the sequence of the enzyme, but sputtering through highly crosslinked plasma polymers leads to molecular damages accumulated at the bottom of the crater. Consequently, it has been preferred to perform an elemental depth profiling by monitoring magnesium, which is contained in AP as a cofactor and which is a specific element of the enzyme not provided by any other component of the film. In this case, the sputtering step was done by a 10 kV Cs⁺ bombardment over an area of 150 x 150 μm². The center of the crater was analyzed by a beam of Bi³⁺ cluster over an area of 50 x 50 μm². To study the activity of the enzyme present in the deposited plasma polymer coating, polystyrene (PS) slides coated with the different films were put in a rectangular 1 cm large PS cuvettes and at time t=0, the PNP solution at 3 mM was added to follow the absorbance increase at 405 nm, due to the appearance of paranitrophenol resulting from the hydrolysis of the substrate, PNP. The reference cuvette contained the same PS slide with the same coatings, in the absence of embedded enzymes. Such a reference substrate was chosen in order to compensate for the slow spontaneous hydrolysis of PNP or any influence of the deposited coating. A measurement was performed every 15 s for a duration of 4665s. For all the coatings, three successive kinetics were done. Two successive experiments were separated with a 5 min immersion step in Tris buffer solution and 1 min immersion step in pure distilled water solution to remove the non-hydrolyzed PNP and the produced paranitrophenol. To check the presence of enzymes in the PNP solution after the enzymatic assays, we let this solution at rest for 2 days and measured its absorbance against a PNP solution which was not in contact with the films. In the case of desorption of the enzyme from the film, one expects the absorbance at 405 nm to continue to increase even if the PS substrate has been removed from the solution.

3. Results and discussion

3.1. Copolymer preparation

The deposition rate of plasma polymer MAA (ppMAA) has been previously described [148]. The deposition rate has been compared to those of plasma polymer films made from a 20/80 EGDMA/MAA co-monomer mixture (solid line) and from EGDMA alone (upper dashed line). All these coatings were deposited under the same energetic conditions (Figure 26). In all cases, the films thickness grows linearly with the time, as found in previous publications [110, 148].

The total deposition time is proportional to the number of passes of the upper electrode above the substrate. The higher deposition rate observed for films made from EGDMA could be attributed to a higher reactivity than for MAA in possible relation to the presence of two vinyl groups instead of only one for MAA.

Nevertheless, by mixing both precursors, the deposition rate of the co-monomer mixture is located in the range between the deposition rates of ppMAA and ppEGDMA.

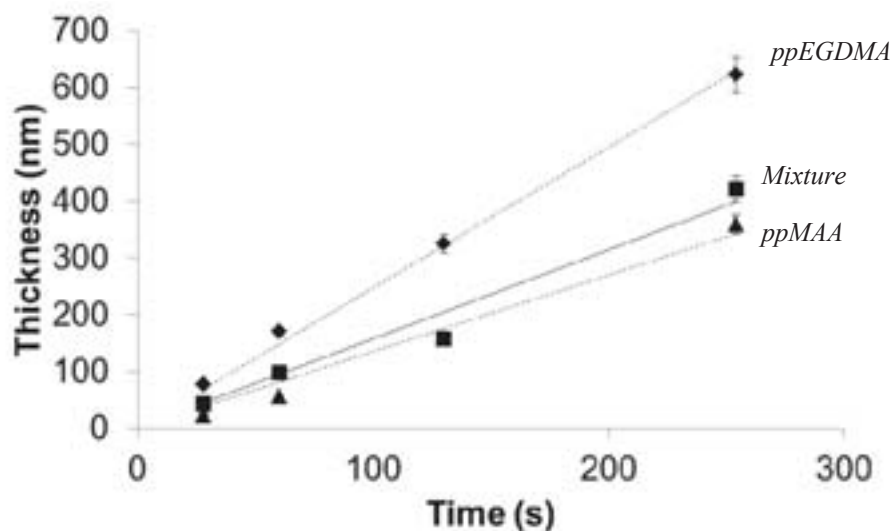


Figure 26. Thickness (measured by AFM) as a function of number of passes for plasma polymer films made from MAA, EGDMA and mixture of them (20/80 EGDMA/MAA % molar ratio) deposited under same energetic conditions. The lines correspond to a linear regression to the experimental data.

Previous studies showed the possibility to elaborate coatings under atmospheric pressure by polymerization of acrylate precursors principally through the double bond. To confirm the assumption of a polymerization occurring mainly through the double bonds of the monomers, Figure 27 shows the FTIR spectra of the plasma coating made from the co-monomer mixture and from EGDMA alone. The plasma polymers made from a co-monomer mixture mainly show the same spectral signature than ppEGDMA. The different peaks of EGDMA are visible, especially at 1727 cm^{-1} which is characteristic of the ester group, the CH_3 bending mode of methyl group at 1450 cm^{-1} and ether groups from 1050 to 1320 cm^{-1} (C-O-C stretch). These vibrations confirm that the main functional groups have been preserved during the plasma polymerization process. Nevertheless, a broader band around 3500 cm^{-1} , can be

attributed to the OH from methacrylic acid as well as to the hydroxyl group formed during the polymerization process due to the presence of oxygen in the plasma.

The proportion of MAA into the deposited film is determined with the basic approximation that only COOHs are associated to the MAA molecules without taking into account the fragmented or esterified methacrylic acid. An examination of the ester band in the range of 1800 and 1600 cm^{-1} has to be performed (inset of Figure 27) to distinguish the contribution of the ester from that of the carboxylic groups [116].

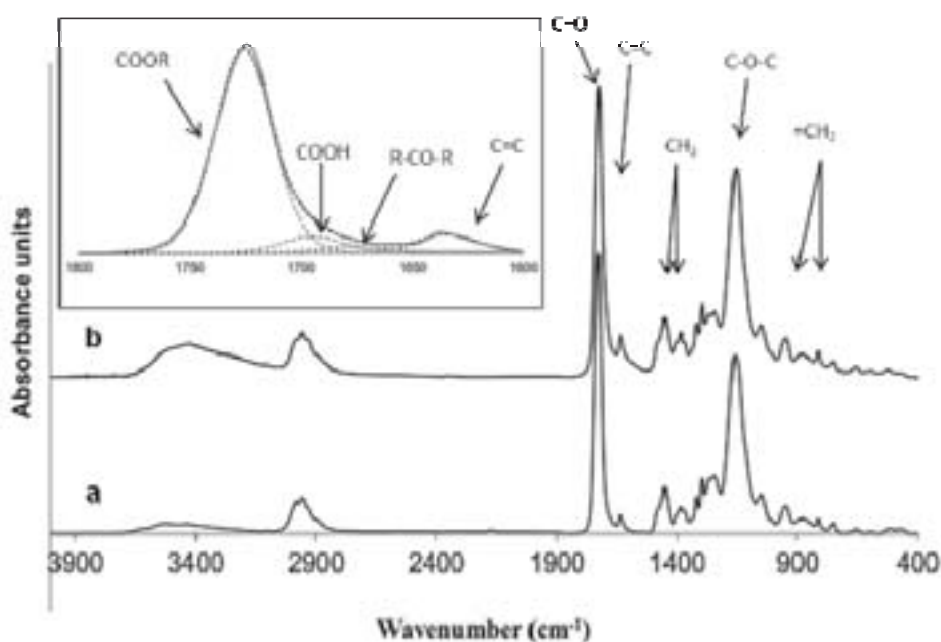


Figure 27. FTIR spectra in transmission mode on plasma polymer films based on (a) EGDMA and (b) comonomer mixture, with the same energetic conditions. The spectra are up-shifted for clarity. The inset corresponds to a zoom of the wavenumber region associated to the carbonyl stretching vibration.

The analysis of the carbonyl band present in the infrared spectra led to a deconvolution in 4 Gaussian curves, which can be attributed to COOR, COOH, RCOR and C=C bonds, respectively. The proportion of carboxylic groups is then obtained by dividing the area of the COOH band by the area of COOR and RCOR. The results obtained show a proportion of approximately 10% carboxylic group, which indicates a preferential incorporation of EGDMA into the deposited film, because the co-monomer mixture used to produce this film contained as much as 80% of MAA monomers. This preferential incorporation of EGDMA over MAA in the plasma polymer film, also observed for other molar fractions of MAA (data not shown) can be linked to the presence of 2 vinyl groups in EGDMA. However, an

alternative explanation to an apparent increase in intensity of the ester bands in the film can be proposed on the basis of the results obtained in one of our previous articles [148]. We demonstrated, in the case of ppAA (plasma polymer film made from acrylic acid) and ppMAA, that increasing the energetic conditions of the plasma led to higher ester content. By analogy with these results, a reduced proportion of carboxylic groups with respect to the proportion of MAA in the gas phase (80%) could be also attributed to an esterification of the carboxylic group from MAA. To confirm the validity of either a preferential incorporation of EGDMA over MAA in the plasma coating or an esterification of MAA, the obtained coatings were directly scrapped from the dielectric and analyzed using ^{13}C CP-MAS NMR. Figure 28 shows the spectra of the deposited film obtained from EGDMA and from the co-monomer mixture.

First, as observed with FTIR, the spectra of the films made from the co-monomer mixture show strong similitude with the spectra of the films made from EGDMA alone. This suggests again a higher content in EGDMA compared to MAA in the film, even if the co-monomer mixture contained 80% of MAA monomers. The presence of two peaks located between 100 and 130 ppm associated with the carbon from the vinyl group indicating that a part of the C=C did not react during the process, in agreement with FTIR results (band at around 1630 cm^{-1} in Figure 27). In the case of ppEGDMA, the fraction of unreacted double bonds can be determined by comparing the area of the peak located at 167 ppm due to the C=O adjacent to C=C, compared with the total area due to C=O (167 and 175 ppm). In these conditions 7.2% of unreacted double bonds has been determined which indicates that some of EGDMA molecules are able to react with both vinyl group leading to the formation of a highly crosslinked network. An examination of the carbonyl bands at 167 and 175 ppm has been performed (Figure 28) to discriminate the proportion of carboxylic groups from that of ester groups. The analysis of the bands are based on a deconvolution into three Gaussian curves corresponding to COOH, COOR_p (from the reacted molecules) and COOR_m (from the unreacted molecules). The obtained results indicate that approximately 25% of the carbonyl groups are -COOH groups, pointing again to a smaller than expected proportion of carboxylic groups.

The differences observed between NMR (25% of the carbonyl are carboxylic groups) and FTIR (10% of the carbonyl groups are carboxylic groups) can be attributed to the different methods used for samples analysis (scrapped from glass and then analyzed in the case of NMR and direct deposition on KBr pellet in the case of FTIR) as well as to the higher sensitivity of NMR analysis. Nevertheless, the results obtained tend to indicate that the film

formation is principally dominated by the incorporation of EGDMA with respect to MAA. Indeed the measured proportion of carboxylic groups in the coating is significantly lower than the proportion of MAA in the co-monomer mixture, namely 80%. The same trend was found for plasma polymer coatings made from mixtures containing 40 and 60% of MAA (data not shown).

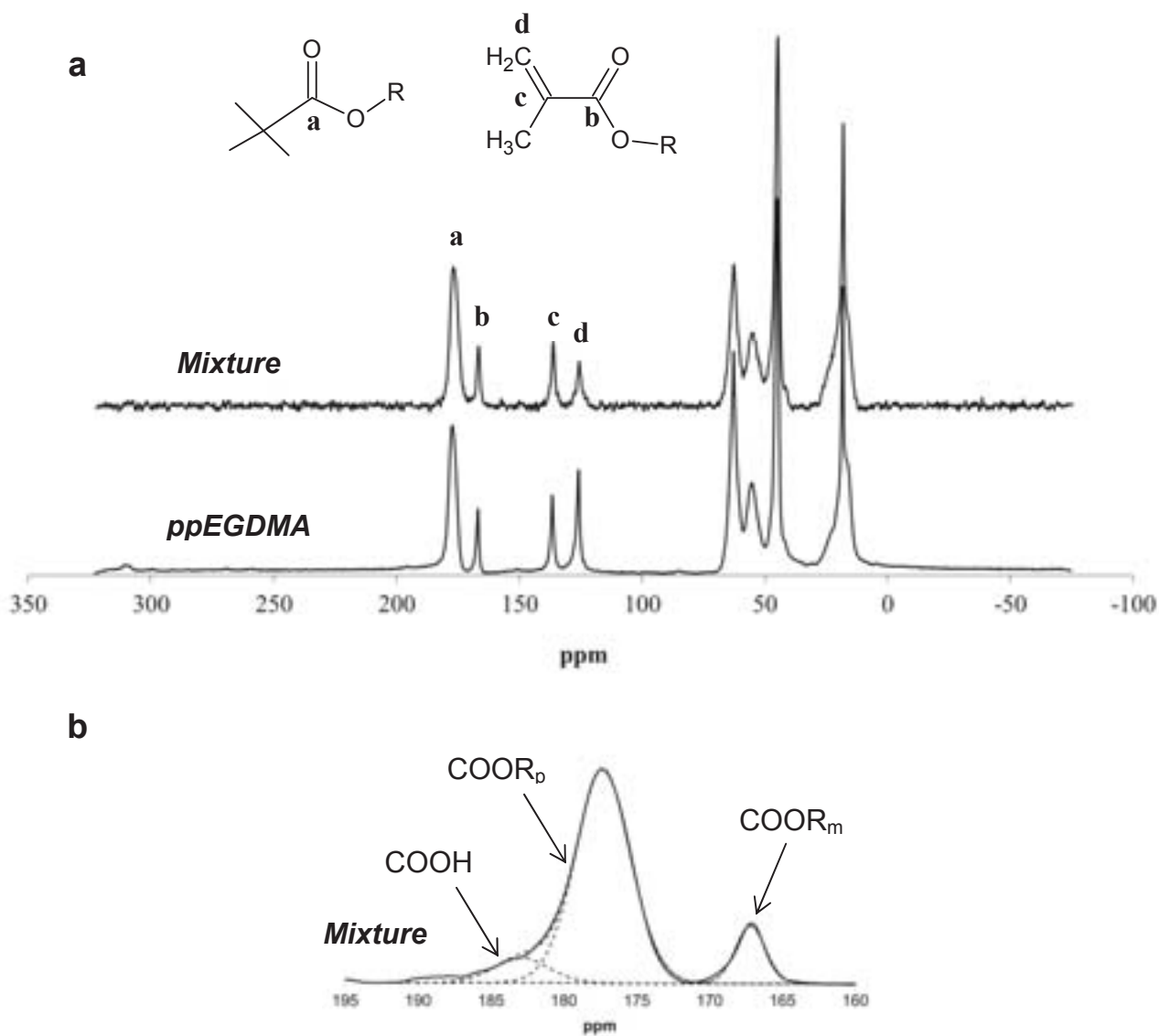


Figure 28. (a) ^{13}C CP-MAS NMR spectra of plasma polymer made from EGDMA and comonomer mixture under the same energetic conditions. The spectra are up-shifted for clarity (b) Enlarged view of the wavenumber region associated to the carbonyl band. The dashed line is a deconvolution into two Gaussian curves the dashed-dotted lines are the individual contributions.

The total content of accessible -COOH groups can also be determined on a quantitative basis using the ion pairing between -COO⁻ groups and the cationic dye toluidine blue. To that aim, we used the analytic method developed by Sano et al. [119] which can be applied in this case because of the high water resistance of the coating. At pH > 8, the carboxylic groups of the coating are almost quantitatively deprotonated leading to electrostatic interactions with toluidine blue. When pH < 4, the carboxyl are protonated leading to a quantitative release of the toluidine blue into the solution. It is the amount of dye released in solution which is quantified using UV spectroscopy. For these reasons, the dye loading was performed at pH 10 and its release from the plasma polymer coating was performed in the presence of water at pH 3. Preliminary experiments have been done to determine the optimal reaction times between the different carboxylate groups and toluidine blue in/on the film (data not shown). Additional experiments have also been done to compare the density of functional groups determined with this method as a function of the thickness of the coating to demonstrate or not the possibility of the dye to diffuse into the whole coating. 1 hour of interaction between the film and the dye containing solution appears to be sufficient to reach a saturation in dye binding for a film thickness lower than 200 nm (data not shown).

The -COOH density determination on the plasma polymer made from a 20/80 EGDMA/MAA co-monomer mixture was performed before and after washing with deionized water for 12h.

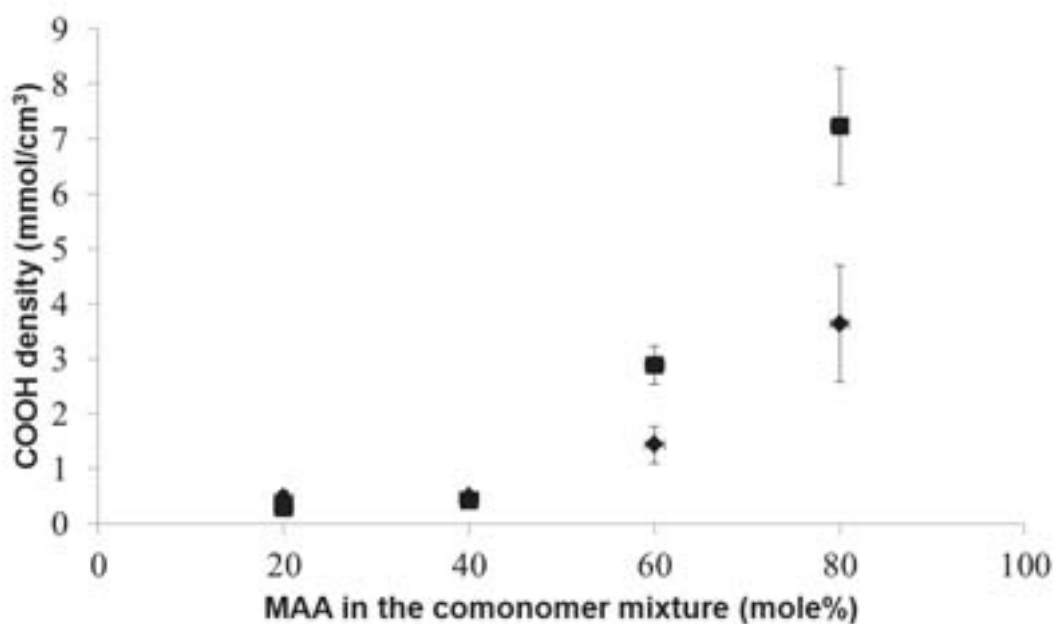


Figure 29. Determination of the density of -COOH groups as a function of the molar fraction of MAA introduced in the co-monomer mixture used for the deposition of plasma polymer films prepared under same energetic conditions before (◆) and after (■) washing with deionized water. The error bars correspond to one standard deviation over 3 independent measurements.

Figure 29 gives the -COOH density in the film as a function of molar fraction of MAA in the co-monomer mixture used to produce the coatings. The values are given for films that were never exposed to water before the determination of the -COOH density and for films that were incubated in deionized water at pH ~ 6 for 24h before the determination of the -COOH density. As expected, the density of carboxylic groups increases with the amount of MAA in the co-monomer mixture used to produce the coating. Besides, the increase of the density of functional groups after equilibration in water for 24 h with respect to non equilibrated films can be attributed to a rearrangement of the functional groups while the film is swelling in water. This behavior shows that the plasma polymer coatings produced from MAA and EGDMA display a slow stimuli responsive behavior, and that some functional carboxylic groups are hidden in the volume of the film when it is not pre-equilibrated in water. This swelling increases the number of available carboxylic groups probed by the dye in the bulk of the film. The differences observed before and after prolonged equilibration in water is more pronounced when the fraction of MAA increases in the co-monomer mixture. This is

expected because the film swelling is expected to be higher in a basic or slightly acidic solution when the fraction of deprotonated carboxylic groups is higher leading to stronger electrostatic repulsions between the functional groups of the film.

The loading capacities for the dye obtained for plasma copolymer based on 80/20% molar ratio MAA and EGDMA mixture are of $3.6 \pm 0.8 \text{ mmol.cm}^{-3}$ (before washing) and $7.2 \pm 0.7 \text{ mmol.cm}^{-3}$ (after 24 h of equilibration in water).

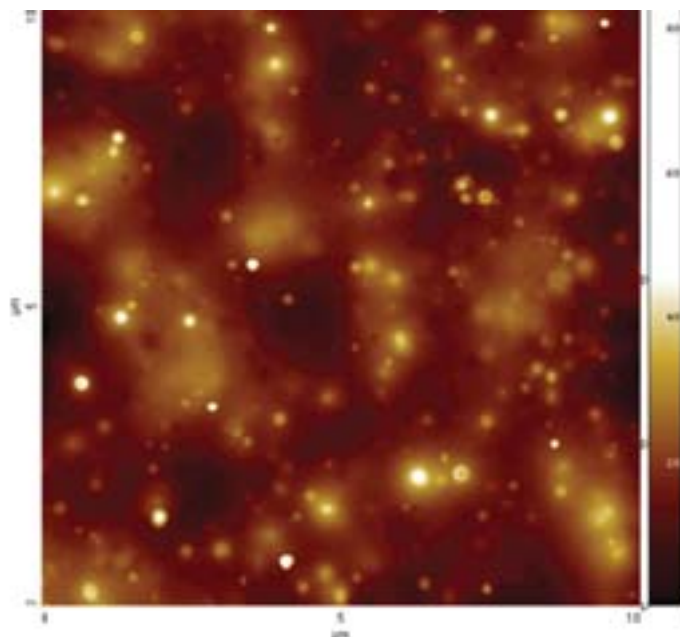


Figure 30. Typical AFM topography images ($10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$) obtained from coatings made of comonomer mixture.

Figure 30 shows typical AFM topographies of the coating based on the co-monomer mixtures after a total deposition time of 130s. The rms roughness of the coatings is equal to 5 nm. This shows that the obtained coatings are smooth and homogeneous.

3.2. Enzyme immobilization

On the basis of the results obtained for the loading of Toluidine Blue in the plasma polymer coatings, we equilibrated the films in water for 12 h. before putting them in contact with an AP containing solution at 0.5 mg.mL^{-1} . After loading of the film with enzyme, rapid rinse with water and drying, XPS analysis was performed to control the presence of nitrogen atoms linked to the adsorption of the enzymes on the surface. Figure 31 shows two XPS survey spectra corresponding to the extreme surface of (a) a plasma polymer film after immersion in

buffered solution and **(b)** a plasma polymer film after 15 h of immersion in a buffered solution containing AP at 0.5 mg mL^{-1} .

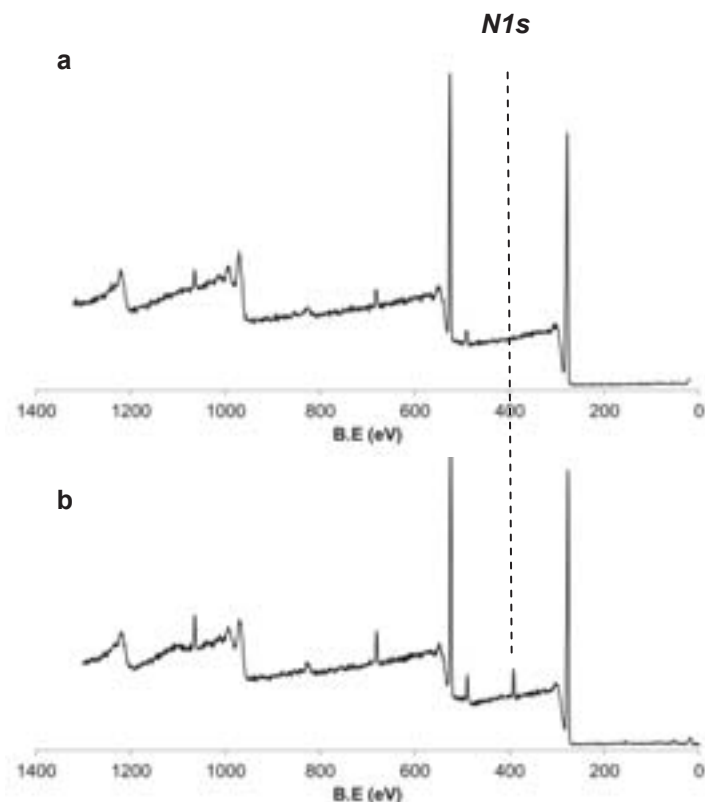


Figure 31. XPS spectra highlighting the N1s core level for plasma polymer film made of the comonomer mixture after immersion in **a.** PBS solution and **b.** PBS solution + enzyme.

The spectrum **b** shows the presence of nitrogen atoms which are not present in the case of spectrum **a**. This implies that a part of enzymes are adsorbed at the surface of the plasma polymer film. However, XPS is a technique sensitive only to the extreme surface of coatings. Hence, other techniques probing the depth of the films are required to assess the presence of alkaline phosphatase in the deeper part of the film.

