



HAL
open science

Surfaces polymères à Activité Enzymatique modulable

Maxime Artico

► **To cite this version:**

Maxime Artico. Surfaces polymères à Activité Enzymatique modulable. Polymères. INSA de Toulouse, 2023. Français. NNT : 2023ISAT0040 . tel-04475549

HAL Id: tel-04475549

<https://theses.hal.science/tel-04475549>

Submitted on 23 Feb 2024

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.



THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**
Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées de
Toulouse

**Présentée et soutenue par
Maxime ARTICO**

Le 26 octobre 2023

Surfaces polymères à Activité Enzymatique modulable

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Chimie Moléculaire**

Unité de recherche :

SOFTMAT - Chimie des colloïdes, polymères & assemblages complexes

TBI - Toulouse Biotechnology Institute - Bio & Chemical Engineering

Thèse dirigée par

Anne-Françoise MINGOTAUD et Cédric MONTANIER

Jury

M. Thierry MAUGARD, Rapporteur

M. Eric DUBREUCQ, Examineur

M. Frédéric PERUCH, Examineur

Mme Anne-Françoise MINGOTAUD, Directrice de thèse

M. Cedric MONTANIER, Co-directeur de thèse

Mme Martine MEIRELES, Présidente

« Celui qui n'avance pas recule »

Remerciements

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse Anne-Françoise Mingotaud et Cédric Montanier. Je viens probablement de vivre les 3 meilleures années de ma vie et ils en sont en partie responsables. D'une rigueur scientifique intraitable, ils ont aussi fait preuve d'une flexibilité hors norme dans leur management. Ils représentent tous deux un exemple pour moi, en particulier pour leurs qualités humaines. Je suis très heureux qu'ils ne soient plus mes encadrants aujourd'hui, car je peux enfin les considérer comme des amis.

Je veux aussi remercier Clément Roux qui a été associé de près à ce projet. C'est haut la main qu'il mérite le titre de meilleur chasseur de loup pour la période 2020 – 2023. Il a su me challenger par ses remarques ultra-pertinentes, pour ne pas dire ses tacles à la gorge les deux pieds décollés ! Je pense qu'il a eu un impact très significatif dans ma progression en termes de précision et de compréhension profonde de mon sujet.

Un grand merci à Frédéric Peruch qui a aussi été associé au projet et qui m'as accueilli au LCPO. Il a fait preuve d'une disponibilité et d'une patience tout à fait remarquable qui ont grandement facilités les différentes missions.

A ce stade je m'aperçois que les remerciements vont être très longs ... Vu le pavé qui vous attend après, ça ne doit pas être trop grave...

Je tiens à remercier Jeremy Mehats pour le temps qu'il a passé à me transférer ses protocoles et pour son accueil lors de mes déplacements. Pour continuer au LCPO, je tiens aussi à remercier tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin dans mes missions ultra-intenses pendant lesquelles je n'avais pas forcément les accès aux machine / produits et autres. Un grand merci donc à Sylvain, Lou, Romain, Maëva, Chloé et tous ceux que j'ai oublié de citer, il y en a certainement un paquet.

Cette thèse a aussi été l'occasion de travailler avec beaucoup de personnes extrêmement brillantes et bienveillantes. Merci donc à Nancy De Viguerie, Fabrice Collin, Cécile Formosa, Philippe Fioux, Arnaud Ponche et Caroline Topan.

Sans avoir pu travailler avec eux, j'ai quand même eu l'occasion de me marrer avec beaucoup de monde que ce soit aux TBI ou aux ex-IMRCP / Softlab (quel glow up !). Merci à Claire, Régis, Christophe, Christophe (encore !), Laure, Stéphane, CLS, JD, Alexandre, Juliette, Alexis, Liming, Faniry, Geoffrey, Théo, Théo (Encore aussi ! tu m'étonnes qu'on galère à retenir

les prénoms aussi...), Nico, Bérénice, Rémi, Solène, Maïke, Younes, Sarah, Emeline, Maxime (avec un nom pareil c'est forcément un champion), Donna-Joe, Victor, Julien, Mohammed, Albane, Elodie, Thibaud et Romain pour m'avoir donné l'occasion de rire au quotidien. Merci aussi à tous ceux que j'ai certainement zappé !

On pourrait se dire qu'à ce stade le tour des labos a été fait et qu'on est presque au bout... Il en reste encore quelques-uns !