To that aim, we used TOF-SIMS in the dynamic mode to profile an element specific to the enzyme. In the case of alkaline phosphatase, magnesium ions are a cofactor specific of the enzyme and not present in the plasma coating. Hence, it is possible to follow Mg^{2+} from the top to the bottom of the coating to determine the distribution of AP within the film. The distribution profile of this marker shows that the highest enzyme concentration is found at the surface of the coating. This may be due to a higher concentration of carboxylic groups at the film solution interface than in the bulk of the film as observed in a previous paper [148].

Indeed, it can be expected that the enzyme is interacting with the carboxylic groups present in the plasma polymer coating, even if the enzyme carries a slight excess of negative charges at the pH of the solution (8.5) at which it was loaded in the film. AP from bovine intestinal mucosa is characterized by an isoelectric point lying around 7. The binding mechanism of AP to the plasma coatings containing $-\text{COOH}/-\text{COO}^-$ moieties is not of pure electrostatic nature because we found that a protein with a high isoelectric point, as lysozyme (isoelectric point of 11.1) is also able to diffuse in the same plasma polymer coatings. Based on pure electrostatic interactions, we would have expected a strong incorporation of the cationic lysozyme and a hardly measurable amount of the anionic AP. This is however not the case and the binding mechanism of AP to the plasma polymer coatings made from a mixture of MAA and EGDMA deserved further fundamental investigations. At this level, we cannot exclude that the enzyme is just incorporated in the porous volume of the film. This would mean that the plasma polymer coating is characterized by an interconnected network of pores having a size of at least a few nanometers, ie close to the hydrodynamic radius of AP.

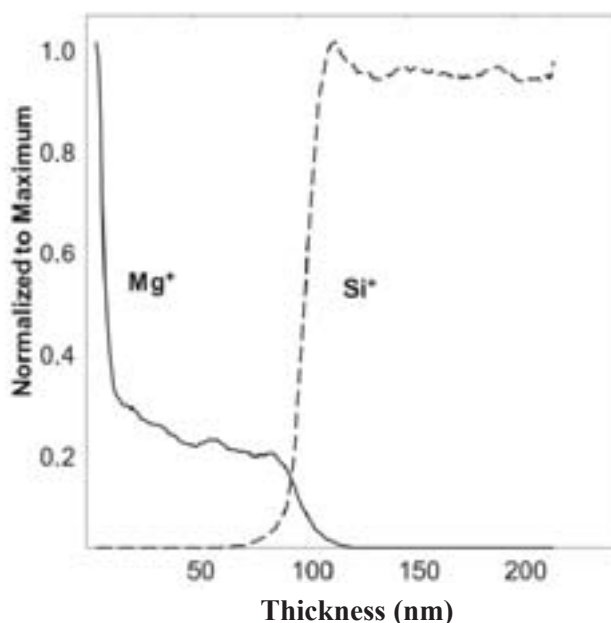


Figure 32. TOF-SIMS analysis showing the magnesium signal as a function of the profiling time (which is proportional to the depth of the profiling) of the coating made from a 20/80 EGDMA/MAA co-monomer mixture. "Si" indicates the species originating from the glass substrate.

The thickness of the coating used for TOF-SIMS profiling is determined to be 400 nm thick from an independent AFM measurement. The profile of the signal due to Mg^+ shows that the enzyme is able to diffuse in the whole thickness of the coating even if it accumulates in a more pronounced manner at the film-solution interface.

In addition to the TOF-SIMS experiments, imaging of the film with Laser Confocal Scanning Microscopy was used with AP labeled with Rhodamine B isothiocyanate to display the distribution of the labeled enzymes into the copolymer film. For this analysis, coatings of the same composition as those used for the TOF-SIMS analysis but of about $4\mu m$ thick, were deposited on glass and PS substrates before immersion in a solution of labeled AP.

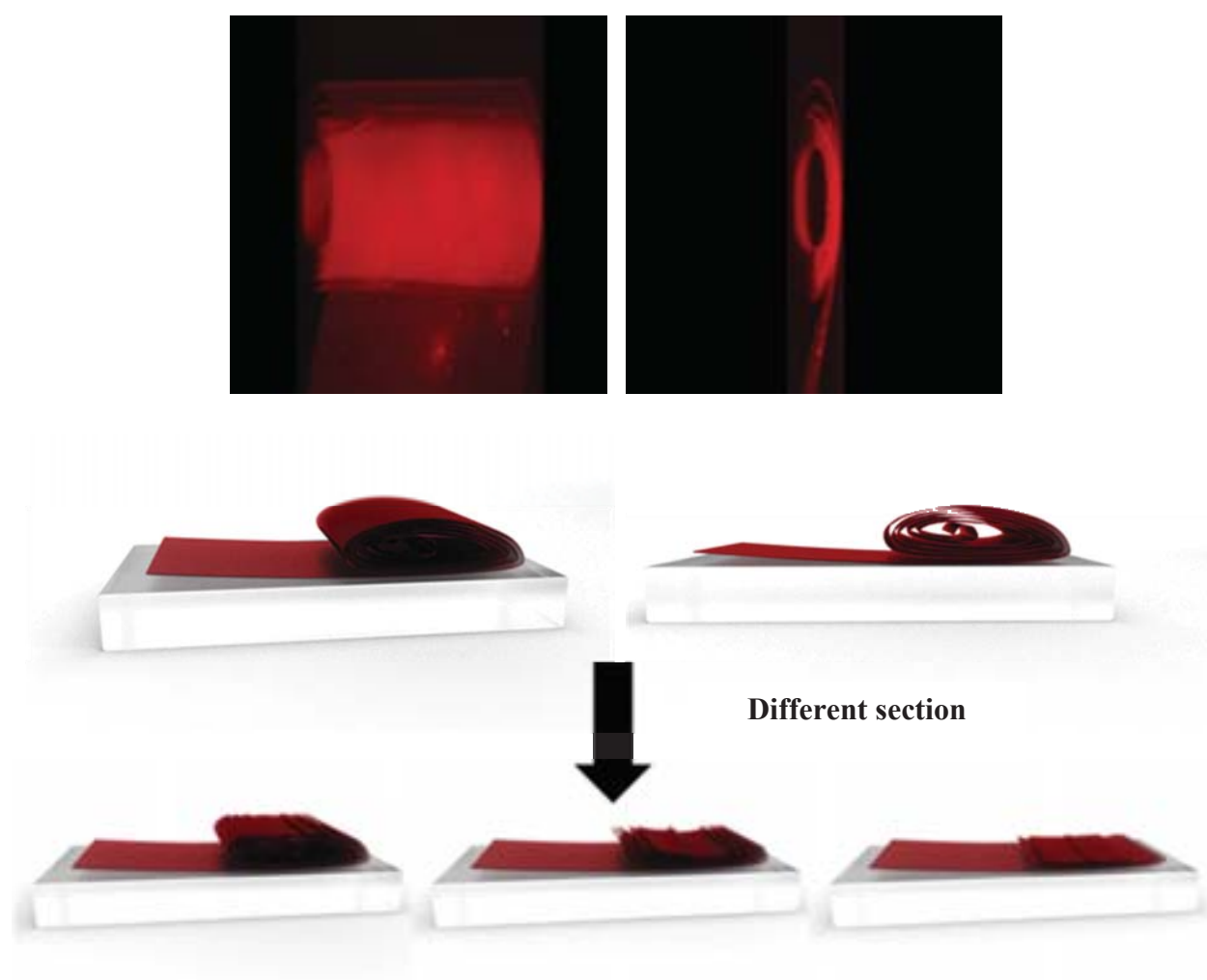


Figure 33. Laser Scanning Confocal Microscopy images of plasma polymer films based on a 20/80 EGDMA/MAA co-monomer mixture after immersion in a buffered solution with alkaline phosphatase at 0.5 mg.mL^{-1} for 15 h. Self-standing film rolling over itself ($1000\ \mu m$ X $1000\ \mu m$).

Figure 33 shows the plasma polymer film after immersion during 15 h in a solution of AP at 0.5 mg.mL^{-1} . The fluorescence emission observed is characteristic of the Rhodamine B isothiocyanate dye which is more appropriate than FITC for this type of analysis because it is not too sensitive to photobleaching effects. The swelling behavior, allows the diffusion of the enzymes in the film. As described by Zhang et al [150], delamination of the plasma polymer film between the substrate and the plasma deposited film can be observed when the film deposited on glass is put in an aqueous solution. This phenomenon can be avoided by using an activation step with oxygen and argon in the case of a PS substrate. Nevertheless, the production of self standing membranes from glass substrates allows us to obtain free standing films able to entrap enzymes by diffusion. The possibility to obtain a free standing, flexible and enzyme loaded coating offers many advantages for the design of versatile sensors as explained in the introduction. When the films are deposited on activated PS, they remain attached to it on most of the surface but the appearance of many protuberances corresponding to local detachment of the coating are observed.

The distribution of the enzymes across the film was studied for a film thickness of approximately $4 \text{ }\mu\text{m}$ in the dry state (as measured by AFM). In this case, the fluorescence was homogeneously distributed, indicating that the plasma film was homogeneously impregnated with AP, at the resolution of laser scanning confocal microscopy, namely about 500 nm . Moreover, the fluorescence remains the same even after detachment, indicating that the mechanical stress does not interfere on the system: the enzyme stays entrapped in the free standing film. Further analyses have been performed using pretreatment of the glass and silicon substrate with silane to avoid the delamination of the plasma coatings.

Figure 5 of the supporting information gives the thickness of the free standing film as well as the dimension of the fluorescent spots corresponding to the cavity obtained due to delamination. Confocal analyses tend to prove that the enzymes are able to diffuse through the whole thickness of the coating, for coatings much larger than those used for the TOF-SIMS investigation (Figure 32). Owing to the small resolution of confocal microscopy, we can however not exclude some preferential incorporation of alkaline phosphatase at the film solution interface as was found by means of TOF-SIMS (Figure 32).

3.3 Enzymatic activity

To check whether the embedded alkaline phosphatase preserves its enzymatic activity, the plasma films loaded with enzyme have been put in contact with a solution of PNP. PNP is a

widely used substrate for detecting alkaline phosphatase. When alkaline phosphatase and PNP are in contact, a yellow water-soluble reaction product, paranitrophenol, is formed. The resulting product absorbs at 405 nm in a much intense manner than PNP does. Figure 34 shows the reaction kinetics between PNP and the alkaline phosphatase present in the plasma polymer film obtained from a 20/80 EGDMA/MAA co-monomer mixture for three successive measurements. These experiments show clearly that the enzymatic activity of the entrapped AP is well preserved. This is a strong indication that the native conformation, for at least part of the entrapped enzyme, is maintained in the plasma film. Unfortunately we were not able to determine the fraction of enzyme remaining active during the entrapment in the plasma polymer coating.

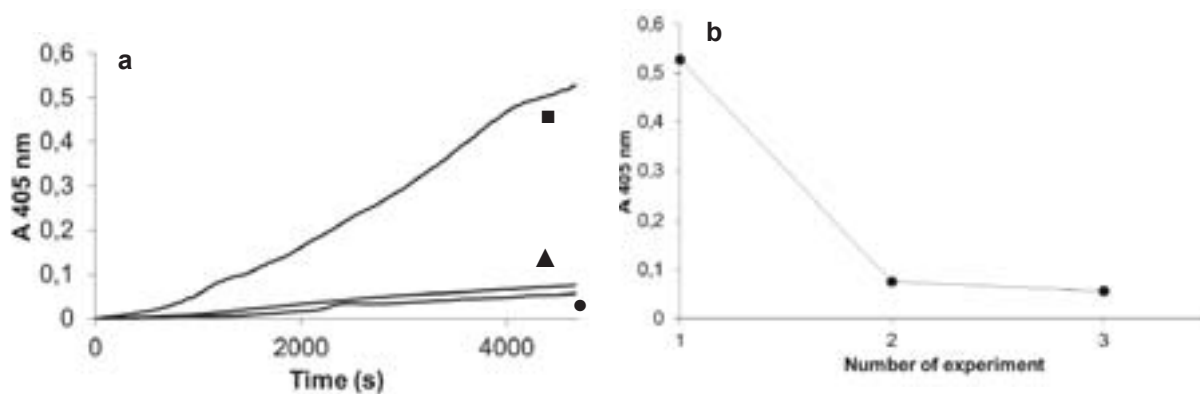


Figure 34. a. Evolution of the absorbance at $\lambda=405$ nm of plasma polymer films based on a 20/80 EGDMA/MAA co-monomer mixture loaded with the enzyme (AP) during 15 h and put in a 3 mM PNP, for the first (■), the second (▲) and the third measurement (●). After each experiment the film was immersed in Tris-NaCl buffer and deionized water to wash away the non hydrolyzed PNP and its hydrolysis product. **b.** Evolution of the maximal absorbance reached after 4665 s for the 3 successive experiments.

For the first measurement, the coating led to high enzymatic activity indicating that at least part of the entrapped enzyme keeps its native conformation and that the diffusion of the enzymatic substrate is allowed through the plasma polymer coating. It has been observed that the films tend to swell when put in solution and this swelling might be influenced by the density of crosslinking obtained during the plasma deposition. The swelling of the EGDMA/MAA films is however pretty limited by a factor of about 1.3-1.5 with respect to films not put in contact with enzymes, as inferred from AFM measurements (data not shown).

Consequently, one can imagine controlling the capacity of the film to entrap the enzyme by changing the co-monomer mixture or plasma parameters.

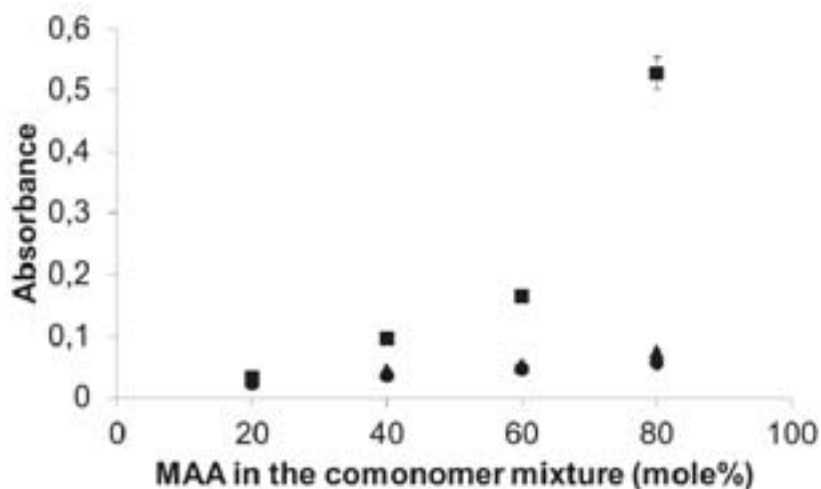


Figure 35. Evolution of the absorbance at 405 nm of plasma polymer film produced from different EGDMA/MAA co-monomer mixtures loaded with the enzyme (AP) during 15 h and put in a 3 mM PNP, for the first (■), the second (▲) and the third measurement (●). After each experiment the film was immersed in Tris-NaCl buffer and deionized water to wash away PNP and its hydrolysis product.

The activity of AP is increasing with an increasing content of MAA in the co-monomer mixture (Figure 35). Indeed, when coatings with highly accessible carboxylic groups are used, as determined by the Toluidine Blue binding experiments (Figure 29), the highest enzymatic activity is measured during the first assay. This implies that the proportion of MAA introduced in the co-monomer mixture plays an important role for enzyme immobilization probably associated with either a higher hydrogen bonding ability or a higher porosity.

Besides, one can observe a diminution of the PNP hydrolysis rate between the first and the second measurements (Figure 34 and 35). This decrease is more pronounced when higher amounts of MAA in the co-monomer mixture are used. This diminution in enzymatic activity was most probably not due to an enzymatic denaturation but rather to a desorption of the enzymes during film swelling when immersed in a solution of PNP. The occurrence of enzyme desorption from the coatings has been demonstrated by measuring the evolution of the enzymatic activity of a buffer solution in which the plasma film containing the enzymes was immersed for a first enzymatic assay. This solution was then aged for 3 days in the

absence of the plasma polymer coating. These experiments showed that the absorbance increases with ageing time confirming the occurrence of enzyme desorption from the films, since the absorbance of a reference PNP solution not put in contact with the films increased in a negligible manner. This desorption allows to explain the important difference in slopes between the first and the second kinetics (Figure 34 and 35). Hence, one can expect that such a release can be due to the fact that the plasma film swelling tends to weaken the interactions between the enzyme and the plasma polymer matrix. In order to circumvent this situation it is planned to cover our system by an additional layer able to act as a barrier avoiding the release of the enzyme. In a previous work, we have shown that a plasma film made of highly crosslinked EGDMA is able to play the role of a barrier and hence able to retain active enzymes in exponentially growing polyelectrolyte multilayer films [151].

4. Conclusion

The present work was aimed to show the possibility to design free standing plasma polymer films able to entrap a model enzyme (AP) through specific interactions to make flexible biosensors. To reach this goal, plasma film of MAA/EGDMA (80/20% molar ratio as well as from other compositions) has been designed using APDBD.

A combination of surface and volume sensitive techniques such as Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Magic Angle Spinning Cross Polarization ¹³C Nuclear Magnetic Resonance (MAS NMR) and UV-Visible spectroscopy has been used to characterize such coatings. The density of carboxylic group has been determined using the cationic dye binding method developed by Sano et al. [119] allowing the quantification of carboxylic groups in the entire deposited film. The characterization by FTIR and NMR spectroscopy shows that the proportion of carboxylic groups in the film is lower than expected on the basis of the composition of the co-monomer mixture.

Alkaline phosphatase can diffuse freely in such coatings and its distribution across the film thickness is rather homogeneous as inferred from TOF-SIMS and laser scanning confocal microscopy measurements, even if there is a small accumulation at the film solution interface. The entrapped enzyme is active in the plasma polymer coating but an important desorption occurs during and after the first assay, suggesting that the enzyme is entrapped mostly in the porous volume of the film. The amount of active enzyme can be modulated by changing the composition of the co-monomer mixture used to produce the coatings. In future investigations, we aim to investigate the pore size distribution in such coatings in a more

quantitative way by investigating the diffusion of solutes characterized by increasing hydrodynamic radii and by using NMR cryoporosimetry methods.

To our knowledge, this work is the first showing the possibility to design flexible free-standing biosensors by means of atmospheric pressure plasma polymerization methods.

Cette étude qui complète la précédente montre l'intérêt de l'ajout d'un agent réticulant à la solution d'acide méthacrylique avant d'être introduit dans le plasma. Le film obtenu a présenté une bonne stabilité au contact d'une solution aqueuse, autorisant ainsi son utilisation dans le cadre de nos applications. La structure chimique a montré une grande similitude avec les films obtenus à partir d'EGDMA seul tendant à dire qu'il existe une incorporation préférentielle de l'EGDMA pouvant être liée à sa plus grande réactivité. Les films obtenus à partir d'une solution contenant 80% molaire d'acide méthacrylique conservaient entre 10 et 25% en proportion de groupements carboxyliques dans le film. Ces derniers ont alors été quantifiés par la méthode de Shushi et al. Des valeurs comprises entre 3,6 et 7,2 mmol.cm⁻³ ont été obtenues et permettent de montrer la sensibilité de ce type de film face au pH. En effet, la fixation du colorant avec les groupements fonctionnels du film n'est effective que lorsque la solution est à pH suffisamment acide (< 4) pour déprotoner les groupements carboxyliques présents dans le film.

L'autre partie de cette étude a montré la possibilité d'utiliser ce type de film pour l'absorption d'enzymes. Les enzymes, de par leurs propriétés catalytiques, sont souvent utilisées comme biorécepteur pour des dispositifs capteur (voir chapitre 1). Une fois en contact avec le film, les enzymes présents dans la solution sont capables de diffuser à travers la membrane tout en conservant leurs conformations développant ainsi un système avec de nouvelles propriétés susceptibles d'être utilisés dans le cadre d'applications du type capteur.

Néanmoins, certaines limitations ont pu être observées, concernant principalement la désorption d'enzymes lors des tests enzymatiques. Afin de diminuer au maximum ce type de phénomène, nous nous sommes proposés dans la partie suivante, d'utiliser des barrières réalisées par 2 méthodes différentes que sont la polymérisation plasma et le couche par couche.

3. Films polymères plasma : une alternative aux films (PSS-PAH)_n ou (PSS-PDADMAC)_n pour retenir l'activité enzymatique dans des polyélectrolytes assemblée en multicouches.

Discussion et commentaires

Cette partie a porté sur l'étude de couches barrières déposées sur des matrices obtenues par la méthode du 'couche par couche' dans le but de comparer leurs performances en fonction du choix du composé chimique et de la méthode de déposition. En effet, comme on a pu le voir dans la partie précédente, afin de limiter la désorption des enzymes, une barrière doit être déposée à la surface de la couche active. Néanmoins, la barrière idéale se doit d'être suffisamment poreuse pour laisser passer le substrat enzymatique tout en évitant la diffusion des enzymes. Les couches préparées pour l'absorption d'enzymes ont été réalisées à partir de multicouches d'acide hyaluronique (HA) et de Poly-L-Lysine (PLL). Les différentes barrières ont été réalisées à partir de multicouches de 'poly (chlorure d'allylamine) et de poly (styrène sulfonate) (PSS)' ainsi que de multicouches de 'poly (Chlorure de Diallyldimethyl Ammonium) et poly (styrène sulfonate) (PDADMAC)'. L'inconvénient de la méthode du 'couche par couche' pour notre étude réside dans le fait qu'il faille mettre en contact l'échantillon avec une solution contenant les différents éléments à adsorber pour obtenir la barrière. En effet, durant cette étape, il est alors possible à l'enzyme de se désorber ce qui peut entraîner une diminution du pouvoir catalytique de l'échantillon. Il est alors ici intéressant, d'utiliser la polymérisation par plasma qui permet d'éviter la mise en contact de l'échantillon avec une solution aqueuse. Des résultats annexes (non présents dans le manuscrit) de l'étude précédente ont montré que lorsque l'on utilise le ppEGDMA comme support pour l'enzyme, une très faible vitesse d'hydrolyse du PNP est observée ce qui tend à montrer qu'il est difficile d'absorber des enzymes avec ce type de structure. De par cette observation, nous nous sommes proposés d'étudier le ppEGDMA comme barrière à la désorption de la PA.

Plasma polymer films as an alternative to (PSS-PAH)_n or (PSS-PDADMAC)_n films to retain active enzymes in exponentially growing polyelectrolyte multilayers.

Cédric Amorosi^a, Marc Michel^a, Luc Averous^b, Valérie Toniazzo^a, David Ruch^a, Vincent Ball^{a,}, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012. 97: p. 124-131*

a: Advanced Materials and Structures, Centre de Recherche Public Henri Tudor, 66 rue de Luxembourg, L-4002, Esch-sur-Alzette, Luxembourg.

b: LIPHT-ECPM, Laboratoire d'Ingénierie des Polymères pour les Hautes Technologies, EA(CNRS) 4379, Université de Strasbourg, 25 rue Becquerel 67087 Strasbourg Cedex 2 France

1. Introduction

The functionalization of thin films with nanoparticles or enzymes is a key step in the design of the architecture of sensors for bioelectronic applications [93]. Many deposition methods of enzymes and nanoparticles are known. Among them, adsorption of enzymes or nanoparticles is the simplest one. Physical adsorption of enzymes is however often accompanied by their partial or even total denaturation particularly on hydrophobic substrates. Similarly, the adsorption of nanoparticles in single layers is often not sufficient to reach enough functional catalytic sites. Covalent coupling of enzymes to a substrate allows to avoid a direct contact with the substrate but is only efficient if the active site of the enzymes remains accessible to their substrate. For that reason a single coupling site between the enzyme and the substrate is desirable [96]. Direct incorporation of membrane proteins in lipid bilayers that can be spread at solid-liquid interfaces, for instance through the adhesion and spreading of liposomes [103, 104], is also a functionalization method. However, this last approach suffers from an intrinsic instability of lipid bilayers particularly if surfactant molecules are present in the solution containing the molecules to be recognized and quantified. Taking into account these considerations, the surface immobilization of gels containing sensing elements is extremely promising owing to the fact that the gels can be grafted at the substrate surface. In addition, gels are often porous enough [21] for the diffusion of the molecules to be sensed close to the immobilized enzyme or nanoparticles. In addition, if the immobilized gels contain charged moieties, the gel can behave as an ion exchange membrane [152] allowing the exclusion of

solutes with undesired charge signs. For instance, this is interesting for the sensing of dopamine because this compound is present in biological liquids simultaneously with ascorbic acid which interferes with the positively charged dopamine during its electrochemical sensing. In addition, if the immobilized gel has a controlled porosity, the solutes permeating through the gel can be excluded according to their size. It is also possible to prepare molecularly imprinted gels or inorganic matrixes able to recognize the molecule that was initially fixed in the gel and subsequently released, imprinting its shape in the matrix provided the template is rigid enough [88]. Sol-gel matrixes can also host enzymes and even living cells in a mechanically robust environment [153]. Finally, as an additional matrix to immobilize enzymes or nanoparticles, polyelectrolyte multilayer films (PEM) offer an interesting alternative owing to the possibility to deposit the active molecules in alternation with oppositely charged polyelectrolytes [154, 155] or, even more elegantly, by diffusion of drugs [156], dyes [157], proteins [158] or nanoparticles [147, 159] directly in the matrix of PEM films. Enzymes present in PEM films provide nice tools for biosensing [160, 161] and the retained molecules can be released progressively through pH induced film decomposition [162], hydrolysis of one of the film's component [163] and also through a charge shifting mechanism [164] in which a polycation is turned in a polyanion inducing a progressive release of the other polyanion present in the film, namely DNA. Release of molecules embedded in PEM films is desired for drug release applications but is a major drawback for biosensing where a long stability of the whole device is required. The enzyme has hence not to leach out from the coating, to be in an environment stabilizing its conformation and to remain accessible to its enzymatic substrate. Proteins embedded in PEM films find an environment sufficiently hydrated and can improve their thermal stability [165] through multiple interactions with polyelectrolyte chains of the film due to the presence of charged amino acid side chains on their surface. The best possible environment for allowing access of the enzyme's active site to its substrate is that of exponentially growing PEM films, which are highly hydrated and porous and which can be loaded with enzymes by single diffusion from an enzyme containing solution after deposition of the PEM film. However, embedded enzymes and nanoparticles can also desorb from PEM films [147]. To avoid such drawback, the PEM films can be capped with a barrier. This barrier can by itself be a PEM film, preferentially made from a combination of polyelectrolytes leading to a linear growth regime and to films more compact than those obtained upon exponential growth. As previously shown by Mendez-Garza et al., a film made from the alternate deposition of poly(allylamine) (PAH) and poly(sodium-4-styrene sulfonate) (PSS) can totally suppress

polyelectrolyte chain diffusion between the two exponentially growing films made from poly(-L-lysine hydrobromide) (PLL) and sodium hyaluronate (HA) [166]. Polyelectrolyte barriers not only change the permeability of the whole film, made from an upper compact barrier and from an underlying soft film, but also their wettability [167] and their mechanical properties [168, 169]. In turn, the upper compact barrier totally modifies the behavior of cells coming in contact with the composite film [170].

Other materials than those made of compact PEM films have been described in the literature to form barriers on top of as deposited PEM films. These barriers can be obtained through melting of paraffin [171], totally suppressing the access of water to the underlying film, or from phospholipid bilayers made through the adhesion-fusion of lipid vesicles [172]. Such barriers cannot be used to simultaneously avoid the desorption of enzymes present in the PEM film and to allow for the enzymes substrate to diffuse in the underlying PEM film. A recent investigation showed that a plasma polymer film made from an allylamine monomer and deposited on the open surface of porous anodized aluminium oxide considerably slowed down the release of vancomycin from the internal lumen of the pore to the external aqueous solution [173]. The release kinetics of the drug was bimodal made from an initial burst followed by a slow release regime with a rate constant decreasing upon an increase in the plasma polymer film thickness.

The aim of this article is to demonstrate that polymer barriers made through atmospheric pressure plasma polymerization in a dielectric barrier discharge (APDBD) configuration can be used to avoid desorption of alkaline phosphatase (AP) from PEM films made of HA and PLL and to allow for diffusion of paranitrophenyl phosphate (PNP) to the embedded enzyme. AP was chosen as a model enzyme whose activity is easy to measure by spectrophotometry; in addition its behavior in PEM films is well known [174]. In this way the plasma polymer films, made from ethylene glycol dimethacrylate, offer an interesting alternative to polyelectrolyte barriers with the additional advantage that the deposition of plasma polymers is a one step process. We will show that for a small nominal thickness of the plasma polymer film (30 nm), the plasma barrier is not compact enough to suppress the leaching of AP out of the (PLL-HA)₁₅ film. For thicker barriers with a nominal thickness of 150 nm, an optimal compromise is found for enzymatic retention in the films and simultaneous permeation of PNP through the barrier. For even thicker barriers (300 nm), the enzymatic catalysis of PNP displays a lag phase suggesting that PNP diffusion from the solution to the enzyme through the barrier is the rate limiting step. We choose plasma polymer films made from EGDMA because they are highly crosslinked and stable in water and hydrophilic enough to interact

favorably with PNP. In addition plasma polymer films made in atmospheric conditions and in the DBD (Dielectric Barrier Discharge) configuration can be produced in a one-step manner without the use of expensive pumping systems, their thickness being proportional to the polymerization time.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

All the solutions were prepared from double distilled water (Millipore Simplicity, $\rho=18.2$ M Ω .cm). The polyelectrolytes used to build up the polyelectrolyte multilayer (PEM) films were hyaluronic acid (HA, viscosimetric molecular weight $MW_{vis} = 4.2 \times 10^5$ g.mol⁻¹, LifecoreBiomedical, Chaska, MN, USA) as the polyanion and poly-L-lysine (PLL, ref. P7890, lot 066K5101, MW=26500 g/mol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA) as the polycation, both used without further purification. They were dissolved at a concentration of 1 mg.mL⁻¹ before each experiment in an aqueous solution containing 0.15 M NaCl.

Alkaline phosphatase (AP) from bovine intestine mucosa was purchased from Sigma Aldrich (90% in purity) and used without further purification. Fresh AP solutions were prepared at 1 mg.mL⁻¹ in a 0.15 M NaCl solution before each new experiment. The sodium salt of paranitrophenyl phosphate hexahydrate (Sigma-Aldrich, 71768) was dissolved at 3 mM in a 10 mM Tris buffer + 0.15 M NaCl whose pH was adjusted to 7.5.

The other polyelectrolytes, namely poly(sodium-4-styrene sulfonate) (PSS, Sigma-Aldrich, ref. 243051, molecular weight of about 70 kDa), poly(allylamine hydrochloride) (PAH, Polysciences, Inc., ref. 18378, molecular weight between 120 and 200 kDa) and poly(diallyldimethyl ammonium chloride) (PDADMAC, Sigma-Aldrich, ref. 409014, in the form of 20 wt% and of "low molecular weight) were all dissolved at 1 mg.mL⁻¹ in a 0.15 M NaCl solution whose pH was not adjusted. Fresh solutions were prepared for each experiment.

The monomer used to produce plasma polymer barriers, was ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) from Sigma-Aldrich (ref. 335681, 98% in purity). The monomer solution was nebulised in the space between the two dielectrics for the production of plasma polymers, as will be described later on.

2.2. Polyelectrolyte multilayer films and incorporation of alkaline phosphatase

Most of the polyelectrolyte multilayer films were deposited on rectangular shaped quartz plates ($4 \times 1 \times 0.1 \text{ cm}^3$) from Thuet (Blodelsheim, France). Some experiments were performed on silicon slides cut in $4 \times 1 \text{ cm}$ rectangular pieces (Siltronix, Archamps, France) in order to measure the thickness of the polyelectrolyte multilayer films. The quartz and silicon substrates were cleaned with a piranha solution (H_2O_2 at 30% and H_2SO_4 in a 1:2 volume ratio) during 30 min and intensively rinsed with distilled water just before the deposition of the PEM film. The piranha solutions are freshly prepared before the beginning of each experiment, the PEM films were deposited on quartz slides placed on a sample holder allowing to coat simultaneously the two faces of the quartz slides. For each deposition cycle yielding to the deposition of a PLL-HA "layer pair", the sample holder was successively put in the PLL solution for 1 min, in the NaCl solution for 1 min, in the HA containing solution for 1 min and again in the polyelectrolyte free rinsing solution for 1 min. The NaCl rinsing baths were regularly discarded to avoid contamination of the polyelectrolyte solutions by polymers of the opposite charge that are weakly bound to the substrate. The number of "layer pairs" was equal to n , yielding to $(\text{PLL-HA})_n$ films. The notion of "layer pair" is only meant for the aim of simplicity, because in the conditions used in the present work, the $(\text{PLL-HA})_n$ films have a thickness that increases exponentially with n , the polycation diffusing through the whole thickness of the film [175], at least for n lower than 15, meaning that the film is not stratified anymore.

The AP solution at 1 mg.mL^{-1} in 0.15 M NaCl was put in the presence of the $(\text{PLL-HA})_{15}$ films for 2 h. The film was then rinsed with a sodium chloride solution for 1 min and either directly used for enzymatic assays or coated with either a $(\text{PAH-PSS})_2$, a $(\text{PAH-PSS})_4$, a $(\text{PDADMAC-PSS})_2$ film, or a plasma polymer barrier before enzymatic assays.

2.3 Plasma polymer and LBL based barriers

The plasma polymers were produced using an atmospheric plasma device (VITO, Netherlands) previously described in a publication [110]. Briefly, a gas mixture consisting of the carrier gas, helium, and small precursor droplets is allowed to flow between two aluminium plate electrodes in which a 3.25 mm thick glass plate prevents from direct arcing. The precursor is nebulized via a glass bubbler carried by a secondary flow of helium adjustable in the range of 1 to 2 bars and at room temperature. Then the mixture is introduced in the plasma area by the main flow of helium at 10 standard liters per minute. The flow of

carried gas is controlled using a mass flow controller (MKS instruments). The quartz plate coated with a (PLL-HA)₁₅ film with or without embedded enzymes is placed between the electrodes and thus in the plasma area which is at atmospheric pressure and at ambient temperature in an open air reactor.

To avoid a variation in film thickness which can occur during the plasma polymerization process, the upper electrode is able to move at a constant velocity (4 m.min⁻¹) above the bottom electrode. The upper electrode was moved above the substrate 2, 10 or 20 times leading to deposits made from 2, 10 or 20 passes respectively. The resulting barriers are made from plasma polymerized EGDMA, called ppEGDMA. To avoid variations in the operational conditions which could change markedly the properties of the plasma coatings [105], they have been kept constant with a constant power of 120 W and a pressure difference of 2 bars to nebulize the monomer. The frequency of the applied power was of 6 kHz.

Before deposition of the ppEGDMA barrier; the polyelectrolyte film was removed from one side of the quartz plate. The side of the quartz slide from which the PEM film was removed was not exposed to the plasma.

The polyelectrolyte barriers, (PAH-PSS)₂, (PSS-PAH)₄ and (PDADMAC-PSS)₂ barriers were deposited on the (PLL-HA)₁₅ films with or without embedded AP. Great care has to be taken to make the adsorption time of PSS, PAH and PDADMAC as short as possible to minimize the occurrence of polyelectrolyte exchange from the underlying (PLL-HA)₁₅ film [168]. We used an adsorption time of 1 min for each polyelectrolyte as well as a 1 min rinse in NaCl solution between two deposition steps.

2.4 Measurement of enzymatic activity

The quartz slides coated with the different films were put in rectangular 1 cm long polystyrene cuvettes and at time $t=0$, the PNP solution at 3 mM was added to follow the absorbance increase at 405 nm, due to the appearance of paranitrophenol resulting from the hydrolysis of PNP. The reference cuvette contained the same quartz slide with the same coatings, with or without a barrier layer, but the absence of embedded enzyme. Such a reference substrate was chosen to take into account the slow hydrolysis of PNP or any influence of the barrier layer. The absorbance kinetics were performed with a Lambda 35 double beam spectrophotometer from Perkin Elmer. A measurement was performed every 15 s for a minimal duration of 1.8×10^3 s and up to 3.0×10^4 s. During this time duration, the

absorbance at 405 nm increased linearly with time, meaning that the slope of straight lines gives the initial hydrolysis rate.

For all substrates, the PEM films being capped or not with a barrier, three successive kinetics were performed. Two successive experiments were separated with a 10 min immersion step in 40 mL of Tris-NaCl buffer to remove the non-hydrolyzed PNP and the obtained paranitrophenol.

In order to compare the enzymatic activity in PEM films without and with barrier such as, (PAH-PSS)₂, (PAH-PSS)₄ or (PDADMAC-PSS)₂ and those with a plasma polymer barrier, we took into account that the enzymes was present on only one side of the quartz slides in the case of the plasma polymer barriers. Hence, the absorbance obtained on the (PLL-HA)₁₅ + enzymes and on the (PLL-HA)₁₅ + enzymes + polyelectrolyte film was divided by two.

To check the presence of enzyme in the PNP solution after the enzymatic assays, we let this solution at rest for 12 hours and measured its absorbance against a PNP solution which was not in contact with the films. In the case of enzymes desorption from the film, one expects the absorbance at 405 nm to continue to increase even if the quartz substrate has been removed from the solution.

2.5 Characterization techniques

The thickness of the PEM films was measured after their depositions on silicon slides and after incubation of the films into a AP solution during 2h. The films were blown dry gently under a nitrogen stream before the measurement. The thickness determination was performed with a spectroscopic ellipsometer in the wavelength range between 400 to 900 nm (Auto SE, Horiba, France). The films were assumed to be homogeneous and isotropic coatings from a material having a dispersion curve identical to poly (methylmethacrylate).

The thickness of the (PLL-HA)₁₅, (PLL-HA)₁₅ + enzyme and (PLL-HA)₁₅ + enzymes + ppEGDMA barriers was measured in the dry state by means of line profiles obtained with atomic force microscopy in the tapping mode (Pico SPM, Molecular Imaging). We used N doped silicon tips (ACT model from AppNano) mounted on cantilevers with a spring constant of 50 N.m⁻¹ according to the furnisher. The images were acquired on 10 μm x 10 μm areas at a scan rate of 1 Hz and a resolution of 512 x 512 pixels. We focused the imaging zone on areas that were needle scratched. These zones could be easily identified with an optical microscope coupled to the piezo scanner of the AFM. The (PLL-HA)₁₅ films capped with barriers made from (PAH-PSS)₂ and (PDADMAC-PSS)₂ barriers were not characterized

by AFM. Surface topographies of such films can be found in previous publications [168, 169]. The line profiles displayed herein correspond to the average of 30 lines.

3. Results and discussion.

3.1. PEM films and embedding of the enzyme.

As previously described [175], the thickness of the (PLL-HA)_n coatings increases exponentially with n. Since the coatings consist of islands for coatings made from less than n=8 "layers pairs", we choose to use coatings homogeneous enough to lead to homogeneous films. Such a level of homogeneity is reached for n larger than 10. Hence, we investigate the interaction of such films with alkaline phosphatase. The thickness of the films does neither increase nor decrease upon 2 h of contact with an AP solution at 1 mg.mL⁻¹ (Figure 6 of the Supporting Information). We did not try to optimize the enzyme loading in the (PLL-HA)_n films. It might well be that longer incubation times would lead to higher enzymes loading.

When the (PLL-HA)₁₅ films are put in 3 mM PNP containing Tris-NaCl buffer, some important hydrolysis is measured by UV-vis spectroscopy. But when successive trials of 30 min are performed, the slope of the absorbance versus time curves rapidly decreases (Figure. 36A).

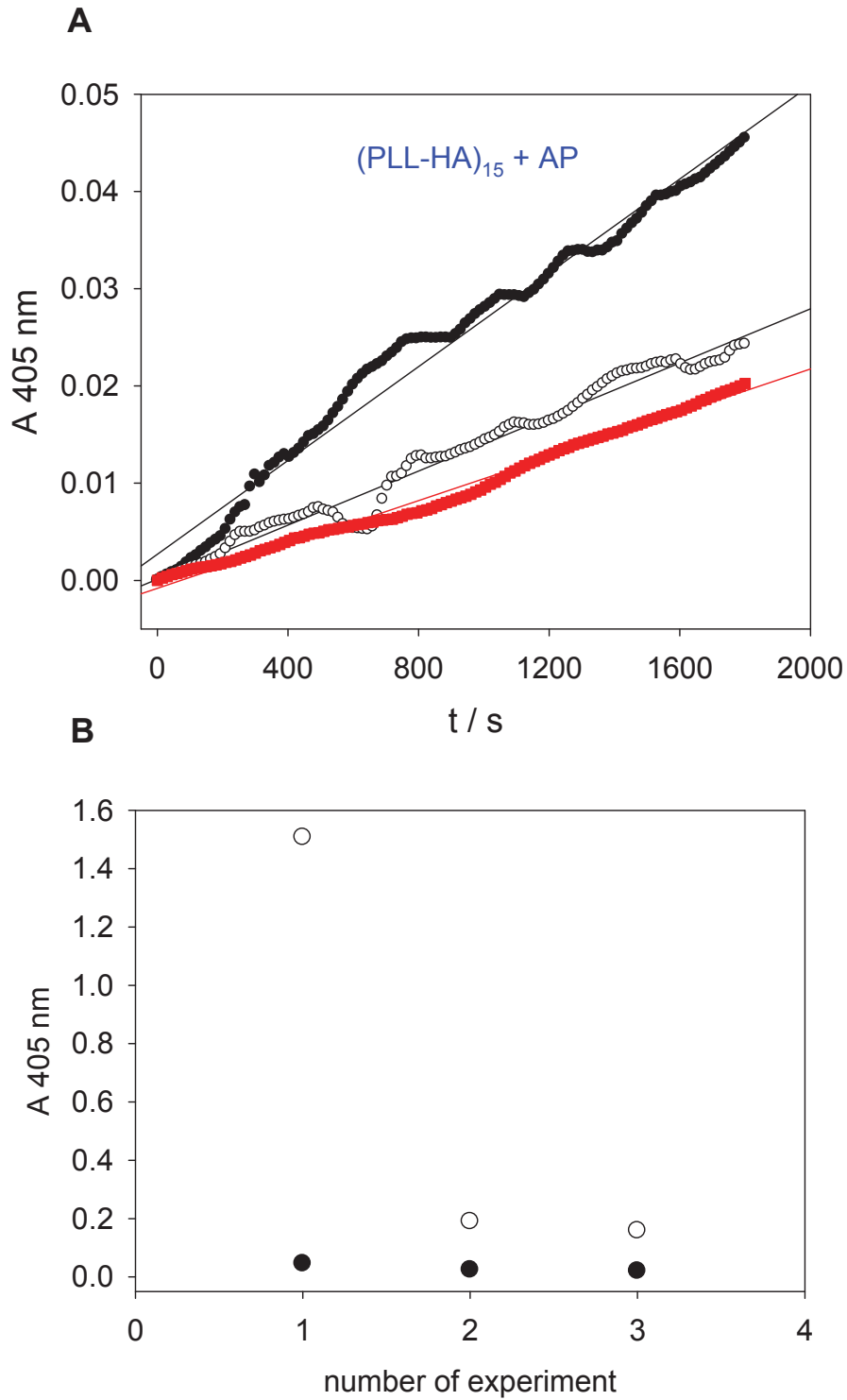


Figure. 36. A. Evolution of the absorbance at 405 nm of a (PLL-HA)₁₅ film loaded with the enzyme (AP) during 2h and put successively in a 3 mM PNP containing Tris-NaCl buffer, for the first (●), the second (○) and the third measurement (■). After each experiment the film was immersed in Tris-NaCl buffer to wash away PNP and its hydrolysis product. The straight lines correspond to linear regressions to the experimental data.

B. Absorbance at 405 nm in the cuvette at the end of each enzymatic assay (●) and after 12 h of storage (○) of the PNP solutions in the absence of the quartz substrate.

This may most probably be related to a desorption process of the enzymes as was found for negatively charged CdTe nanoparticles loaded in PEM films made from PDADMAC and poly (acrylic acid) [147]. It is highly improbable that the fast decrease in activity observed in Figure 36A is due to a denaturation of the enzymes linked to the fact that the environment of PEM films most often stabilizes the conformation of the embedded enzymes [165]. To ascertain the occurrence of desorption from the film, the activity of the PNP solutions was measured from each trial by letting the PNP solution age for 12 h in the absence of the quartz substrate. It appears that the absorbance increases with storage time, particularly for the first experiment (Figure 36B). This means that an important amount of enzymes is released from the PEM film during the first assay. This is line with a strong decrease of the slope of $A_{405\text{nm}}$ curve versus time between the first and the second assay (Figure 36A).

Hence it is mandatory to find barriers able to suppress the desorption of the enzymes from the film and able to allow for the diffusion of PNP through this barrier. Barriers based on linearly growing PEM films [166] are of course effective. In particular, $(\text{PAH-PSS})_2$ barriers allow for an almost quantitative retention of the enzyme, since the slope of the activity versus time curves does not decrease with the number of trials (Figure 37A). Similarly, the absorbance of the PNP solutions does not increase with storage time (Figure 37B).

When the experiments are performed with a two times thicker (PAH-PSS) barrier, namely for a $(\text{PAH-PSS})_4$ barrier, the trend is the same but the activity is reduced by a factor of two, which may well be due to a more difficult access of the substrate to the enzymes.

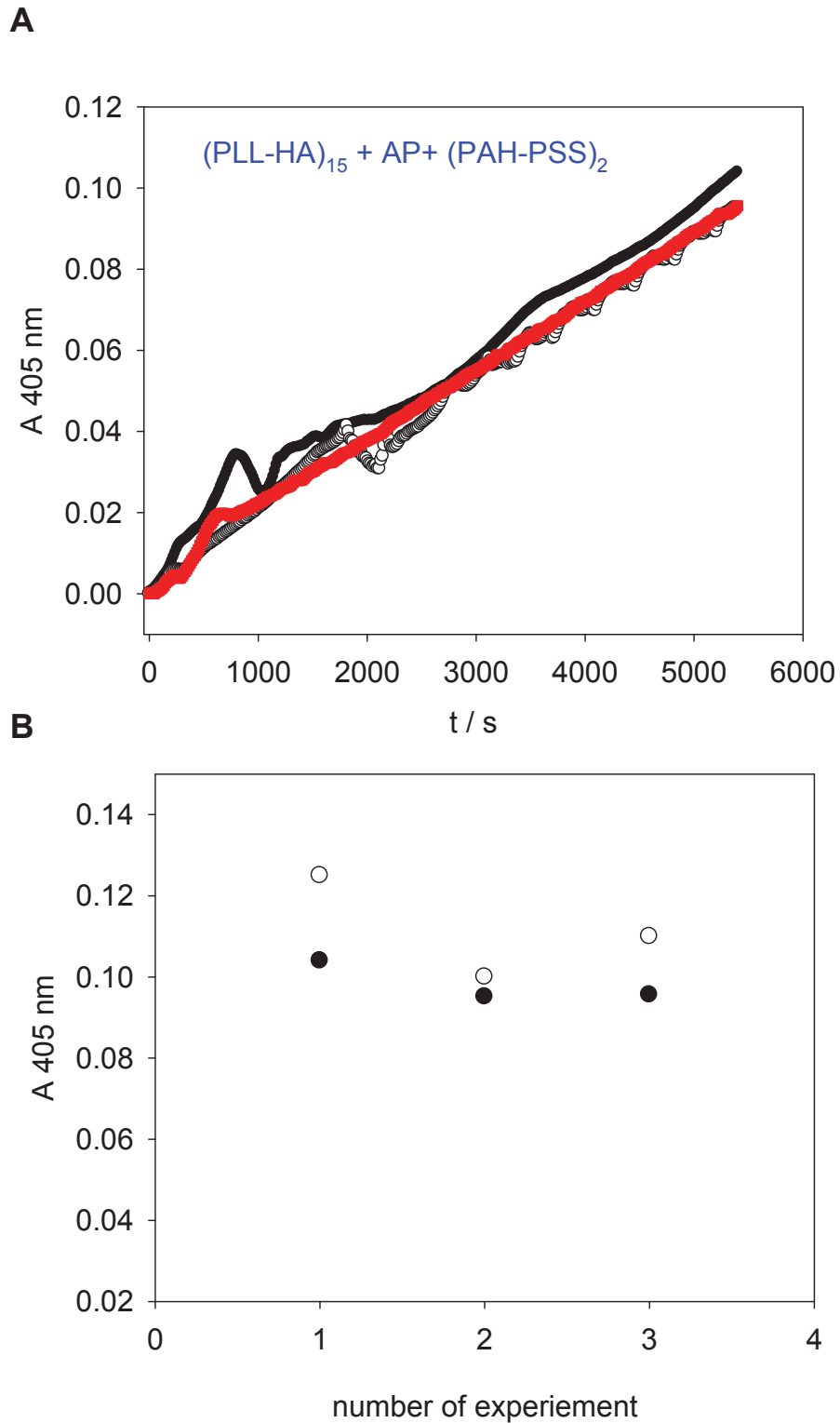


Figure 37. A. Evolution of the absorbance at 405 nm of a $(\text{PLL-HA})_{15}$ film loaded with the enzymes (AP) during 2h, with a $(\text{PAH-PSS})_2$ capping layer and put successively in a 3 mM PNP containing Tris-NaCl buffer, for the first (●), the second (○) and the third measurement (■). After each experiment the film was immersed in Tris-NaCl buffer to wash away PNP and the corresponding hydrolysis product.

B. Absorbance at 405 nm in the cuvette at the end of each enzymatic assay (●) and after 12 h of storage (○) of the PNP solutions in the absence of the quartz substrate.

In the case of (PDADMAC-PSS)₂ barriers, the barriers appear to allow hydrolysis rates of PNP that are similar to those of (PLL-HA)₁₅ + AP + (PAH-PSS)₂ films (Figure 7 of the Supporting Information). However, the thicker (PDADMAC-PSS)₄ barriers are so compact that the substrate is not able to diffuse through it to reach the enzyme. Another interpretation could be that the deposition of this barrier leads to an almost quantitative desorption of the enzyme, for instance via an exchange process. On the basis of previous research, this assumption can be discarded: AP embedded in (PLL-HA)_n films becomes accessible to its substrate only when the whole architecture capped with a (PDADMAC-PSS)_n barrier and deposited on a flexible PDMS substrate is stretched above a critical strain level [169]. These results show that the efficiency of a polyelectrolyte barrier to suppress enzymes desorption and to simultaneously allow for the diffusion of substrates through the barrier is strongly dependent on the nature of the polyelectrolytes used to build up the barrier. In addition, enzyme desorption may already occur during the deposition of the polyelectrolyte barrier because it is an aqueous based process. For these reason, we tried to maintain the adsorption time of each layer in the barrier film as short as possible, namely at 1 min.

It is hence of the highest interest to find alternative methods to deposit well suited barriers on top of PEM films containing embedded enzymes. Plasma polymer based films are well suited candidates for that goal because they are deposited according to a dry state process. In addition atmospheric plasma deposition in DBD conditions is a very soft method allowing not only to keep the monomers functionality [116] in the obtained coating but also to incorporate functional enzymes in the coatings [143].

The thickness of ppEGDMA films on silicon increases linearly with the number of passes of the upper electrode of the plasma chamber above the substrate. The thickness increment of such films is of 15.2 nm per pass in the present experimental conditions (Figure 38).

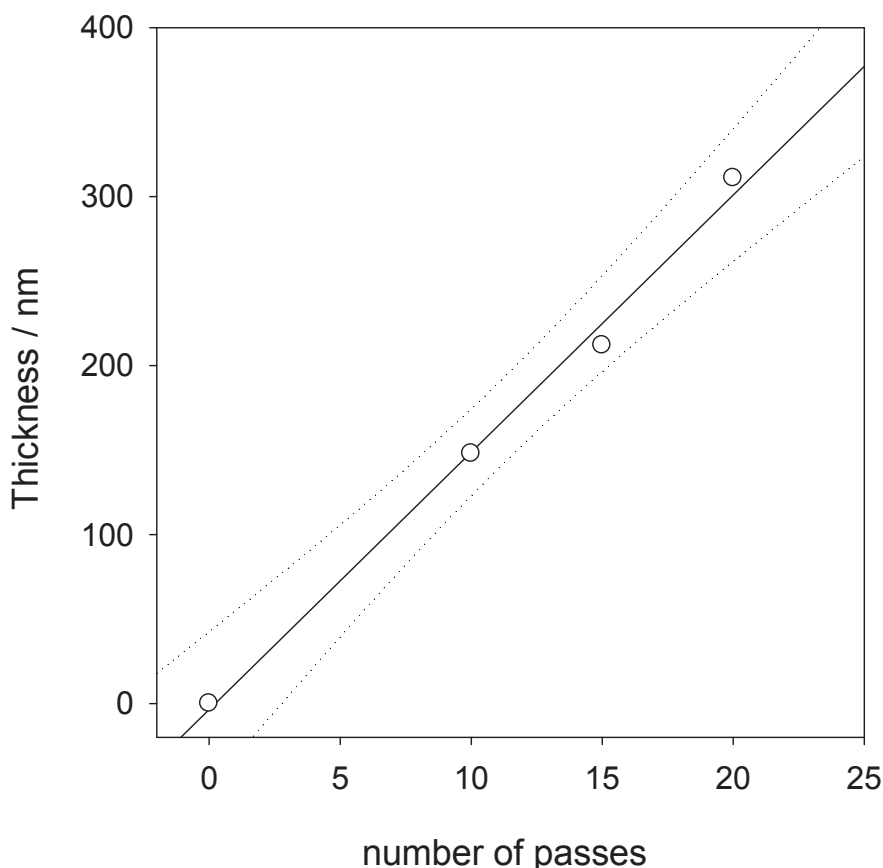


Figure 38. Thickness of ppEGDMA films on silicon substrates as determined from height profile measurements on scratched films by means of AFM. The solid line is a linear regression to the data and the dotted line corresponds to the limits of the 95% confidence interval.

These experiments show that the thickness of the plasma polymer coatings increases with the number of passes, but they do not mean that the thickness of the ppEGDMA will be the same on the (PLL-HA)₁₅ film than on the pristine silicon. We will measure the thickness of the whole (PLL-HA)₁₅ + AP + ppEGDMA coating by means of AFM.

3.2 Enzymatic activity in the PEM films coated plasma polymer barriers.

Hence we deposited ppEGDMA coatings made from 2, 10 and 20 passes of the upper electrode above the (PLL-HHA)₁₅ + AP films. One movement of the upper electrode takes about 3s, meaning that the coating made from 20 passes, about 300 nm thick, is prepared in about 1 min, a deposition method much faster than the deposition of polyelectrolyte layers made by the alternated dipping method. We measured the enzymatic activity of AP

embedded in (PLL-HA)₁₅ films (in the same conditions as previously) after deposition of ppEGDMA with 2, 10 and 20 passes. It appears that after two passes the losses in enzymes are important, almost as if no effective barrier was present (Figure 37A). This can be seen by direct comparison with the data from Figure 36A. However when the ppEGDMA barrier is made from 10 passes, the enzymatic activity does not decrease with the number of experiments (Figure 39A) and no measurable increase of the absorbance of the PNP solutions is noticed after the removal of the coated quartz plate from that solution. This means that a ppEGDMA film made from 10 passes, and about 150 nm in thickness (Figure 38), is as efficient as a (PAH-PSS)₂ barriers which is about 6-10 nm thick according to the literature [176]. This suggests that ppEGDMA are intrinsically more permeable than (PAH-PSS)_n films. They offer the advantage that such a layer can be deposited in the absence of water in about 30 s whereas the deposition of the PEM film made from two layer pairs and four rinsing steps lasts over 8 minutes, a time during which enzyme desorption can occur from the underlying PEM film. When the plasma polymer film becomes even thicker, about 300 nm after 20 passes of the upper electrode above the substrate, the enzymatic kinetics displays a different regime with an initial lag phase of about 1.2×10^4 s followed by a linear regime of absorbance increase. The two first experiments were performed up to a measurement time of 5400 s and no significant absorbance increase could be detected which cannot be due to a desorption of enzyme because no activity was found in the PNP solution after 12h of storage. In the third experiment, we decided to measure the increase in absorbance up to 3×10^4 s (ie 8.3 hours) and a change in the kinetic regime was then found after about 3 h of contact with the PNP solution. This peculiar kinetics may well be due to a slow diffusion of the PNP through the thick ppEGDMA barrier.

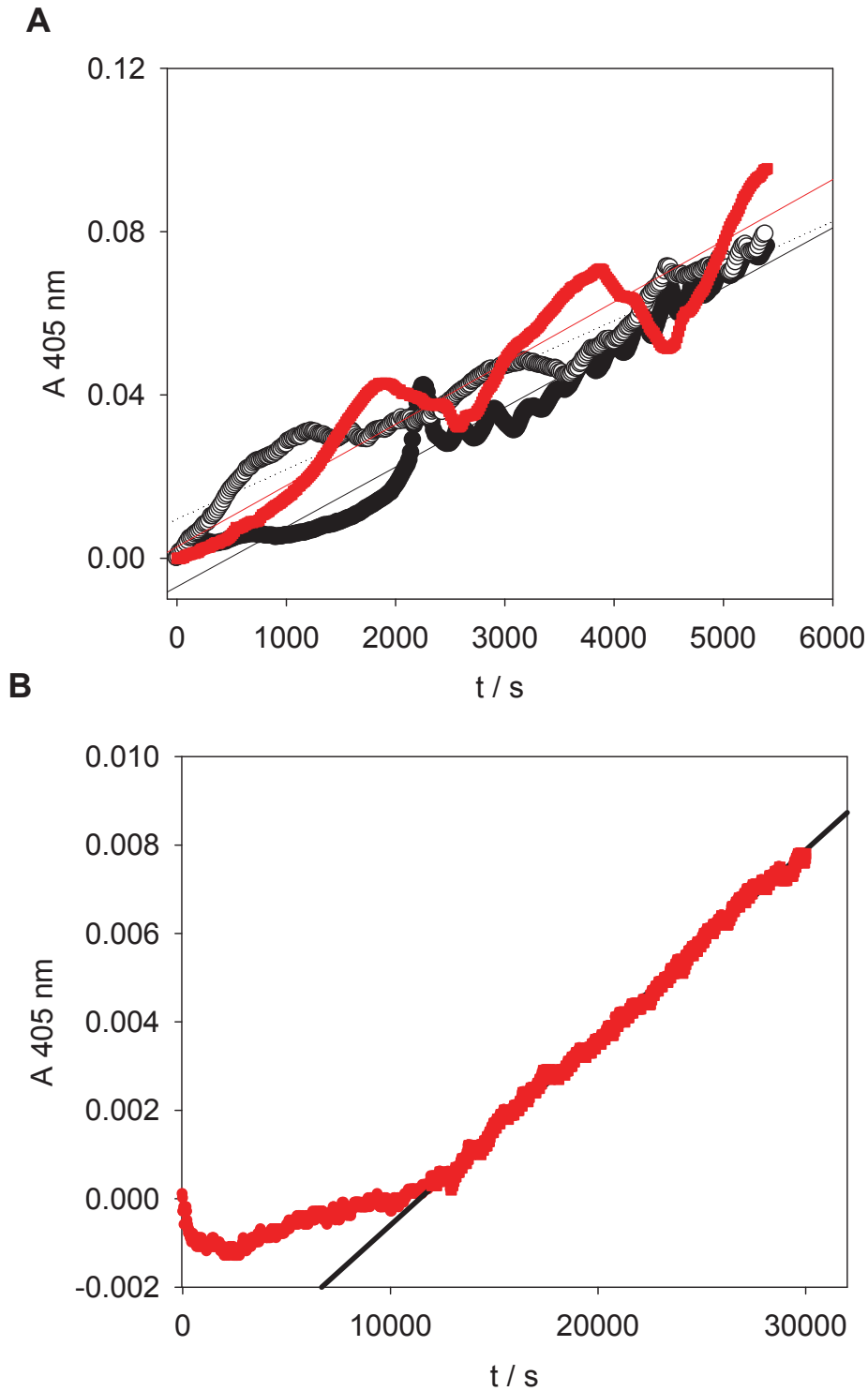


Figure 39. **A.** Kinetics of PNP hydrolysis in the presence of $(\text{PLL-HA})_{15} + \text{AP} + 10$ passes of ppEGDMA for the first (\bullet), the second (\circ) and the third (\blacksquare) experiment. The lines correspond to linear fits to the experimental data. **B.** Kinetics of PNP hydrolysis in the presence of $(\text{PLL-HA})_{15} + \text{AP} + 20$ passes of ppEGDMA for the third (\blacksquare) experiment. The two first experiments are not displayed because they were performed only up to 5.4×10^3 s

and were similar, in this time range, to the third experiment. The line corresponds to a linear fit to the experimental data for times larger than 1.2×10^4 s.

A 300 nm thick ppEGDMA barrier is hence not optimal for ensuring the accessibility of PNP to the enzyme embedded in the underlying film because the activity in the linear enzymatic kinetic regime is almost two orders of magnitude smaller than when $(\text{PSS-PAH})_2$ or 4, $(\text{PDADMAC-PSS})_2$ or 10 passes of EGDMA are used, Figure 40.

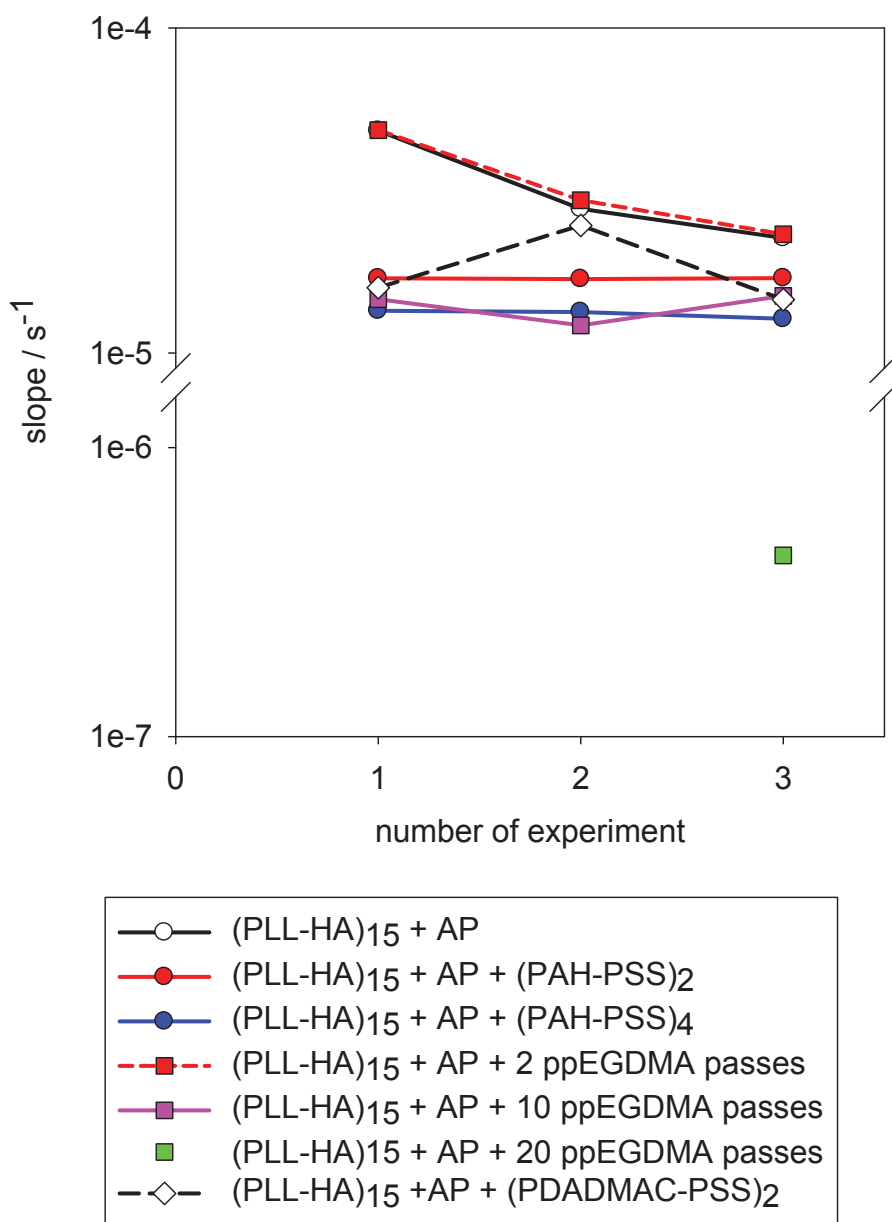


Figure 40. Evolution of the rate of the enzymatic hydrolysis of different films. The nature of the barrier is given in the inset. *The lines are just aimed to guide the eye.*

Note that the ppEGDMA films made from 20 passes are extremely smooth (Figure 41) either in the presence or in the absence of enzyme, in addition their thickness is as expected and corresponds to the sum of the thickness of the (PLL-HA)₁₅ film (about 300 nm, Figure 6 of the Supporting information) and the plasma layer coating (about 300 nm, Figure 38).

As expected the barrier made from two ppEGDMA passes is extremely rough and seems not to cover the whole multilayer film (data not shown) which is consistent with a fast protein desorption.

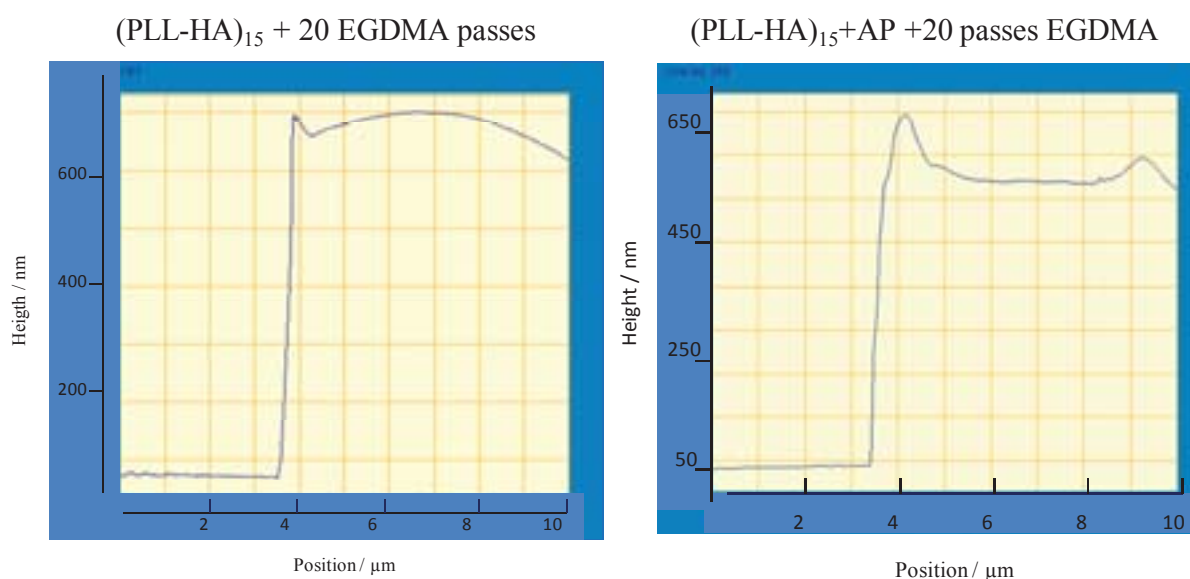


Figure 41. Line profiles (average over 30 lines) obtained through a scratch in films made from (PLL-HA)₁₅ + 20 EGDMA passes and (PLL-HA)₁₅ + AP + 20 EGDMA passes.

It appears hence that barriers made from plasma polymers as ppEGDMA produced in solvent free conditions and at atmospheric pressure can behave as barriers as efficient as (PAH-PSS)_n, with n = 2 to 4 layer pairs or (PDADMAC-PSS)₂ to considerably reduce enzymes desorption from PEM films and simultaneously to allow for diffusion of the substrate through the barrier. However the thickness of the barrier has to be adjusted, because thicker barriers (300 nm for 20 passes of ppEGDMA) produce a significant lag in the onset of substrate hydrolysis and a considerably slower hydrolysis rate, namely an almost two orders of magnitude with respect to a two times thinner barrier. This result is similar to that obtained with (PDADMAC-PSS)_n barriers [169]. When, these latter become thicker and thicker they become impermeable to the substrate aimed to reach the enzyme embedded in the underlying highly hydrated PEM film. These thick impermeable (PADMAC-PSS)_n films become

permeable upon stretching when the strain level is higher than a critical value of 70% on a flexible poly (dimethylsiloxane) substrate on which the PEM architecture is deposited.

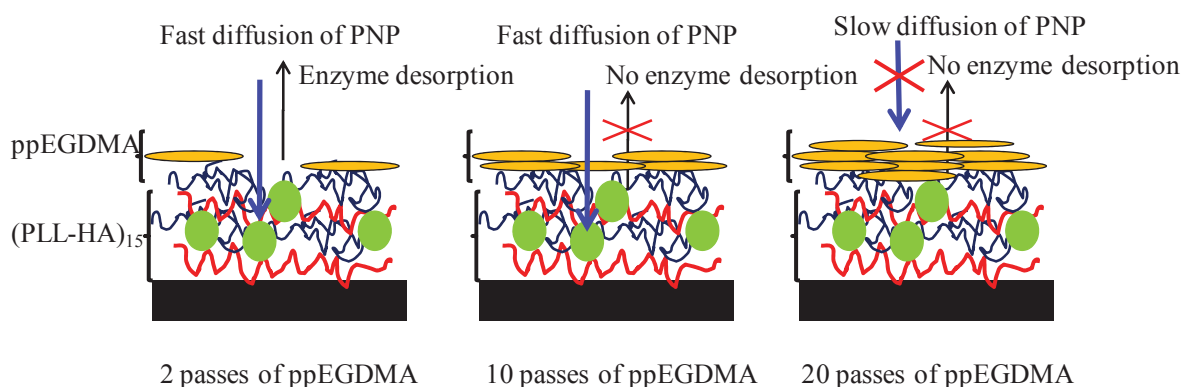
The chemical structure of the plasma polymer barrier has also to be adjusted with respect to the substrate to diffuse through it. This will be the subject of future investigations in which we aim to generalize the concept presented therein.

The different results suggest that there are three states of a plasma polymer barrier (Scheme 1) that can be reached by playing on its thickness:

(i) at very low coverage of the plasma polymer, an island like coating is obtained which allows for the enzymes to diffuse out of the film in the solution. Such a state of the "barrier" is not satisfactory if the whole film has to be used as a biosensor.

(ii) as soon as the plasma polymer forms an homogeneous coating, the enzymes are not able to find 'pathways' large enough to diffuse back in the solution, and its substrate, a small hydrophilic molecule in the present case, is still able to cross the barrier without inducing a significant lag phase in the enzymatic catalysis.

(iii) when the plasma polymer coating becomes even thicker and eventually more dense, the substrate takes much more time to cross the barrier by diffusion. This induces a significant lag phase in the hydrolysis of the substrate as well as a significant decrease in the reaction rate. The reasons why the hydrolysis rate is decreased by almost two orders of magnitude with respect to a two times thinner plasma polymer coating remains to be explored.



Scheme 1: Illustration of the influence of the plasma polymer thickness on the enzyme desorption and on the diffusion of PNP through the barrier.

4. Conclusions

We demonstrated that coatings made from atmospheric pressure plasma polymerized EGDMA are able to considerably reduce the desorption of alkaline phosphatase from the (PLL-HA)₁₅ layer provided the coatings are thick enough (100-150 nm). At the same time, these coatings allow for the diffusion of the enzyme's substrate to the enzyme containing reservoir without an observable lag phase in the kinetics of hydrolysis and with only a small decrease in the hydrolysis rate. Such coatings are hence alternative to barriers made from compact (PAH-PSS)₂, (PAH-PSS)₄ and (PDADMAC-PSS)₂ barriers. They offer the same properties as those barriers and offer the advantage of a very fast processing in the absence of water which induces desorption of the enzymes. When the plasma polymer coatings become thicker the diffusion of the substrate is slowed down, inducing a lag phase in the onset of hydrolysis. The reduction of the hydrolysis rate by almost two orders in the subsequent linear kinetic regime remains to be explained. In future investigations we will investigate the role of the chemical structure of the monomer used to produce the plasma polymer in the efficiency of the barrier. We assume that the hydrophilic/hydrophobic balance of the coating as well as the pore size distribution will have a major influence on the permeability of the substrate through the barrier. Anyway, the precise characterization of the pore size distribution in plasma polymer coatings is a challenge for their use in high added value coatings. Another point of interest will be to measure the enzymatic activity of AP after prolonged storage times of days and weeks in the composite (PLL-HA)₁₅ + ppEGDMA films.

Ce travail avait pour but de comparer deux méthodes distinctes de préparation pour l'obtention de barrières capables de limiter la désorption d'enzymes tout en laissant diffuser son substrat enzymatique. Les résultats obtenus ont montré que les barrières obtenues par plasma à partir d'EGDMA permettaient d'atteindre ce but. En effet, les vitesses d'hydrolyse du PNP obtenue par spectroscopie UV ont montré que l'activité catalytique diminuait faiblement après plusieurs tests ce qui pouvait être interprété comme une meilleure préservation de l'enzyme dans la couche LbL. De plus, l'augmentation de l'épaisseur de la couche tend à diminuer fortement la vitesse d'hydrolyse du PNP, en augmentant le trajet parcouru par le substrat enzymatique et le produit. Les barrières obtenues par plasma apparaissent donc être une bonne alternative aux barrières obtenues par la méthode du 'couche par couche'. De plus, il est possible de déposer rapidement et en une seule étape, des barrières dont les propriétés peuvent être ajustées en fonction de l'environnement dans lequel va évoluer le système.

4. Préparation en une étape d'un film polymère plasma pour la libération de médicaments.

Discussion et commentaires

Cette étude nous a permis de développer un nouveau procédé simple et rapide permettant l'obtention d'une matrice plasma polymère dans laquelle il est possible d'introduire une molécule d'intérêt directement lors de la phase de polymérisation. En effet, l'utilisation de plusieurs étapes pour l'immobilisation de différents types de molécules a tendance à limiter l'intérêt de tels procédés pour des visées industrielles. C'est pourquoi une méthode en une seule étape est intéressante et novatrice. Les parties précédentes ont montré que des matrices chimiquement stables disposant de groupements fonctionnels pouvaient être obtenus par polymérisation plasma. De plus, les dépôts préalablement obtenus présentaient un certain gonflement une fois en contact avec un milieu aqueux. Ce phénomène est largement utilisé dans le cas de la libération contrôlée de médicaments. En effet en fonction de la réticulation de la matrice, la molécule (médicament) est capable de diffuser plus ou moins rapidement. Les films obtenus à partir d'acide méthacrylique, de diméthacrylate d'éthylène glycol et d'acétaminophène ont été étudiés en utilisant différents outils de caractérisation préalablement décrit. La molécule utilisée dans cette étude a été choisie de par son intérêt en pharmacologie et son faible poids moléculaire.

One step preparation of plasma based polymer films for drug release

Cédric Amorosi^a, Vincent Ball^{a,}, Jérôme Bour^a, Philippe Bertani^b, Valérie Toniazzo^a, David Ruch^a, Luc Averous^c, Marc Michel^a, Materials Science and Engineering: C, 2012, 32: p. 2103-2108*

a: Department of Advanced Materials and Structures, Centre de Recherche Public Henri Tudor, 66 rue de Luxembourg, Esch-sur-Alzette, Luxembourg.

b: Laboratoire de RMN et Biophysique des Membranes, UMR 7177 LC3 Chimie Université de Strasbourg, 8 allée G. Monge, 67083 Strasbourg.

c: LIPHT-ECPM, Laboratoire d'Ingénierie des Polymères pour les Hautes Technologies, EA(CNRS) 4379, Université de Strasbourg, 25 rue Becquerel 67087 Strasbourg Cedex 2 France

1. Introduction

Recently, thin polymer films received extensive interest because of their applicability in the field of drug delivery thanks to their high surface-to-volume ratios and controlled porosity. These properties allow to retain and to release specific molecules [177]. Among thin film systems, polymer-based structures made from hydrophilic monomers remain the most interesting due to their low cost, biocompatibility and biodegradability [178-180]. Thus far, polymeric nanostructures have been manufactured by a wide set of techniques such as mold replication [181], colloidal lithography [182], interfacial polymerization [183], nanoimprinting [184], electrospinning [185], track etching [94], templating [186], electrodeposition [187], holographic lithography [188], self-assembly [189] and low pressure plasma polymerization [190]. Nevertheless, and despite very promising advances, the fabrication of polymer thin films is time consuming, complex and hence far away for being applicable to in-line processes. The use of atmospheric plasma polymerization to design polymer-based thin films for drug delivery could circumvent some of these drawbacks. Plasma polymerization is nowadays considered as a promising and versatile technique to manufacture plasma polymer films with functional properties without affecting the intrinsic structure of the substrates. Moreover, it is now well-established that films made from plasma polymers are usually branched, cross-linked and pinhole-free coatings. Plasma deposition ensures covalent bonding to the substrate via free radical sites created at the substrate-gas

interface during the onset of the electrical discharge. Such covalent bonds allow for a good adhesion on most substrates [191] in contrast with conventional coating techniques. Atmospheric plasma polymerization is based on a dry process making it suitable for a wide range of applications such as electronic and optical devices, protective coatings, adhesion promoters and biomedical materials [192-195]. Recently, radio frequency plasma polymerization has been employed to prepare plasma polymer films made from butyl methacrylate (PBMA) and such films were used for drug delivery of paclitaxel [196]. Moreover, when the film was treated with oxygen, its porosity increased leading to a higher capacity for drug retention. Pan et al [197] synthesized thermo sensitive poly N-isopropylacrylamide (pNIPAM) films through plasma polymerization. Despite very encouraging results as stimuli responsive systems, these studies were performed under vacuum, impeding their application to in-line processes.

For this reason, Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge (APDBD) constitutes a promising method of preparation, compared to low pressure processes. Indeed it can afford an in-line deposition process. Moreover, it has been observed that in most cases, APDBD allows for a low degree of monomer fragmentation thanks to a pressure sufficient for limiting the kinetic energy of charged species producing then less excited species [128].

The present work aims at designing plasma polymer based films for drug delivery systems *in a one-step manner*. In opposition to almost all our studies where the drug is added to the plasma polymer after its deposition, we incorporate a model drug, acetaminophen, directly in the monomer containing solution. To our knowledge this is a new concept that could allow to produce simultaneously the polymer scaffold and the simultaneous incorporation of the drug. The drug will be added in the gas phase directly during the polymerization. Provided the energetic conditions of the plasma phase are soft enough, we expect to keep the molecular integrity of at least part of the drug and to investigate its spontaneous release in the aqueous solution put in contact with the film.

Plasma polymer films made of methacrylic acid (MAA) and of ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) were prepared.

Different characterization techniques such as Fourier transformed infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy show the generation of a plasma polymer with the preservation of the monomer's functional groups. In addition, parts of the acetaminophen molecules introduced in the gas phase during the plasma process are preserved in the film. The preserved acetaminophen molecules desorb progressively from the film with a characteristic time of a few hours when the film is put in the presence of water.

Up to now, biomolecules as proteins and enzymes have already been incorporated in films produced by plasma enhanced chemical vapor deposition and the bioactivity of such hybrid coatings has been demonstrated. The bioactivity of enzymes like glucose oxidase was thought to be due to the presence of residual water around the enzyme's surface, indeed the enzyme was co-injected with the precursors of the plasma film (pyrrole and acetylene) in the form of small droplets [143]. It is our aim to extend this concept to drugs but without the use of an aqueous phase which can produce foaming in the APDBD configuration. This is a challenging task because small model drugs, like acetaminophen, are subjected to fragmentation in the plasma phase. To our knowledge this work is the first showing the possibility of incorporating drugs in a plasma polymer film in a single step by adding the drug to the monomer mixture able to undergo plasma polymerization in APDBD conditions.

2. Materials and methods

Methacrylic acid (MAA), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), acetonitrile and acetaminophen were purchased from sigma Aldrich and used without any further purification. Silicon wafers and glass wafers were purchased from Siltronix (Archamps, France) and from Carl Roth, respectively. They were cleaned in a freshly prepared piranha solution (3:1 v/v in concentrated sulfuric acid and 30% hydrogen peroxide solution) during 15 minutes, rinsed in H₂O and ethanol prior to the deposition process (extreme care should be taken during the manipulation of piranha solution which may turn to be explosive in the presence of organic compounds). Potassium bromide pellets were used as substrates during plasma polymerization for the FTIR-IR analyses.

Films were deposited using a semi dynamic atmospheric pressure dielectric barrier discharge (DBD) plasma open air reactor (Figure 8 of the Supporting Information). More details about the used device can be found in the paper by Bour et al [111]. During plasma polymerization, a gas mixture consisting of the carrier gas helium and precursor droplets, which was constituted by MAA or EGDMA with or without the drug (acetaminophen) were injected between two aluminum plates electrodes (604 cm² each) in which a 3.25 mm thick glass plate prevent from direct arcing. The different precursors were nebulized via a glass bubbler carried by a secondary flow of helium adjustable under a pressure between 1 to 2 bars at room temperature. The precursors were then introduced in the plasma area by the main flow of helium at 10 standard liters per minute (slm). This constant flow rate was controlled using mass flow controllers (MKS instruments).

Plasma discharge was generated by an AC power supply with a frequency of 6 kHz and a power range between of 60 and 120 W, leading to a power density over the electrodes varying from 0.1 to 0.2 W.cm⁻². The operating parameters which have been applied are: 2 bars of pressure, 120 W of power, 10 slm as flow rate and 6 kHz as the frequency.

A certain degree of thickness variation always exists when the plasma polymer is deposited on the stationary substrate in the reactor. Such uncontrolled fluctuations in the film thickness can be avoided by moving the upper electrode over the substrate during the plasma process. In this way, the upper electrode is able to move at a constant speed (4 m.min⁻¹) above the bottom electrode. 20 passes of the upper electrode over the substrate were performed in the case of plasma polymer deposition and 99 passes were performed when the films were deposited in the presence of paracetamol for release analyses. The reason for the difference in

the two kinds of experiments is that we needed to have films thick enough to obtain good signal to noise ratio for the drug release experiments.

The compositions of the solutions used to produce the films are reported in Table 7. Two different categories of coatings named A₁ and A₂ were prepared with and without acetaminophen, respectively. Note that for the preparation of the A₁ films, the two monomers and the drug were dissolved in acetonitrile and that the whole mixture was atomized for the production of the drug doped plasma polymer film. The precursors (MAA and EGDMA) and the acetaminophen were weighed and placed into a 25 mL volumetric flask and dissolved in 18 mL of acetonitrile [2]. The solutions were stirred for 15 min and put in the reactor before being nebulized. After deposition on the glass substrate, the coatings of plasma film were dipped into deionized water at pH 8 to follow the release of the entrapped acetaminophen.

Composition	A₁	A₂
MAA (mmol)	6	6
EGDMA (mmol)	30	30
Acetaminophen (mmol)	1.5	0
Acetonitrile (mL)	18	18

Table 7. Nominal composition of the solutions used to synthesize the polymer films by APDBD.

The chemical structure of the coating was investigated by an FTIR Bruker Optics Tensor 27 spectrophotometer and a Bruker Solid State DSX 300 MHz NMR spectrometer. Both techniques allowed for the characterization of the functional groups which have been generated during the plasma polymerization. Plasma polymer films were directly deposited on KBr pellets and infrared spectra were recorded in the transmission mode by accumulating 50 scans with a resolution of 4 cm⁻¹ between 4000 and 400 cm⁻¹. For NMR analyses, films deposited on glass substrates were scrapped and transferred in a 4 mm NMR rotor. The ¹³C CPMAS spectra were recorded at 298 K on a Bruker Solid State DSX 300 MHz NMR spectrometer equipped with a Bruker 4 mm ¹H/X CPMAS probe. A shaped Cross-Polarization pulse sequence with tangential modulation on both channels was used. The spinning speed was set at 10 kHz, the spectral width was of 30 kHz, the contact time was of

1.6 ms, proton RF field was around 100 kHz for decoupling and 40 kHz for contact, with a recycle delay of 2 s.

In addition to FTIR and NMR spectroscopies, the composition of the A₂ film was characterized by means of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) using an hemispherical Energy Analyzer SPECS (PHOIBOS 150) employing a monochromatic AlK α radiation (1486.74 eV) operating at 200 W with an anode voltage of 12 kV. The pressure in the analysis chamber was equal to 10⁻⁹ mbar. The pass energies were set to 80 eV and 20 eV for survey and higher resolution scans, respectively. The binding energy scale was calibrated from the carbon contamination using the C1s peak at 284.6 eV. Core peaks were analyzed using a nonlinear Shirley-type background. The peak positions and areas were optimized by a weighted least-square fitting method using 70% Gaussian and 30% Lorentzian line shapes. The presence of acetaminophen in the A₁ films was confirmed by the presence of the N1s peak in the XPS spectra (data not shown).

The morphology and thickness of the plasma polymer films were investigated by Atomic Force Microscopy (AFM). Films were imaged in air with silicium nitride cantilevers (Park Scientific) and in tapping mode (Nanoscope III-A Dimension 3100 digital Instruments, Veeco). The image size was of 1 μm x 1 μm and the resolution was of 512 x 512 pixels.

The matrix structure of the plasma polymer film and of the compounds released upon contact with water was investigated with a Bruker Autoflex III mass spectrometer (MALDI-TOF). MALDI-TOF mass spectra were recorded to check the integrity of the acetaminophen using a Bruker Autoflex III mass spectrometer (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany) equipped with a Nd-YAG laser ($\lambda=355$ nm) operating at a pulse rate of 200 Hz. Ions were accelerated under a 19 kV voltage with Pulsed Ion Extraction (based on the mass range of the polymer distribution, generally around 100 ns). The analyzer was operated in the reflection mode and ions were detected using a microchannel plate detector. For negative ion mode measurements, all operational parameters were kept identical except that polarity of acceleration was reversed. External calibration was performed using poly(ethylene glycol)s with $M_w = 600$ and 1000 g.mol⁻¹. FlexControl software version 3.0 (Bruker Daltonics) was used for instrument control and data acquisition, and FlexAnalysis software version 3.0 (Bruker Daltonics) for data processing.

Complementary, the release kinetics was investigated by UV-vis spectroscopy using a Perkin-Elmer model lambda 35 spectrophotometer. The detection was performed in the wavelength range between 200 and 400 nm with a slit width of 2 nm.

2. Results and discussion

AFM investigations were done in order to determine both the thickness and the topography of the deposited film (Figure 42).

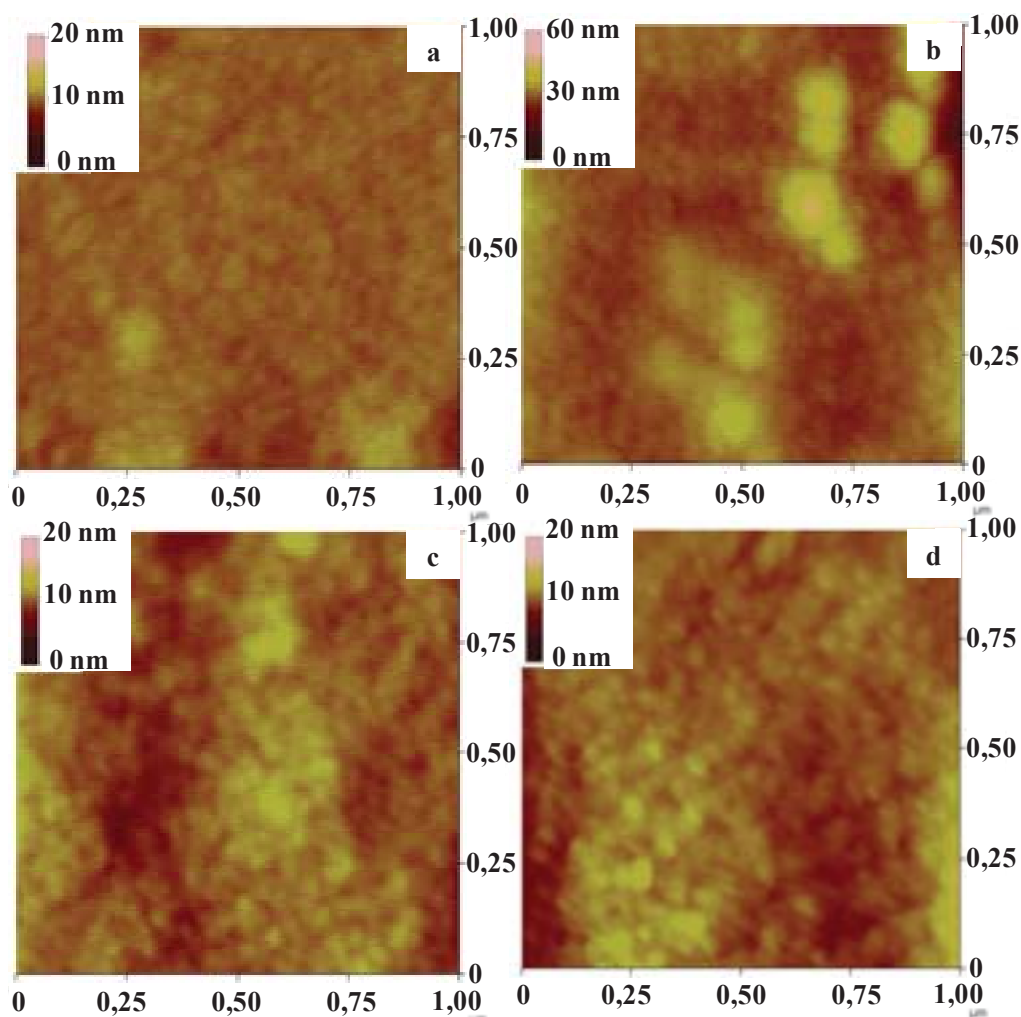


Figure 42. Typical AFM topography images obtained from the plasma polymers (a) ppMAA, (b) ppEGDMA, (c) A₁ and (d) A₂ for 20 passes. A₁ and A₂ correspond to the films produced with and without acetaminophen (see Table 8).

Figure 42 shows a typical AFM topography (1 μm x 1 μm) of the different coatings obtained for the operating conditions previously described. The topographic images were acquired for films made in the presence of drug in the monomer solution (A₁) as well as for reference coatings without drug (A₂). The thickness of each film has been found to be 150, 311, 350 and 375 nm for ppMAA, ppEGDMA, A₂ and A₁ respectively. The fact that the ppEGDMA, the A₁ and A₂ films are comparable in thickness and much thicker than those we obtained with MAA after an identical number of passes of the upper electrode above the lower one,

shows that the thickness of these coatings is mainly related to the presence of EGDMA in the blend.

The surface of the plasma polymers films is smooth in all cases, the root-mean square (rms) roughness values being lower than 3 nm. Therefore, it can be stated that homogeneous coatings can be obtained using a dielectric barrier discharge in helium at atmospheric pressure. The presence of drug in the monomer solutions does not significantly affect the film morphology.

The composition of the deposited films was investigated by means of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR-IR). FTIR spectra of MAA and EGDMA have been previously described [198, 199]. The XPS spectrum is as expected for a plasma polymer coating made from MAA and EGDMA. The XPS spectrum of the A₁ film is similar to that of the A₂ film with exception of a small peak corresponding to the N1s photoelectrons (data not shown). The nitrogen atoms being a signature of the acetaminophen drug, this peak at around 400 eV in the XPS spectrum of the A₁ film can only be explained by the incorporation of the drug or of its fragments.

The plasma polymers made from MAA and EGDMA present the main signature of the corresponding monomer as observed in Figure 9 and 10 of the Supporting Information. The band at 1700 cm⁻¹ (MAA) associated with the broader band centered at 3500 cm⁻¹ is characteristic of the carboxylic group (-COOH) in the case of ppMAA. The band at 1362 cm⁻¹ is associated to the C-O-H bending of the carboxylic groups. C-O stretching vibrations alpha branched are also observable at 1290 and 1175 cm⁻¹. In the case of EGDMA, the band at 1727 cm⁻¹ characteristic of the carbonyl group, the CH₃ bending mode of methyl group at 1450 cm⁻¹ and ether groups between 1050 and 1320 cm⁻¹ (C-O-C stretch) are a proof a good preservation of the monomer's functional groups. Nevertheless, a broader band around 3500 cm⁻¹, clearly smaller than in the case of ppMAA, can be observed and can be attributed to the hydroxyl group formed during the process due to the presence of small amount of oxygen. Even more important, the strong decrease of the vinyl group at 1640 cm⁻¹ and at 930 cm⁻¹ with respect to the monomer implies that the polymerization is primarily involved through the double bond.

To obtain a better insight in the structure of the obtained plasma polymer films, they were scratched away from their substrate and the obtained powders were analyzed by ¹³C CPMAS NMR spectroscopy.

The spectrum of ppMAA shows a strong decrease in the intensity of the peak located between 100 and 130 ppm. This peak is associated with the vinyl group which confirms that

the polymerization occurs through the double bond (Figure 11 of the Supporting Information). The other main peaks due to the methacrylic acid monomer around 20 ppm and 175 ppm are broadened in the spectra of the powders due to the different orientation of the monomer unit into the plasma polymer films. These bands can be associated to the plasma polymer. This deduction can be confirmed with the apparition of new peaks at 45 and 54 ppm due to the vinyl group opening.

A more quantitative measurement of the overall unreacted double bonds in the different EGDMA based plasma polymer materials was obtained with ^{13}C CPMAS NMR, particularly the relative amount of unreacted double bonds corresponding to each polymerizable group. As shown in Figure 12 of the Supporting Information, the resonances around 100–130 ppm, due to the double bonds, can be observed for the plasma EGDMA polymers. Furthermore, peaks around 160–210 ppm that are attributable to the different C=O groups present in the crosslinked monomers can be noticed, with distinct resonances for C=O groups adjacent to C=C groups in all plasma polymers. A quantitative estimation of each type of unreacted double bond of the crosslinker after polymerization can be done. This value corresponds to the percentage of unreacted methacrylate groups (C=C) obtained from the area of the peak located at 167 ppm due to the C=O adjacent to C=C, compared with the total area due to C=O (167 and 175 ppm).

The percentages are based on the ratio of the integrated intensity of the carbonyl resonance assigned to the unsaturated carbonyl to the total integrated intensity of the saturated carbonyl. 7.2% of unreacted double bond has been obtained in our conditions. In correlation with this observation new peaks are also observable corresponding to the carbon after vinyl group opening.

Complementary, the structure of the plasma polymer made of EGDMA and MAA was investigated using MALDI-TOF. This technique allows the observation of the possible reaction between the two species leading to a “copolymer plasma”. In general, copolymers exhibit more complex MALDI spectra than those of the corresponding homopolymers. Indeed, due to all possible combinations of the monomer units, the detection of several different oligomer compositions is possible for exactly or in nearly the same mass. This phenomenon is more significant when the copolymerization reaction is induced by means of a plasma process. Radical species formed in the plasma are more versatile in comparison to those produced during conventional polymerization methods and moreover they react often randomly. For these reasons, the structure of plasma polymer films formed is very complex and the assignments of all peaks detected on their MALDI spectra are more difficult. The

MALDI spectrum of polymer plasma made of EGDMA and MAA is shown in Figure 12 of the Supporting Information.

Assignments of some peaks to different copolymer compositions are possible. The $[M+Na]^+$ and $[M+K]^+$ ions are thus detected, the m/z values of which can then be calculated according to equation (1):

$$m/z = 1(H)*2 + 86(MAA \text{ unit})*x + 198(EGDMA \text{ unit})*y + 23(Na) \text{ (or } + 39(K)) \text{ (1)}$$

All possible assignments for the mass peaks of the block copolymer observed for this plasma polymer are given in the Table 4 of the Supporting Information according to the values of x and y , the fractions of MAA and EGDMA respectively.

Possible reaction between MAA and EGDMA, when introduced together into the plasma, are observable leading to the smooth coating observable with AFM in Figure 39.

The presence of the acetaminophen in the sample A_1 has been determined by FTIR. Figure 43 shows the spectra corresponding to the sample A_1 before (**a**) and after washing (**b**), to the sample A_2 (**c**) and to pure acetaminophen dispersed in KBr Pellets (**d**).

The region between 1490 and 1530 cm^{-1} was highlighted because of the presence of a band specific to acetaminophen and observable in the sample A_1 before washing the film with water. This band, located at 1514 cm^{-1} , is characteristic of the acetaminophen aromatic ring [200]. The absence of this band in the two other spectra implies that the molecule of interest is only present in the sample A_1 before washing.

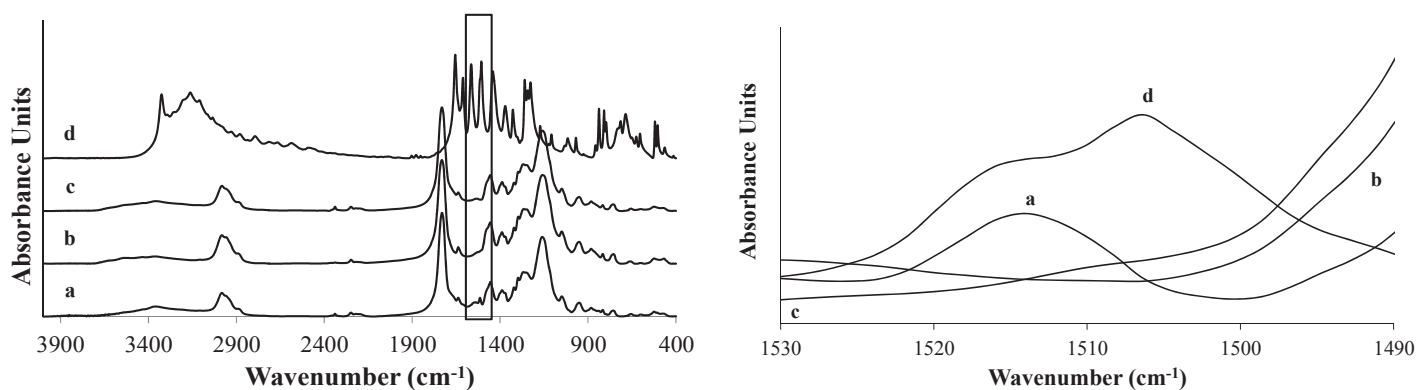


Figure 43. Left panel: FTIR spectra of the A₁ coating before washing (spectrum **a**), the same coating after washing with water (spectrum **b**), of the A₂ coating (spectrum **c**) and of pure acetaminophen (spectrum **d**). The right panel is a magnification of the spectra, in the 1490-1530 cm⁻¹ spectral domain, showing the presence of a band characteristic of acetaminophen in the spectrum of sample A₁.

Acetaminophen seems to be released from the coating after extensive washing with water. However, the IR spectra are only qualitative and do not provide an absolute proof that the remaining drug keeps its molecular structure during the plasma deposition. The question of molecular integrity can be asked when comparing spectra a and d in the right panel of Figure 40 : only the band centered at 1514 cm⁻¹ is present in the spectrum taken from sample A₁ whereas acetaminophen contains another peak centered at 1506 cm⁻¹. To ascertain if the released molecule is intact acetaminophen or not, MALDI-TOF mass spectrometry was used. Indeed it allows to measure the molecular weight of the molecule released in the water phase put in contact during 23 h with the film previously loaded with acetaminophen. Four different mass spectra are presented in Figure 44. These spectra correspond to the different water solutions after immersion in water of the polymer coated substrates as well as the mass spectrum of the pure matrix DHB which displays a peak at $m/z= 150.1$. The characteristic peak of the acetaminophen is given by the last spectrum, corresponding to pure acetaminophen in water solution. This peak at $m/z = 152$ has been used as a reference. In correlation with the result obtained with FTIR, the water solution put in contact with sample A₁ after washing reveals a peak at $m/z = 152$ corresponding to acetaminophen released from the plasma polymer coating.

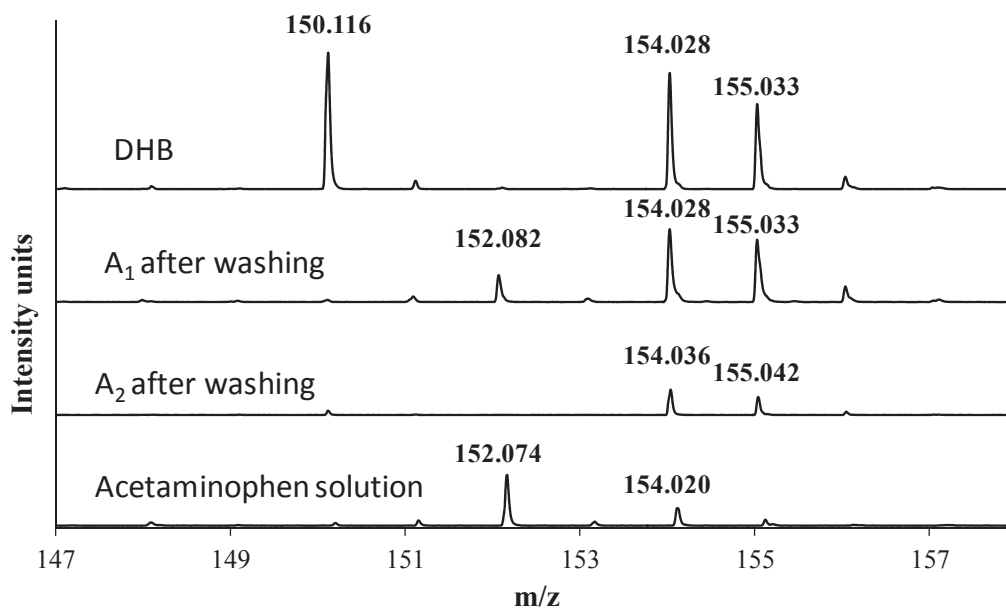


Figure 44. MALDI-TOF mass spectra corresponding to the different samples indicated in the insets.

The same solutions as those used for the MALDI-TOF spectra solutions were used for UV spectroscopy to further confirm the presence of acetaminophen. The spectra were compared with those from the literature. The absorbance band of acetaminophen in water is measured at around 247 nm.

In order to determine the kinetics of acetaminophen release from the plasma deposited coating, we used the coating A₂ as a reference, since it did not contain acetaminophen. Both samples (A₁ and A₂) were immersed in 2 different UV cuvettes filled with 20 mL of water and absorbance measurements were performed every minute at a wavelength of 247 nm. Figure 45 shows that acetaminophen is slowly released out of the plasma film before reaching a steady state after around 3×10^4 s. The release profile could be fitted with an exponential decay function:

$$A(t) = A_{\max}(1 - e^{-k \cdot t}) \quad (2)$$

suggesting that the release kinetics of acetaminophen follows a first order kinetics.

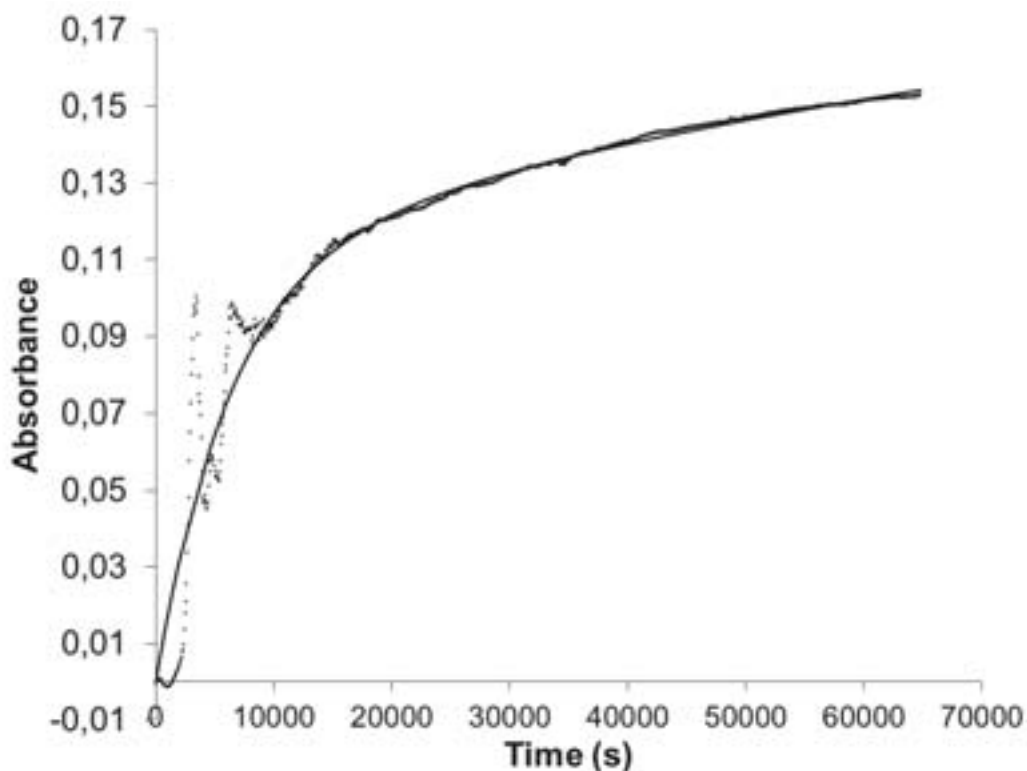


Figure 45. Kinetics of acetaminophen release. The full line corresponds to the fit of equation (2) to the experimental data and the dotted line corresponds to the experimental data.

The obtained rate constant was equal to $8.8 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. A spike can be observed around $t = 5500 \text{ s}$ which might be attributed to a possible heterogeneity in terms of concentration of acetaminophen inside the plasma polymer matrix. Consequently, it might be possible to get a burst of drug after a certain time of immersion in water. Note that the release profile shown in Figure 45 is reproducible within 20%.

It is also possible to determine the quantity of acetaminophen released during the process in these conditions. This value is given by the amount of molecules introduced into the plasma zone and the amount of molecules detected into the solution after release. The percentage of released acetaminophen has been found to be approximately 8% with respect to the amount injected in the monomer solution used to produce the coating. This relatively low value might be due to large destruction of acetaminophen occurring during the preparation of the film in the plasma deposition conditions, to some small incorporation in the polymer film or to some very strong interaction of the drug with the matrix impeding its release in solution. The reason for this small amount of released drug has to be investigated in details in forthcoming studies. Even if the amount of released drug seems to be small, the main message of this

paper is to prove the feasibility to design fast plasma polymer films in DBD conditions for drug release by means of atmospheric plasma polymerization in a one-step manner.

Note that the plasma polymer films loaded with acetaminophen were imaged by AFM after 1 day of contact with water: no significant change in film morphology was found suggesting that the drug is not incorporated in the form of aggregates in the films but is rather homogeneously distributed inside such coatings (data not shown).

Conclusions

In the present work, we showed the possibility of designing plasma polymer films made of methacrylic acid (MAA) and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) prepared by atmospheric pressure plasma deposition, in order to obtain smart coatings able to release acetaminophen. In this frame, acetaminophen was directly embedded into the film during the plasma polymerization. Even if only a part of the drug introduced in the gas phase can be released, we proved that this molecule can be progressively released from the plasma film when immersed into deionized water. The characteristic time for release of acetaminophen is of the order of a few hours. The approach presented herein highlights the fact that atmospheric plasma polymerization is a straightforward tool allowing to design fast prepared architectures, leading to a promising future for these materials as drug delivery devices.

In this way, further studies are still in progress to study the effect of operating parameters on drug release kinetics, the concentration of the different species during the preparation as well as the cytotoxicity of a drug when subjected to plasma treatment. Another point of importance will be the explanation of the small amount of drug released from the plasma polymer coating.

Le but de cette dernière partie est de permettre de mettre en évidence la possibilité de piéger, durant la phase de déposition, une molécule de faible poids moléculaire, tout en préservant son intégrité. En effet l'intérêt de ce type de système réside sur la possibilité de libérer une molécule active ou pas dans un environnement donné.

C'est ainsi que les résultats concernant l'étude de la structure chimique de l'échantillon obtenu après dépôt ont montré une bonne préservation des principaux groupements relatifs aux précurseurs utilisés. De plus, il a été observé que l'acétaminophène introduit dans la zone plasma est piégé dans le film et que sa libération pouvait se faire par simple immersion de l'échantillon dans une solution aqueuse. Cette libération peut être liée au gonflement du film. Ce dernier fragilisant les liaisons hydrogènes créées lors de la phase de polymérisation. Il serait alors intéressant d'étudier le comportement mécanique du film au contact d'une solution aqueuse.

D'autres part, il nous a été possible, grâce à la spectroscopie UV et la bande d'absorption dans l'UV de l'acétaminophène, de suivre la libération de cette dernière et d'estimer la quantité libérée dans la solution. Cette estimation nous a permis d'avoir un ordre d'idée concernant la quantité de molécule préservée durant la phase délicate de déposition plasma.

Les résultats ont montré qu'une faible partie (~ 8%) des molécules introduites dans le plasma peut être récupérée, dans les conditions d'expériences choisies.

Une étape d'optimisation est alors nécessaire. Par ailleurs, d'autres études doivent être réalisées afin de déterminer le rôle du solvant et de l'acétaminophène sur les mécanismes de polymérisation.

Supporting Information



Figure 1. Cross sectional SEM images obtained from the plasma polymers ppAA and ppMAA under different Y conditions and after 80 passes. The scale bars are different in the different micrographs.

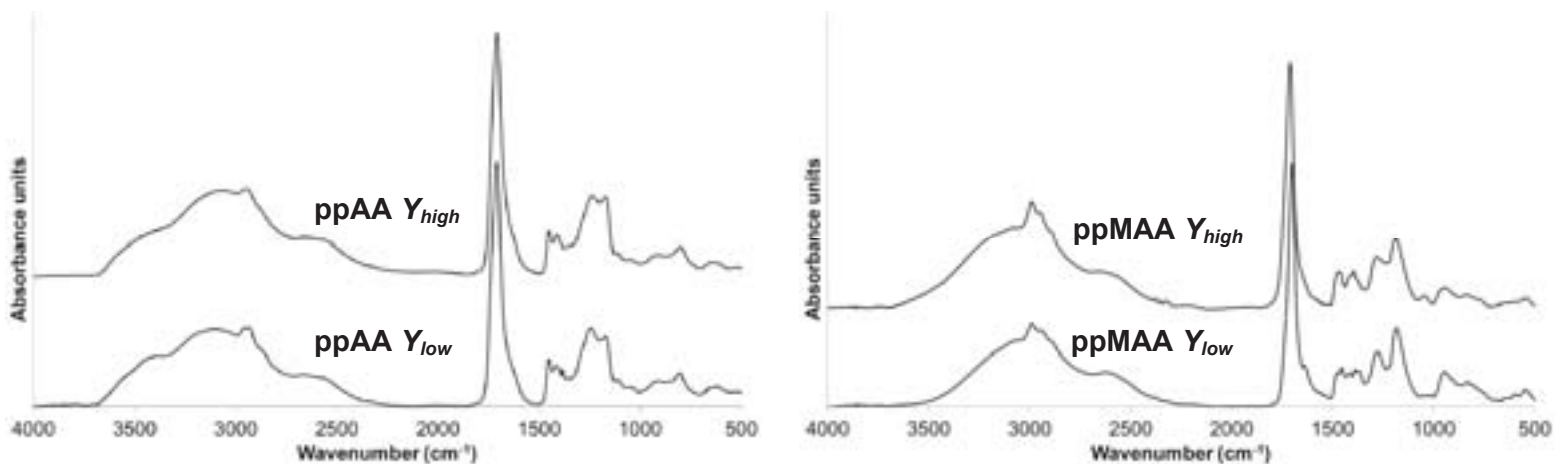


Figure 2. FTIR spectra acquired in the transmission mode for plasma polymer films made from AA (left panel) and MAA (right panel) under energetic conditions corresponding to Y_{low} (lower panel) and Y_{high} (upper panel).

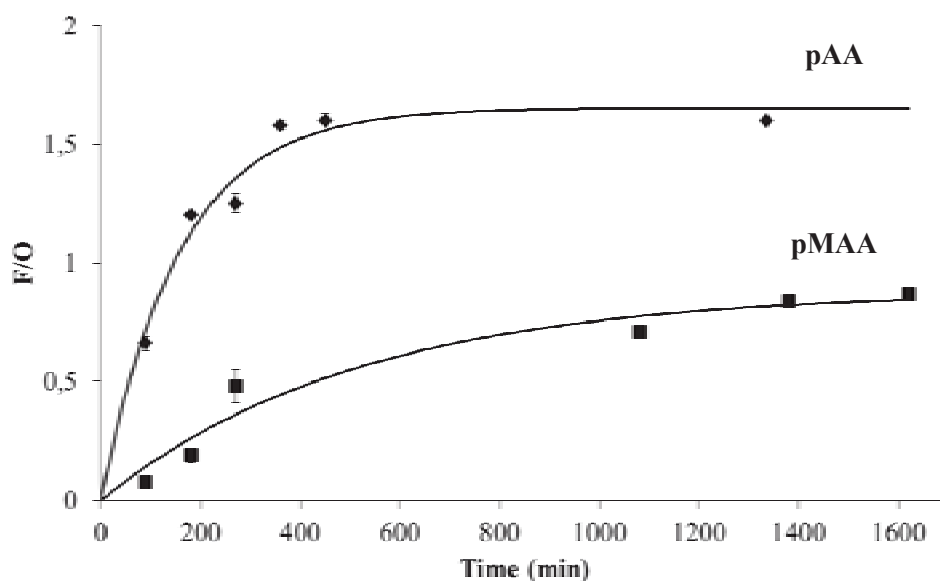


Figure 3. Determination of the F/O ratio on films spin coated from poly (acrylic) and poly (methacrylic) acid solutions versus TFE labeling time. The lines are only aimed to guide the eyes. The error bars correspond to one standard deviation over 3 independent measurements.

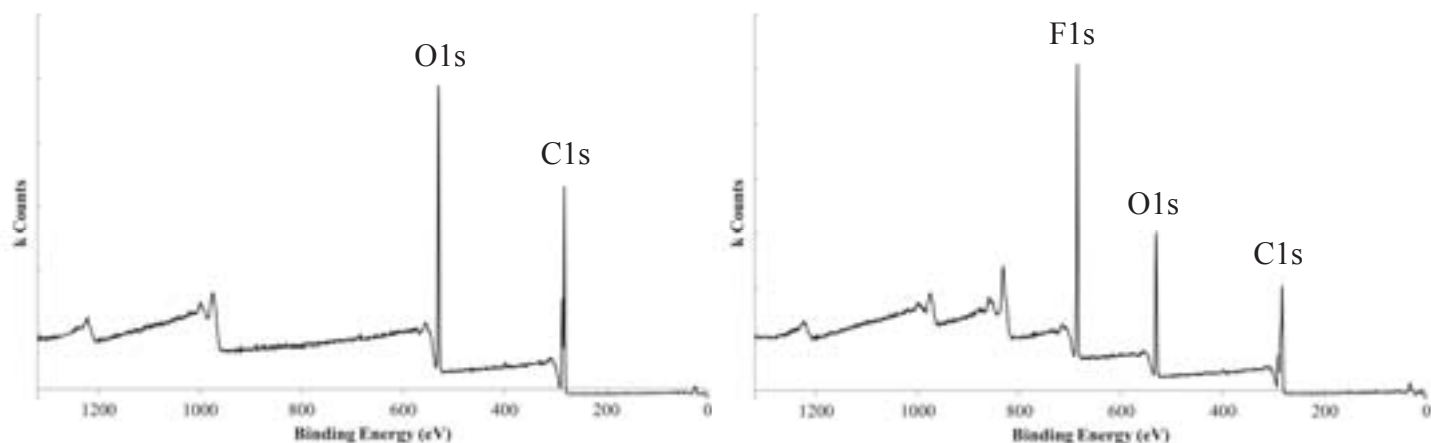


Figure 4. XPS survey spectra for plasma polymer films made from AA under energetic conditions corresponding to $Y_{intermediate}$ before (left) and after (right) reaction with TFE.

Carbon environment	Position /eV	% Atomic concentration	FWHM
C-C, C-H	284,6	37,6	1,28
C-C(=O)-OX	284,8	28,3	1,28
C-C(=O)-OX	288,7	28,3	1,28
O-C-CF3			
CF3			
C-O	285,8	4,6	1,28
C(-O)2	287	1,3	1,28

Table 1. Results of the peak fitting to the C1s core level of the XPS spectra of ppAA deposited in conditions of $Y_{intermediate}$ before chemical derivatization with TFE.

Carbon environment	Position /eV	% Atomic concentration	FWHM
C-C, C-H	284,6	31,3	1,48
C-C(=O)-OX	285,3	20,4	1,48
C-C(=O)-OX	288,7	20,4	1,48
O-C-CF3	287,1	12,9	1,48
CF3	292,3	13,0	1,48
C-O			
C(-O)2	287	2,1	1,48

Table 2. Results of the peak fitting to the C1s core level of the XPS spectra of ppAA deposited in conditions of $Y_{intermediate}$ after chemical derivatization with TFE.

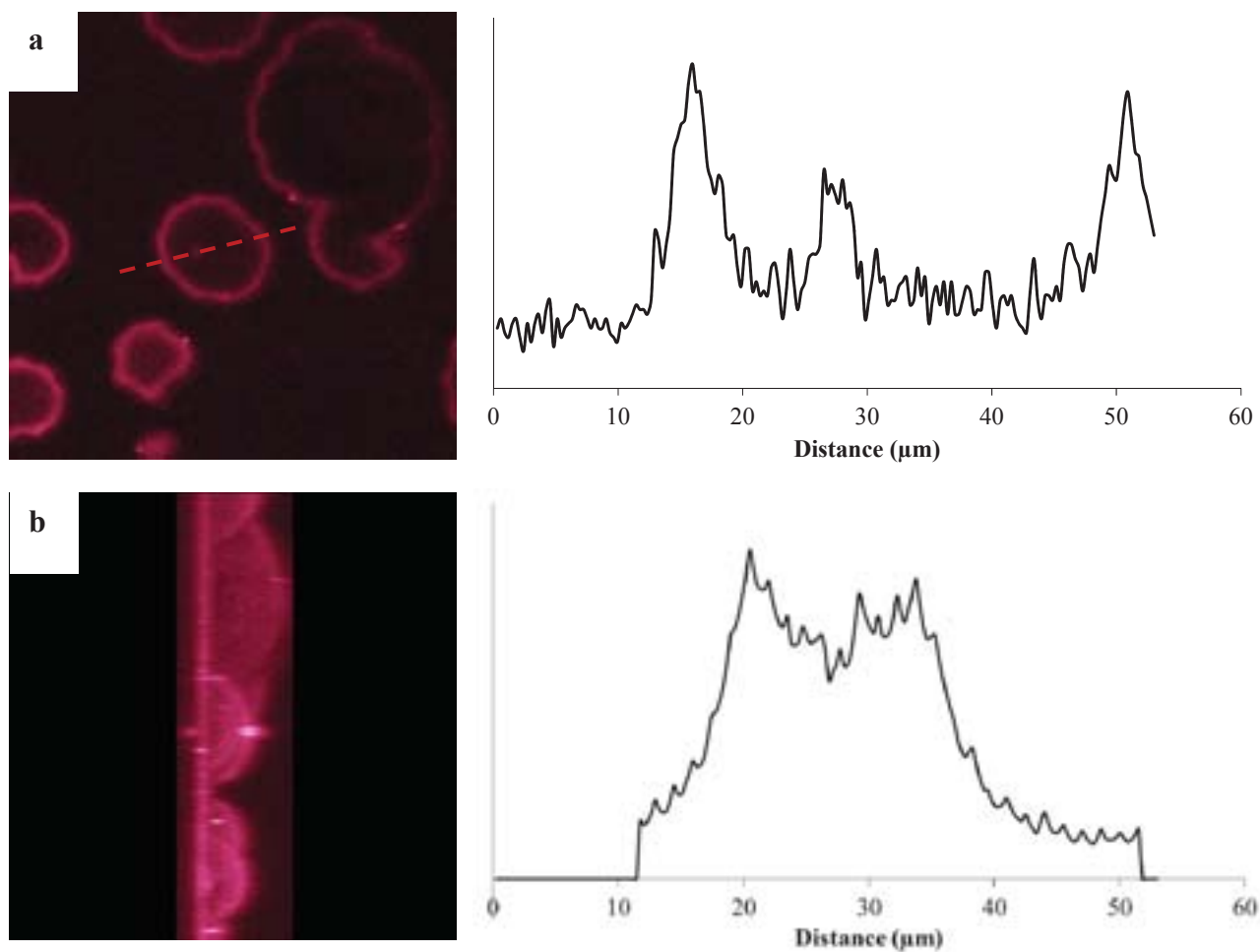


Figure 5. Confocal microscopy images of plasma polymer films deposited on PS substrate after immersion in buffered solution with enzyme. **a.** Thickness measurement of the membrane ($\sim 4\mu\text{m}$), **b.** approximately spot height ($\sim 20\mu\text{m}$).

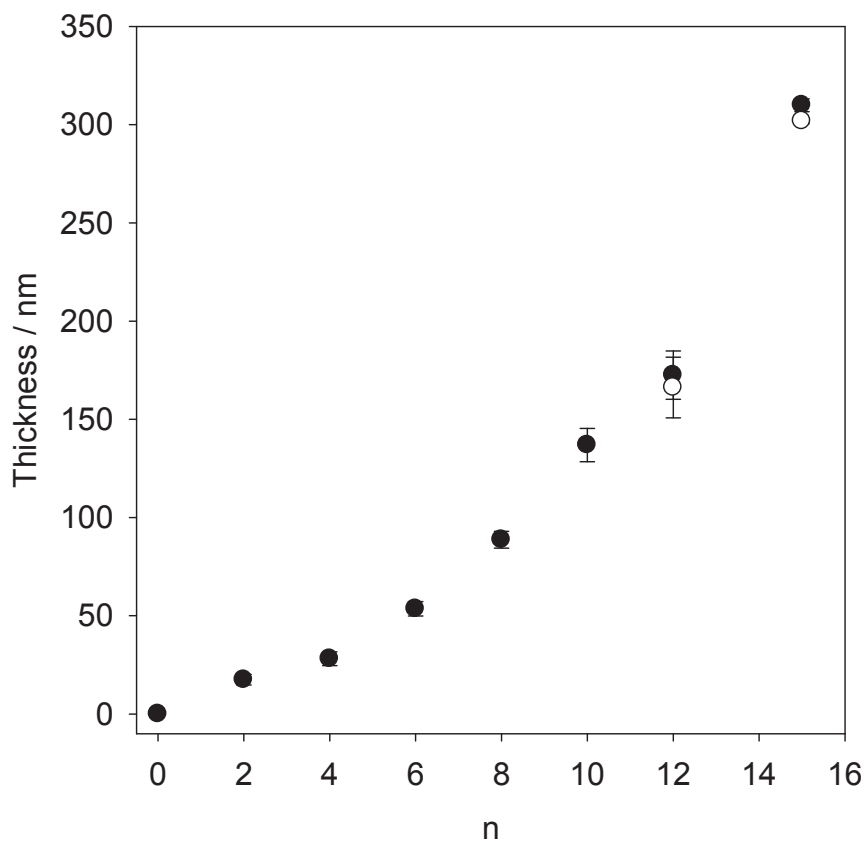


Figure 6. Evolution of the thickness of (PLL-HA)_n films deposited in the presence of NaCl 0.15 M solutions (●) and of the same films put in the presence of alkaline phosphatase at 1 mg.mL⁻¹ in the same electrolyte during 2h. The films were dried under a nitrogen stream before thickness measurement with spectroscopic ellipsometry. The thickness values correspond to the average of 5 measurements along the main axis of the silicon substrates and the error bars to one standard deviation.

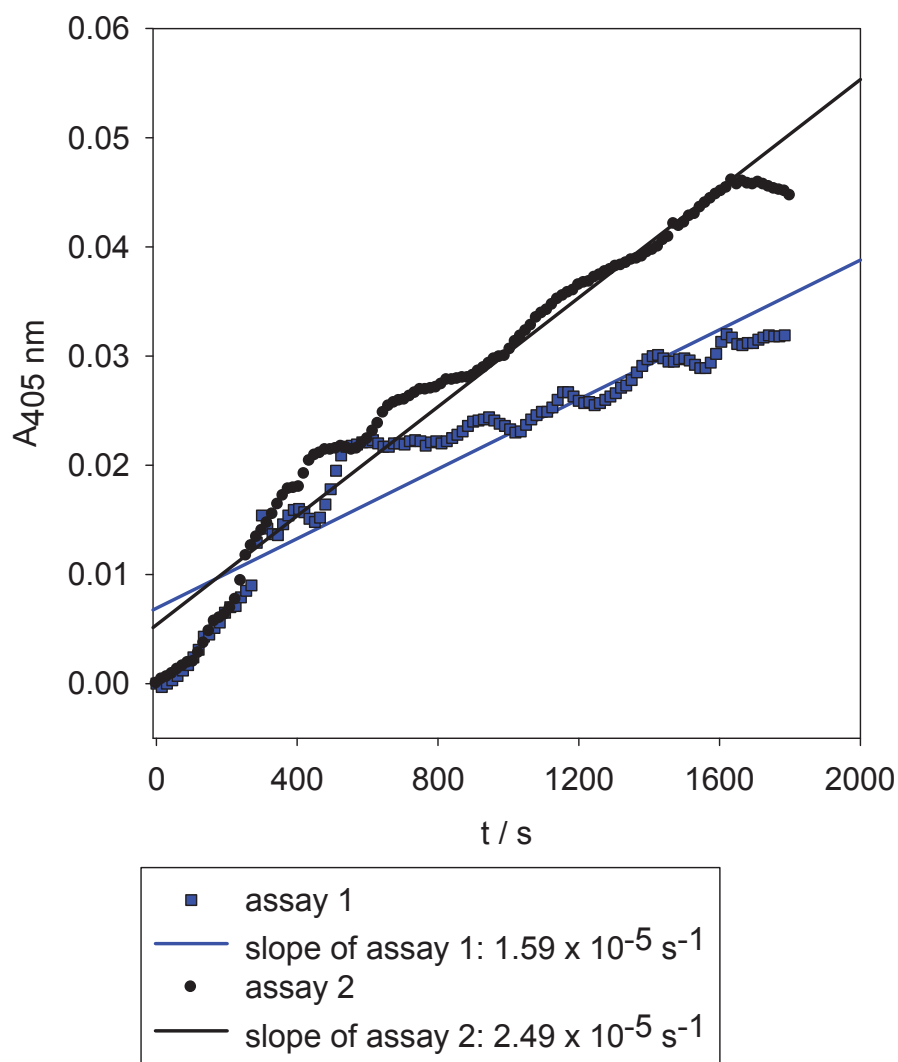


Figure 7. Evolution of the absorbance at 405 nm of a $(\text{PLL-HA})_{15}$ film loaded with the enzyme (AP) during 2h, with a $(\text{PDADMAC-PSS})_2$ capping layer and put successively in a 3 mM PNP containing Tris-NaCl buffer, for the first (\blacksquare) and the second (\bullet) measurement. The lines correspond to linear regressions to the experimental data. The slopes of these lines are given in the inset.

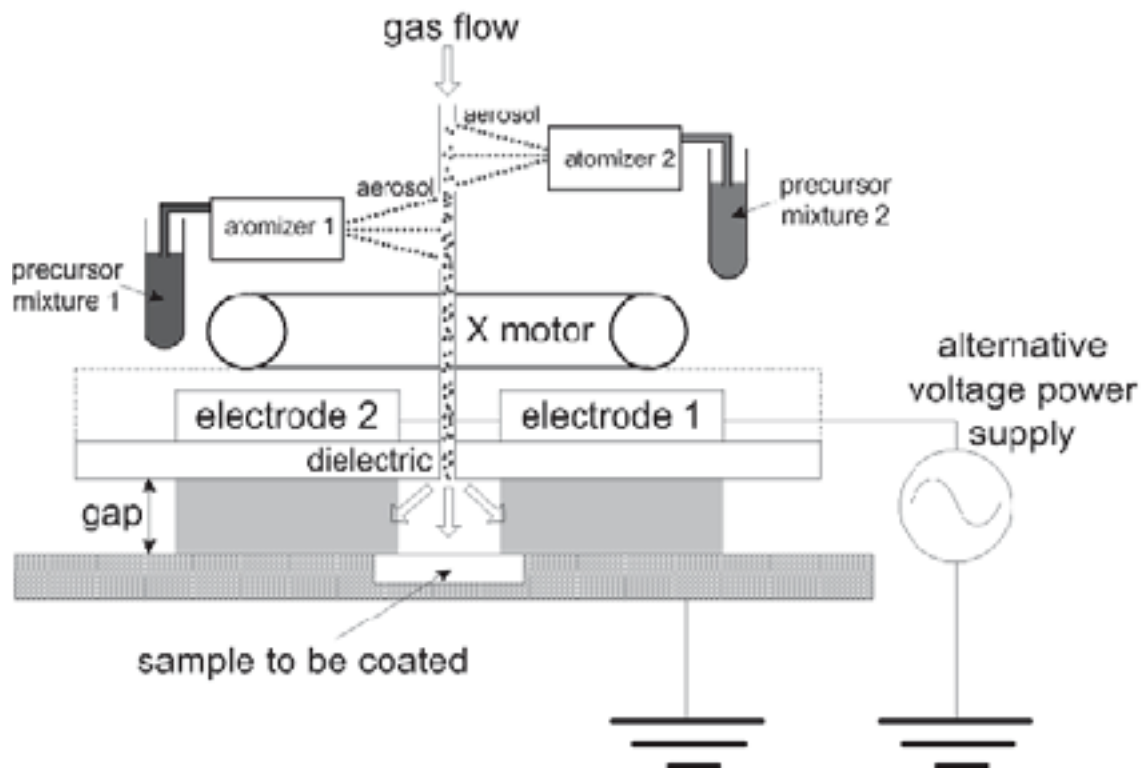


Figure 8. Representation of the dynamic Atmospheric Pressure Plasma Dielectric Barrier Discharges (APDBD) open air reactor used in this investigation.

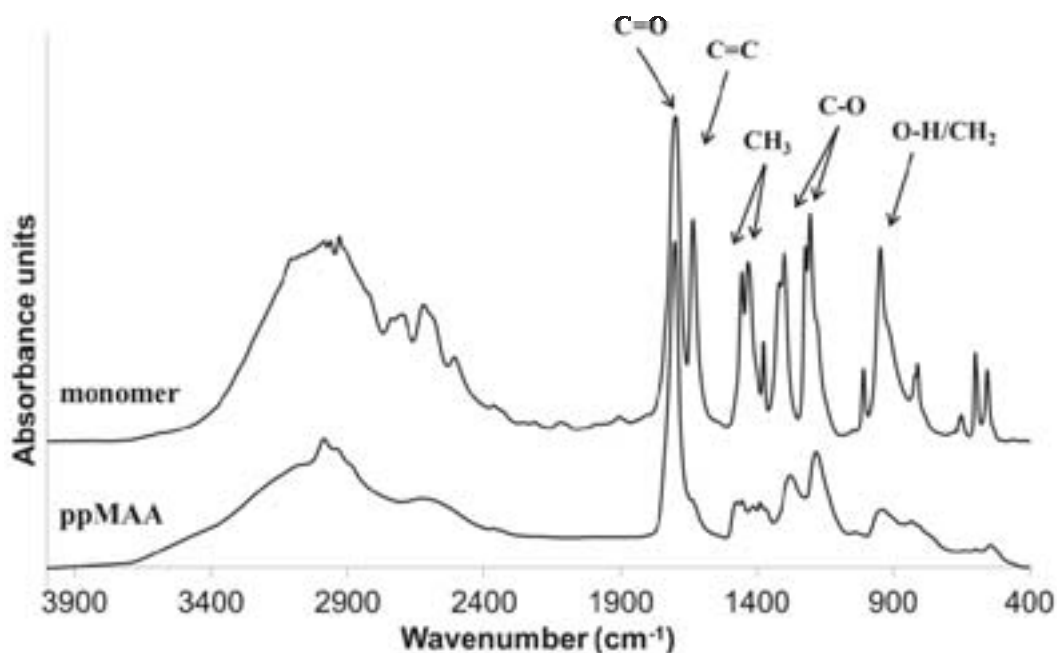


Figure 9. FTIR spectra acquired in the transmission mode for plasma polymer films made from MAA. The FTIR spectrum of the monomer is displayed as a reference. The spectra are up-shifted for clarity.

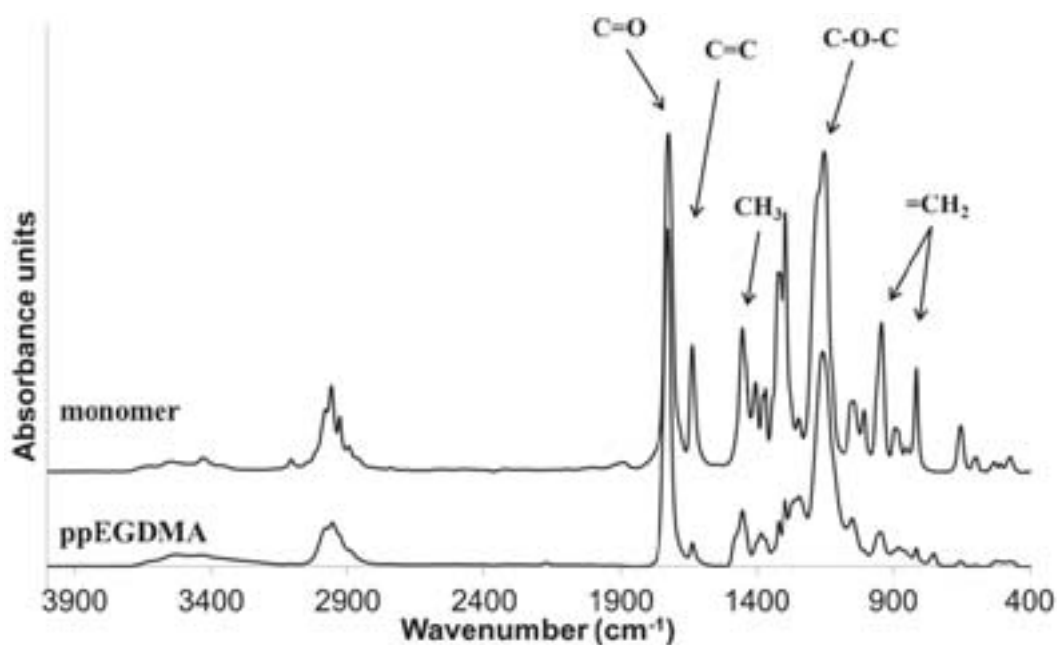


Figure 10. FTIR spectra acquired in the transmission mode for plasma polymer films made from EGDMA. The FTIR spectrum of the monomer is displayed as a reference. The spectra are up-shifted for clarity.

a	Wavenumber (cm⁻¹)	Vibration	b	Wavenumber (cm⁻¹)	Vibration
	3600	O-H stretch		2900 - 3100	C-H stretch
	3000	CH ₂ stretch		1725	C=O stretch
	2970	CH ₃ stretch		1640	C=C stretch
		(antisymmetric)		1450	CH ₃
	2940	CH ₃ stretch			antisymmetric
		(symmetric)			bend
	1700	C=O stretch		1370	CH ₃ symmetric
	1640	C=C stretch			bend
	1450	CH ₃ antisymmetric deformation		1295 and 1315	C-O-C stretch
					antisymmetric
	1379	CH ₃ symmetric deformation		1045 and 1150	C-O-C stretch
					symmetric
	1362	C-O-H bend		940	=CH ₂ wag
	1290	C-O stretch		814	=CH ₂ twist
	1175	C-O stretch			
	930 - 945	=CH ₂ wag or OH bend			

Table 3. Assigned bands of FTIR spectra for (a) ppMAA and (b) ppEGDMA.

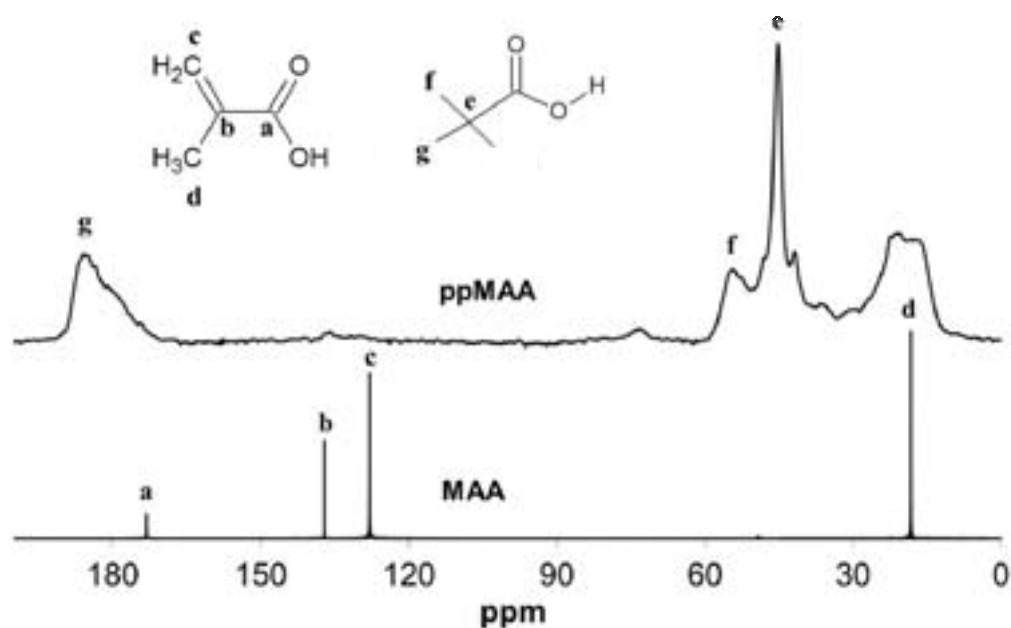


Figure 11. ^{13}C CPMAS spectra of plasma polymer made from MAA. The spectrum of the monomer is displayed as a reference. The different carbon atoms are assigned in the inset. The spectra are up-shifted for clarity.

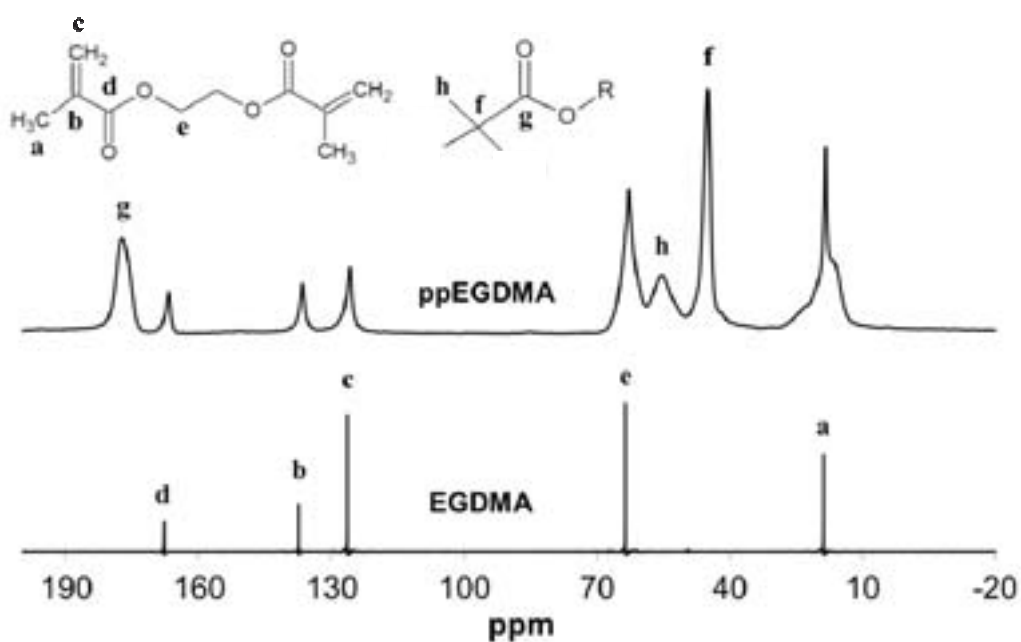


Figure 12. ^{13}C CPMAS spectra of plasma polymer made from EGDMA. The spectrum of the monomer is displayed as a reference. The different carbon atoms are assigned in the inset. The spectra are up-shifted for clarity.

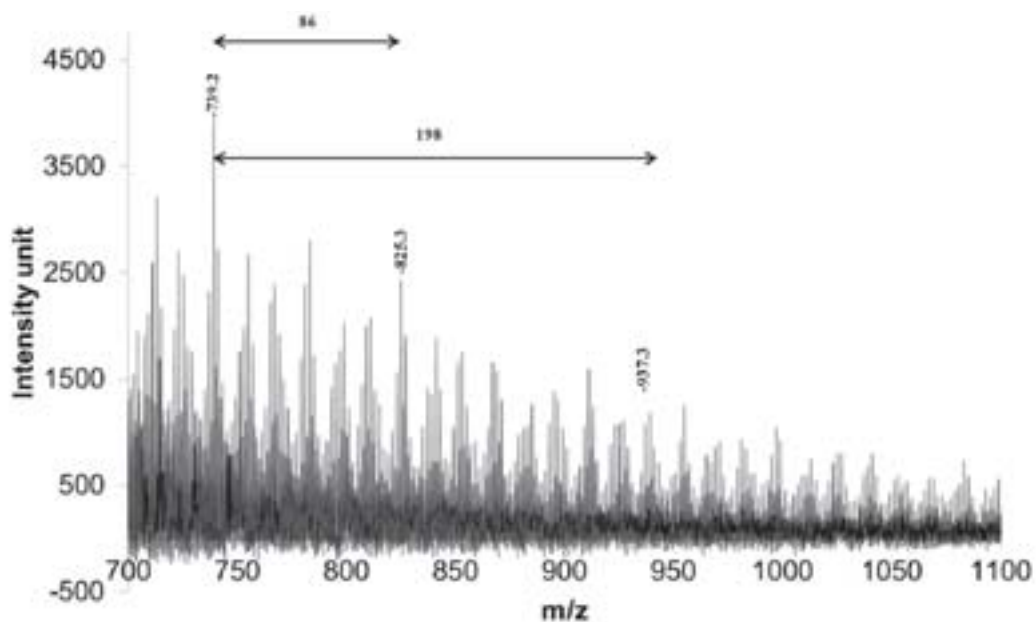


Figure 13. MALDI-TOF mass spectra corresponding to the structure of the plasma polymer made of EGDMA and MAA.

X	y	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺	x	y	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺
8	0	713.2	729.2	8	1	911.3	927.3
6	1	739.2	755.2	6	2	937.3	953.3
4	2	765.2	781.2	11	0	971.3	987.3
9	0	799.2	815.2	9	1	997.3	1013.3
7	1	825.3	841.2	12	0	1057.3	1073.3
5	2	851.3	867.3	10	1	1083.4	1099.3
10	0	885.3	901.2				

Table 4. Possible assignments for different mass peaks obtained with MALDI-TOF for plasma polymer made of EGDMA and MAA.

Conclusion Générale

Ce travail transversal, associant la chimie, la physico-chimie et les procédés d'élaboration de couches minces, avait notamment pour objectif l'élaboration et l'étude de nouvelles surfaces fonctionnalisées pour la création de la couche active d'un biocapteur mais aussi, pour la création de systèmes à libérations contrôlées.

Par rapport aux approches conventionnelles de modification de traitement de surface, la méthode retenue dans le cadre de ce travail de doctorat consistait à polymériser un précurseur par l'intermédiaire d'espèces réactives présentes dans un plasma (polymérisation plasma).

En effet, comme on l'a montré, cette méthode de polymérisation possède un certain nombre d'avantages par rapport aux méthodes conventionnelles. Elle permet de réduire la durée de préparation des films de façon significative. Les propriétés des films obtenus peuvent être contrôlées en fonction des paramètres opératoires appliqués. Ceci présente un certain nombre d'avantages dans la voie d'une éventuelle et future industrialisation pour la production de ces systèmes.

Cette étude est structurée en quatre parties distinctes et complémentaires qui s'appuient sur un grand nombre de résultats et d'interprétations :

- La première partie a permis de mettre en évidence, la possibilité d'obtenir des films dont la quantité de groupements fonctionnels pouvait être modifiée en fonction des paramètres opératoires et du précurseur utilisé. Cette partie a montré les résultats concernant le développement des outils dédiés à la caractérisation des films polymères obtenus par polymérisation plasma.
- La partie 2 a montré l'intérêt d'ajouter un agent réticulant lors de la phase de polymérisation pour l'obtention d'un support permettant l'immobilisation d'enzymes, pour éventuellement être utilisé dans le cadre d'une application capteur.
- La troisième partie met en évidence la possibilité de créer des systèmes barrières à la libération d'enzymes par procédé plasma à pression atmosphérique.
- La dernière partie présente une méthode originale d'obtention de films plasma polymère dans lequel une molécule d'intérêt (médicament) a directement été enfouie durant la phase de polymérisation par plasma.

Un certain nombre de travaux de la littérature ont montré qu'il était possible d'obtenir une surface riche en groupements carboxylique en utilisant l'acide acrylique comme précurseur lors de la phase de déposition. A partir de ces résultats et dans nos conditions d'expérience, nous nous sommes proposés d'étudier des films obtenus à l'aide de deux précurseurs susceptibles de fournir les groupements intéressants pour les applications que nous avons visées, à savoir les systèmes à libération contrôlée de médicaments, et la création de la couche active du biocapteur. Cette étude a permis de mettre en évidence l'influence de certains paramètres opératoires (puissance, concentration en précurseur et temps de déposition) liés entre eux par le paramètre de Yasuda qui correspond à l'énergie appliquée par unité de monomère, sur la structure chimique, la morphologie ou encore la préservation des groupements fonctionnels des films obtenus. Différents outils de caractérisation ont été utilisés. Parmi eux, la spectrométrie de photoélectron X couplé à un marquage chimique nous a permis de déterminer la proportion de groupements carboxyliques après la phase de déposition. En effet, dans le cas de l'acide acrylique et méthacrylique, il est souvent difficile de distinguer les groupements carboxyliques de ceux de l'ester après polymérisation plasma. Il est alors nécessaire de procéder à un marquage spécifique. C'est ainsi que la proportion de groupements à l'extrême surface des films a pu être étudiée en fonction des paramètres opératoires. Il a de plus, été mis en évidence, qu'à partir de ce genre de précurseur, les films obtenus apparaissent instables en milieu aqueux menant à une solvatation complète. Il a donc fallu trouver un moyen de stabiliser et de rigidifier les films afin d'atteindre l'objectif que nous nous étions fixés. La stratégie de stabilisation a été d'ajouter au précurseur de départ un agent réticulant. Ce dernier avait pour rôle de stabiliser la matrice et d'améliorer le contrôle du nombre de groupements fonctionnels présents dans le film.

En utilisant la méthode de Shushi Sano et al., il a ainsi été montré que des films sensibles au pH pouvaient être obtenus. En effet, la fixation du colorant avec les groupements fonctionnels se fait via des interactions électrostatiques et n'est effective que lorsque la solution est à pH suffisamment acide (< 4) pour dé-protoner les groupements carboxyliques présents dans le film. Une fois obtenu, ces films ont montré une interaction certaine avec des molécules actives telles que la phosphatase alcaline (enzyme).

Ces enzymes, une fois immobilisées au sein du film plasma polymère devaient constituer un système de réservoirs, contenant des molécules actives et capables d'être utilisées comme couche active dans le cadre d'applications de types biocapteurs. La distribution des enzymes dans la matrice plasma s'est avérée être homogène dans tout le volume et la conformation des enzymes conservées. Les tests enzymatiques ont révélés une limitation au système. En effet

lors de tests successifs, une diminution de la vitesse d'hydrolyse du PNP a été observée liée à la désorption des enzymes. Une barrière spécifique a alors été élaborée afin de limiter la diffusion des enzymes tout en laissant passer le substrat enzymatique. Les barrières obtenues par plasma à partir d'EGDMA se sont alors révélées être une bonne alternative aux barrières obtenues par la méthode du 'couche par couche'. En effet, il est possible de déposer rapidement et en une seule étape, des barrières dont les propriétés peuvent être ajustées en fonction de l'environnement dans lequel va évoluer le système.

La dernière étude de ce travail de doctorat a été consacrée à l'optimisation d'une méthode permettant 'd'enfouir' des molécules d'intérêt dans des matrices polymères plasma dans le but de les libérer de façon lente et progressive dans un environnement donné (libération contrôlée). Pour se rapprocher de cet objectif, nous avons décidé de modifier la méthode de préparation utilisée précédemment en conservant toutefois les différents précurseurs déjà étudiés. Des travaux publiés récemment avaient montré qu'il était possible de piéger des molécules actives par polymérisation plasma à pression atmosphérique. Il a alors été imaginé que la molécule d'intérêt pouvait durant la phase de déposition, être protégée par les molécules de précurseurs présent dans la solution de départ.

Les films obtenus ont présentés une bonne préservation des différents groupements spécifiques à chaque espèce. L'acétaminophène introduit dans la zone plasma s'est trouvée alors piégée dans le film et sa libération pouvait se faire par simple immersion de l'échantillon dans une solution aqueuse avec néanmoins une quantité plus faible que celle introduite au départ.

Ce travail peut donc constituer un point de départ vers la mise au point de nouveaux types de matériaux à fonctionnalités multiples. Pour cela, d'autres études sont nécessaires afin d'améliorer les différents systèmes étudiés dans ce travail de doctorat.

Une étude des propriétés mécaniques des copolymères obtenus apparait indispensable pour obtenir l'information sur le comportement des films (gonflement), principalement au contact d'une solution aqueuse. On pourrait de plus imaginer remplacer dans le 'copolymère plasma' l'acide méthacrylique par d'autre type de précurseur (voir chapitre 1) tel que le PNIPAAm. Ceci permettrait, dans un premier temps, d'obtenir des films sensibles à d'autres stimuli, voire plusieurs stimuli en additionnant les précurseurs avec l'agent réticulant. Le changement de précurseur pourrait aussi permettre une meilleure sélectivité face à d'autres types de

biomolécules (enzymes, protéines, cellules ...) ce qui permettrait d'obtenir des capteurs spécifiques à un ou plusieurs types de biomolécules.

Pour finir, la dernière partie a présenté les résultats concernant la libération de molécule piégée dans une matrice plasma polymère. Ce dernier article montre un nouveau concept qui nécessite davantage d'investigations afin de répondre aux nombreuses questions qui restent sans réponse. A savoir le rôle du solvant dans le mécanisme de polymérisation, le comportement de l'acétaminophène dans le plasma, l'influence des paramètres opératoires ainsi que la proportion des espèces introduites dans le plasma sur le film final... Il serait aussi intéressant d'imaginer dans le but d'améliorer la préservation de la molécule lors de la phase de déposition, de créer une capsule 'sacrificielle' qui jouerait le rôle de protecteur. Autant d'investigations qui pourraient permettre d'améliorer le concept et ainsi permettre son éventuelle adaptation à grande échelle.

Références Bibliographiques

1. Tonks, L. and I. Langmuir, *Physical Review*, 1929. **23**: p. 195-211.
2. Tendero, C., et al., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2006. **61**: p. 2-30.
3. Kogelschatz, U., *plasma chemistry and plasma processing*, 2003. **23**: p. 1-46.
4. Bogaerts, A., et al., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2002. **57**: p. 609-658.
5. Brétagnot, F., et al., *Plasma Processes and Polymers*, 2006. **3**: p. 443-455.
6. Peppas, N.A. and J. Klier, *Journal of controlled release*, 1991. **16**: p. 203-214.
7. Jie-Rong, C., W. Xue-Yan, and W. Tomiji, *journal of Applied Polymer Science*, 1999. **72**: p. 1327-1333.
8. Lai, J., et al., *Applied Surface Science*, 2006. **252**: p. 3375-3379.
9. Katoa, K., et al., *Progress in Polymer Science*, 2003. **28**: p. 209-259.
10. Schmaljohann, D., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006. **58**: p. 1655-1670.
11. Pelton, R., *advances in Colloid and Interface Science*, 2000. **85**: p. 1-33.
12. Gupta, P., K. Vermani, and S. Garg, *research focus*, 2002. **7**: p. 569-579.
13. Zhang, W., et al., *macromolecules*, 2005. **38**: p. 5743-5747.
14. Wei, H., et al., *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007. **83A**: p. 980-989.
15. Hales, M., et al., 2004. **20**: p. 10809-10817.
16. Chung, J.E., et al., *Journal of controlled release*, 1999. **62**: p. 115-127.
17. Wei, H., et al., *Biomaterials*, 2007. **28**: p. 99-107.
18. Kramer, M., et al., *Angewandte Chemie International Edition*, 2002. **41**: p. 4252-4256.
19. Amalvy, J.I., et al., *langmuir*, 2004. **20**: p. 8992-8999.
20. Hsiue, G.-H., J.-A. Guu, and C.-C. Cheng, *Biomaterials*, 2001. **22**: p. 1763-1769.
21. Tokarev, I. and S. Minko, *Advanced Materials*, 2010. **22**: p. 3446-3462.
22. Bawa, P., et al., *Biomaterials*, 2009. **4**: p. 1-15.
23. Ganta, S., et al., *journal of controlled release*, 2008. **126**: p. 187-204.
24. Murdan, S., *journal of controlled release*, 2003. **92**: p. 1-17.
25. Han, G., et al., *Angewandte Chemie International Edition*, 2006. **45**: p. 3165-3169.
26. Choi, S.K., et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012. **20**: p. 1281-1290.
27. Stuart, M.A.C., *nature materials*, 2010. **9**: p. 101-113.
28. stuart, m.a.C., et al., *Nature materials*, 2010. **9**: p. 101-113.
29. Dusek, K. and D. Patterson, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 1968. **6**: p. 1209-1216.
30. Peppas, N.A. and J.J. Sahlin, *biomaterials*, 1996. **17**: p. 1553-1561.
31. Davis, K.A. and K.S. Anseth, *critical reviews in Therapeutic Drug carrier systems*, 2002. **19**: p. 385-423.
32. Hennink, W.E., et al., *International Journal of Pharmaceutics*, 2004. **277**: p. 99-104.
33. Xiao, C. and M. Yang, *Carbohydrate Polymers*, 2006. **64**: p. 37-40.
34. Jong, S.J.d., et al., *Journal of controlled release*, 2001. **71**: p. 261-275.
35. Plunkett, K.N., et al., *macromolecules*, 2003. **36**: p. 3960-3966.
36. Hennink, W.E. and C.F.v. Nostrum, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002. **54**: p. 13-36.
37. Xu, S., Y. Luo, and R. Haag, *Macromolecular Rapid Communications*, 2008. **29**: p. 171-174.
38. Herlambang, S., et al., *journal of controlled release*, 2011. **155**: p. 449-457.
39. Kojima, C., et al., *Macromolecules*, 2003. **6**: p. 2183-2186.
40. Boas, U. and P.M.H. Heegaard, *Chemical Society Reviews*, 2004. **33**: p. 43-63.
41. Matsumoto, S., et al., *Biomacromolecules*, 2009. **10**: p. 119-127.

42. Heineman, W. and W. Jensen, *Biosensors and Bioelectronics*, 2006. **21**: p. 1403-1404.
43. DENNISON, M.J. and A.P.F. TURNER, *Biotechnology Advances*, 1995. **13**: p. 1-12.
44. Sadana, A. and A.M. Beelaram, *Biosensors and Bioelectronics*, 1995. **10**: p. 301-316.
45. Jiménez, C., et al., *sensors and Actuators B: Chemical*, 1995. **26-27**: p. 421-424.
46. Grieshaber, D., et al., *sensors*, 2008. **8**: p. 1400-1458.
47. Atashbar, M., et al., *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2005. **107**: p. 945-951.
48. Akimoto, T., S. Wada, and I. Karube, *Analytica Chimica Acta*, 2008. **610**: p. 119-124.
49. Harborn, U., et al., *Clinica Chimica Acta*, 1997. **267**: p. 225-237.
50. Sellergren, B. and C. Allender, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005. **57**: p. 1733-1741.
51. Iyer, P.V. and L. Ananthanarayan, *Process Biochemistry*, 2008. **43**: p. 1019-1032.
52. Vo-Dinh, T. and B. Cullum, *Journal of analytical chemistry*, 2000. **366**: p. 540-551.
53. Jung, S.-Y., et al., *Journal of american chemical society*, 2003. **125**: p. 12782-12786.
54. Banerjee, I., R.C. Pangule, and R.S. Kane, *Advanced Materials*, 2011. **23**: p. 690-718.
55. Sassolas, A., L.J. Blum, and B.D. Leca-Bouvier, *Biotechnology Advances*, 2011. **30**: p. 489-511.
56. Mousty, C., et al., *Electrochemistry Communications*, 2001. **3**: p. 727-732.
57. Andreescu, S. and J. Marty, *Biomolecular Engineering*, 2006. **23**: p. 1-15.
58. Choi, H., M. Kim, and W. Lee, *Analytica Chimica Acta*, 2005. **537**: p. 179-187.
59. Azmi, N.E., et al., *Analytical Biochemistry*, 2009. **388**: p. 28-32.
60. Rubianes, M.a.D. and G.A. Rivas, *Electrochemistry Communications*, 2003. **5**: p. 689-694.
61. Uang, Y.-M. and T.-C. Chou, *Biosensors and Bioelectronics*, 2003. **19**: p. 141-147.
62. Corgier, B., C. Marquette, and L. Blum, *Analytica Chimica Acta*, 2005. **538**: p. 1-7.
63. Choi, M.M.F., *Microchimica Acta*, 2004. **148**: p. 107-132.
64. Kondo, A. and H. Fukuda, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1998. **198**: p. 34-41.
65. Malmsten, M., *Journal of Colloid and Interface Science*, 1998. **207**: p. 186-199.
66. Carlsson, F., et al., *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004. **108**: p. 9871-9881.
67. Kato, K., S. Sano, and Y. Ikada, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1995. **4**: p. 221 - 230.
68. Yonemori, Y., et al., *Analytica Chimica Acta*, 2009. **633**: p. 90-96.
69. Luo, P., et al., *Forensic Science International*, 2008. **179**: p. 192-198.
70. Shen, J. and C.-C. Liu, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007. **120**: p. 417-425.
71. Rahman, M., M. Shiddiky, and Y. Shim, *Analytical Biochemistry*, 2009. **384**: p. 159-165.
72. Arya, S., et al., *Analytical Biochemistry*, 2007. **363**: p. 210-218.
73. Castner, D.G. and B.D. Ratner, *Surface Science*, 2002. **500**: p. 28-60.
74. Rikberg, R., www.abo.fi/student/en/fysilangmuirblodgett.
75. Iler, R.K., *Journal of Colloid and Interface Science*, 1966. **21**: p. 569-594.
76. Decher, G., J.D. Hong, and J. Schmitt, *Thin Solid Films*, 1992. **210/211**: p. 831-835.
77. Decher, G., *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 1998. **3**: p. 32-39.
78. Hammond, P.T., *AIChE Journal*, 2011. **57**: p. 2928-2940.
79. Deng, J., et al., *Progress in Polymer Science*, 2009. **34**: p. 156-193.
80. XING, C.-M., J.-P. DENG, and W.-T. YANG, *Polymer Journal*, 2002. **34**: p. 801-808.
81. Muhlhan, C., et al., *Surface and Coatings Technology*, 1999. **116-119**: p. 783-787.
82. CARLOTTI, S. and A. MAS, *Journal of Applied Polymer Science*, 1998. **69**: p. 2321-2330.
83. Friedrich, J.F., R. Mix, and G. Kühn, *Surface and Coatings Technology*, 2005. **200**: p. 565-568.

84. Landgraf, R., et al., *Procedia Chemistry*, 2009. **1**: p. 1015-1018.
85. Liu, J., J. Hong, and L. Cui, *Acta Mechanica Sinica*, 2007. **23**: p. 699-706.
86. Iwasaki, Y., et al., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2007. **57**: p. 226-236.
87. Collaud Coen, M., et al., *Applied Surface Science*, 2003. **207**: p. 276-286.
88. Lei, Y. and K. Mosbach, *Chemistry of Materials*, 2008. **20**: p. 859-868.
89. Rajasekaran, P., et al., *Plasma Processes and Polymers*, 2010. **7**: p. 665-675.
90. Massines, F. and G. Gouda, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 1998. **31**: p. 3411-3420.
91. Yokoyama, T., et al., *Journal of Physics D: Applied Physics*, 1990. **23**: p. 1125-1128.
92. Massines, F., R. Messaoudi, and C. Mayoux, *Plasma and Polymers*, 1998. **3**.
93. Willner, I., B. Willner, and E. Katz, *Bioelectrochemistry*, 2007. **70**: p. 2-11.
94. Fleisher, R.L., P.B. Price, and R.M. Walker, University of California Press, Berkeley, 1975. **626**.
95. Premkumar, P.A., et al., *Plasma Processes and Polymers*, 2010. **7**: p. 635-642.
96. Kroger, D., et al., *Biosensors and Bioelectronics*, 1999. **14**: p. 155-161.
97. Ji, Y., et al., *Applied Surface Science*, 2009. **255**: p. 4575-4578.
98. Degeyter, N., et al., *Surface and Coatings Technology*, 2007. **201**: p. 7066-7075.
99. Suzuki, M., et al., *Macromolecules*, 1986. **19**: p. 1804-1808.
100. Lewis, G.T., et al., *Langmuir*, 2007. **23**: p. 10756-10764.
101. GUPTA, B., et al., *Journal of Applied Polymer Science*, 2001. **81**: p. 2993-3001.
102. Friedrich, J., *Plasma Processes and Polymers*, 2011. **8**: p. 783-802.
103. Reviakine, I. and A.R. Brisson, *Langmuir*, 2000. **16**: p. 1806-1815.
104. Reimhult, E., F. Höök, and B. Kasemo, *Langmuir*, 2003. **19**: p. 1681-1691.
105. Yasuda, H., ACADEMIC PRESS, 1985.
106. H.Yasuda, Marcel Dekker Inc, 2004.
107. Yasuda, H.K., *Plasma Processes and Polymers*, 2005. **2**: p. 293-304.
108. Sciarratta, V., et al., *Surface and Coatings Technology*, 2003. **174-175**: p. 805-810.
109. Alexander, M.R., P.V. Wright, and B.D. Ratner, *Surface and Interface Analysis*, 1996. **24**: p. 217-220.
110. Bour, J., et al., *Plasma Processes and Polymers*, 2008. **5**: p. 788-796.
111. Bour, J., et al., *Plasma Processes and Polymers*, 2010. **7**: p. 687-694.
112. RIVOAL, J.-C. and C. FRÉTIGNY, *Techniques de l'ingénieur*, 2005.
113. DUC, T.M., *Techniques de l'ingénieur*, 1998.
114. Chilkoti, A., B.D. Ratner, and D. Briggs, *Chemistry of Materials*, 1991. **3**: p. 52-61.
115. Orgill, M., B.L. Baker, and N.L. Owen, *Spectrochimica Acta Part A*, 1999. **55**: p. 1021-1024.
116. Fahmy, A., et al., *Plasma Processes and Polymers*, 2011. **8**: p. 147-159.
117. Trimpin, S., et al., *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 2001. **15**: p. 1364-1373.
118. Trimpin, S., et al., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2006. **17**: p. 661-671.
119. Sano, S., K. Kato, and Y. Ikada, *Biomaterials*, 1993. **14**: p. 817-822.
120. INRA, www.ifr87.cnrs-if.fr/pbc/equipement/confocaux/principe/principe2.html.
121. Weltmann, K.D., et al., *Pure and Applied Chemistry*, 2010. **82**.
122. Fanelli, F., *Surface and Coatings Technology*, 2010. **205**: p. 1536-1543.
123. Shi, F.F., *Surface and Coatings Technology*, 1996. **82**: p. 1-15.
124. Topala, I., N. Dumitrascu, and G. Popa, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2009. **267**: p. 442-445.
125. Wang, X., et al., *Surface and Coatings Technology*, 2010. **204**: p. 3047-3052.

126. Hamerli, P., *Biomaterials*, 2003. **24**: p. 3989-3999.
127. Harsch, A., et al., *Journal of Neuroscience Methods*, 2000. **98**: p. 135-144.
128. Chirokov, A., A. Gutsol, and A. Fridman, *Pure and Applied Chemistry*, 2005. **77**: p. 487-495.
129. Ward, L.J., et al., *Chemistry of Materials*, 2003. **15**: p. 1466-1469.
130. Alexander, M.R., et al., *Journal of Materials Chemistry*, 2004. **14**: p. 408-412.
131. Alexander, M.R. and T.M. Duc, *Journal of Materials Chemistry*, 1998. **8**: p. 937-943.
132. Hegemann, D., E. Körner, and S. Guimond, *Plasma Processes and Polymers*, 2009. **6**: p. 246-254.
133. Holländer, A., et al., *Plasma Processes and Polymers*, 2008. **5**: p. 345-352.
134. Giordanengo, R., et al., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2009. **20**: p. 25-33.
135. Wesdemiotis, C., et al., *Mass Spectrometry Reviews*, 2011. **30**: p. 523-559.
136. Alexander, M.R. and T.M. Duc, *Polymer*, 1999. **40**: p. 5479-5488.
137. Beck, A.J., et al., *Plasma Processes and Polymers*, 2005. **2**: p. 641-649.
138. Sarma, A.K., et al., *Biosensors and Bioelectronics*, 2009. **24**: p. 2313-2322.
139. Lee, J.Y., et al., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009. **59**: p. 274-278.
140. Sheldon, R.A., *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2007. **349**: p. 1289-1307.
141. Dutta, K., et al., *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008. **69**: p. 556-561.
142. Amine, A., et al., *Biosensors and Bioelectronics*, 2006. **21**: p. 1405-1423.
143. Heyse, P., et al., *Plasma Processes and Polymers*, 2011: p. 965-974.
144. Rusmini, F., Z. Zhong, and J. Feijen, *Biomacromolecules*, 2007. **8**: p. 1775-1789.
145. Gancarz, I., *European Polymer Journal*, 2003. **39**: p. 1615-1622.
146. Gancarz, I., *European Polymer Journal*, 2003. **39**: p. 2217-2224.
147. Srivastava, S., et al., *Journal of American Chemical Society*, 2008. **130**: p. 3748-3749.
148. Amorosi, C., et al., *Reactive and Functional Polymers*, 2012. **72**: p. 341-348.
149. Young, L.J., *Journal of Polymer Science*, 1961. **54**: p. 411-455.
150. Zhang, Z., et al., *Surface and Coatings Technology*, 2003: p. 588-590.
151. Amorosi, C., et al., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012. **97**: p. 124-131.
152. Malmsten, M., H. Bysell, and P. Hansson, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2010. **15**: p. 435-444.
153. Nassif, N., et al., *Nature Materials*, 2002. **1**: p. 42-44.
154. Lvov, Y., et al., *Journal of American Chemical Society*, 1995. **117**: p. 6117-6123.
155. Srivastava, S. and N.A. Kotov, *Accounts of Chemical Research*, 2008. **41**: p. 1831-1841.
156. Vodouhê, C., et al., *Biomaterials*, 2006. **27**: p. 4149-4156.
157. Sorrenti, E., et al., *The Journal of Physical Chemistry C*, 2011. **115**: p. 8148-8259.
158. Salloum, D.S. and J.B. Schlenoff, *Biomacromolecules*, 2004. **5**: p. 1089-1096.
159. Ball, V., et al., *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2009: p. 5115-5124.
160. Coche-Guérante, L., et al., *Electrochimica Acta*, 2005. **50**: p. 2865-2877.
161. Caseli, L., et al., *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006. **303**: p. 326-331.
162. Hashide, R., et al., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012. **89**: p. 242-247.
163. Jewell, C.M., et al., *Journal of Controlled Release*, 2005. **106**: p. 214-223.
164. Zhang, J. and D.M. Lynn, *Advanced Materials*, 2007. **19**: p. 4218-4223.
165. Schwinté, P., et al., *Biomacromolecules*, 2002. **3**: p. 1135-1143.
166. Mendez-Garza, J., et al., *Langmuir*, 2004. **20**: p. 7298-7302.
167. Hemmerlé, J., et al., *Langmuir*, 2005. **21**: p. 10328-10321.
168. Francius, G., et al., *The Journal of Physical Chemistry C*, 2007. **111**: p. 8299-8306.
169. Mertz, D., et al., *Nature Materials*, 2009. **8**: p. 731-735.
170. Kocgozlu, L., et al., *Journal of Cell Science*, 2010. **123**: p. 29-39.

171. Glinel, K., et al., *Langmuir*, 2004. **20**: p. 4898-4902.
172. Delajon, C., et al., *Langmuir*, 2005. **21**: p. 8509-8514.
173. Simovic, S., D. Losic, and K. Vasilev, *Chemical Communications*, 2010. **46**: p. 1317-1319.
174. Derbal, L., et al., *Biomacromolecules*, 2002. **4**: p. 1255-1263.
175. Picart, C., et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**: p. 12531-12535.
176. Ladam, G., et al., *Langmuir*, 2000. **16**: p. 1249-1255.
177. Ozin, G.A., *Advanced Materials*, 1992. **4**: p. 612.
178. Peppas, N. and R. Langer, *Science*, 1994. **263**: p. 1715-1720.
179. LaVan, D.A., T. McGuire, and R. Langer, *Nature Biotechnology*, 2003. **21**: p. 1184-1191.
180. Koo, O.M., I. Rubinstein, and H. Onyuksel, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2005. **1**: p. 192-212.
181. Li, Y.Y., F. Cunin, and J.R. Link, *Science*, 2003. **299**: p. 2045-2047.
182. Dalby, M.J., C.C. Berry, and M.O. Riehle, *Experimental Cell Research*, 2004. **295**: p. 387-394.
183. Couvreur, P., et al., *Nanocapsule Technology*, 2002. **19**: p. 99-134.
184. Lu, Y., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004. **56**: p. 1621-1633.
185. Frenot, A. and I.S. Chronakis, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2003. **8**: p. 64-75.
186. Li, Q., J.F. Quinn, and F. Caruso, *Advanced Materials*, 2005. **17**: p. 2058-2062.
187. Mishra, B., B.B. Patel, and S. Tiwari, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2010. **6**: p. 9-24.
188. Yan, W., et al., *Thin Solid Films*, 2009. **517**: p. 1794-1798.
189. Mendelsohn, J.D., C.J. Barret, and V.V. Chan, *Langmuir*, 2000. **16**: p. 5017-5023.
190. Favez, D., et al., *European Cells and Materials*, 2002. **3**: p. 20-21.
191. D'Sa, R.A. and B.J. Meenan, *Langmuir*, 2010. **26**: p. 1894-1903.
192. Benitez, F., E. Martinez, and J. Esteve, *Thin Solid Films*, 2000. **377 - 378**: p. 109-114.
193. Hegemann, D., H. Brunner, and C. Oehr, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2003. **208**: p. 281-286.
194. Siow, K.S., et al., *Plasma Processes and Polymers*, 2006. **3**: p. 392-418.
195. Hu, X., et al., *Thin Solid Films*, 2005. **477**: p. 81-87.
196. YUAN, Y., et al., *Chinese Chemical Letter*, 2005. **16**: p. 1641-1644.
197. Pan, Y.V., et al., *Biomacromolecules*, 2001. **2**: p. 32-36.
198. McNeill, I.C., S. Ahmed, and L. Memetea, *Polymer Degradation and Stability*, 1994. **47**: p. 423-433.
199. Sibrian-Vazquez, M. and D.A. Spivak, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2004. **42**: p. 3668-3675.
200. Ramos, M.L., J.F. Tyson, and D.J. Curran, *Analytica Chimica Acta*, 1998. **364**: p. 107-116.

***Polymérisation par plasma
froid : un outil pour
l'obtention de surfaces
fonctionnalisées pour les
applications de type
biocapteur et pour les
systèmes à libération de
médicaments***

Résumé

La réponse biologique d'un matériau est essentiellement reliée à sa surface : cela souligne l'importance du rôle des techniques de modification de surface dans la réalisation d'une réponse biologique adaptée. Ainsi les surfaces fonctionnalisées par des 'hydrogels' minces possèdent un énorme potentiel dans diverses applications. En effet, les hydrogels sensibles au pH et à la température peuvent être utilisés dans le but de libérer de façon contrôlée une molécule dans l'environnement biologique. Ces hydrogels peuvent aussi être utilisés en tant que biocapteur de par leurs fonctions disponibles permettant la reconnaissance spécifique de biomolécules cibles. Différents procédés, choisis principalement en fonction du type de matériau et de la surface à fonctionnaliser, peuvent être utilisés pour l'obtention de ce genre de films. Parmi ces procédés, le choix s'est tourné vers l'utilisation de la polymérisation par plasma dont les propriétés de surfaces peuvent être ajustées en fonction des paramètres de la décharge tel que la puissance électrique, le temps de traitement, la composition et la pression du gaz.

Plasma à pression atmosphérique, Décharge à Barrière Diélectrique, Hydrogel, Yasuda

For various industrial applications, there is an urgent need to obtain cost effective coatings having the desired functional groups. Among such methods, dielectric barrier discharge (DBD) at atmospheric pressure makes it possible to modify the physical properties and the chemical composition of various substrates. It is possible to control the chemical nature of the resulting plasma polymer by using appropriate plasma parameters to provide homogeneous and pinhole free films with good surface coverage and preservation of the functional groups present in the used monomers. In this way different articles show the possibility of using plasma deposition to obtain coatings with different chemically reactive moieties widely used for applications in sensor technology and in life science. It has been established that through the control of the plasma parameters it is possible to produce plasma polymers coatings from acrylic acid with a high fraction of carboxylic functionality retained from the monomer. In this way, atmospheric pressure plasma polymerization has been used to create coating able to be used as biosensor as well as drug delivery.

Atmospheric Pressure Plasma Polymerization, Yasuda, Drug Delivery, Biosensors, Alkaline Phosphatase