Un grand merci à Orélia l'ancienne des IMRCP et Iker l'étoile montante du TBI qui ont organisé tout le pot de thèse et qui m'ont donné l'occasion de plonger mes mains dans un sac rempli de préservatifs devant toute ma famille et amis. Un moment aussi drôle pour moi que malaisant pour tout le reste de l'assemblée. Mais surtout merci pour tous ces moments mémorables et pour le soutien dans les moments plus compliqués. Il me tarde de venir voir le résultat de leurs travaux.

Merci aussi à tous ceux avec qui j'ai pu partager le bureau 3028. Manue, Tif', Sara, Camille, Judith et Mister Passini ! Le quotidien du thésard est beaucoup plus simple quand le travail se fait dans la bonne ambiance avec des personnes aussi brillantes !

Au tour de la famille et on aura fait un tour complet !

A ma mère qui m'a montré ce que sont la détermination et la combativité. Merci de m'avoir montré qu'il n'est jamais en option de se laisser aller ou de baisser les bras, peu importe les difficultés. Merci d'y avoir cru, souvent plus que moi-même, et de m'avoir soutenu tout au long du chemin.

A mon père, qui m'a enseigné la droiture et le travail acharné. Merci d'avoir mis en évidence qu'il est possible de travailler comme un marteau en conservant le sourire et la bonne ambiance. La photo d'un docteur en costard va remplacer celle d'un lycéen en T-shirt sur le bureau, ça a de la gueule quand même.

Merci à Jaco qui sans le savoir m'a donné les bribes d'un esprit de scientifique. Merci de m'avoir appris à m'émerveiller de tout, quitte à passer pour un comique, et surtout à essayer de tout comprendre, quitte à galérer un bon moment.

Merci à toute ma famille, où chaque membre a impacté ce que je suis aujourd'hui. Tous ont su mettre leurs différences de côté pour mon bien personnel. J'ai la chance d'avoir une famille nombreuse qui m'a soutenu, y a cru, et sur laquelle j'ai pu compter tout au long de mon

parcours. La famille aura été un avantage considérable tout au long de mon parcours. Merci donc à tous les membres de la grande équipe !

Comment parler de la famille sans citer Malika. Merci d'avoir trouvé la thèse ! Merci surtout de m'avoir inspiré toutes ces années à aller chercher plus que ce qui nous est promis. Côtayer tous les jours la personne la plus brillante que je connaisse aide forcément à progresser. J'ai la chance de rentrer tous les soirs dans un havre de paix où rien n'est plus important que le bien-être et le progrès en tant qu'équipe. Pas de Dupont sans un Ntamack !

Pour Zéphyr. Ici pas d'intellect hors du commun ni même d'inspiration à devenir meilleur. Merci de m'avoir réveillé tous les jours à 6 h 30 pétante. Grâce à ça, je savais que le réveil sonnerait dans 1 h.

Enfin, merci au gamin à lunettes qui doutait de tout mais surtout de lui. Pour s'être accroché quoi qu'il arrive et n'avoir jamais fait la moindre concession sur ses ambitions. Ça en valait la peine, et c'est que le début !

Résumé

L'exploitation de la biomasse végétale, bien que représentant une grande opportunité pour la production de molécules à haute valeur ajoutée ou de biocarburant, est très énergivore et reste très limitée en termes de rendement et de diversité des produits extraits. Pour contourner ces limites, une des possibilités est de s'inspirer de la nature. En effet, certains microorganismes expriment des cocktails complexes au sein de structure protéiques immobilisées à la surface externe de leur membrane, afin de déconstruire cette biomasse et de la métaboliser. Ce travail de thèse a pour objectif d'appréhender de manière originale une des questions soulevées lors de ces processus de déconstruction enzymatique d'un substrat complexe et insoluble : comment ces enzymes se comportent à l'interface solide/liquide et comment la proximité spatiale de ces enzymes impacte leur action ? Pour y répondre, nous avons développé une approche unique d'immobilisation d'enzymes sur une surface élastomère. Un étirement mécanique de cette surface permet alors de faire varier la densité surfacique en enzyme et donc la distance entre enzymes.

Dans une première partie, nous caractérisons l'ensemble des éléments utilisés dans ce projet. Tout d'abord, les quatre surfaces élastomères, synthétiques ou commerciales, utilisées pour l'immobilisation d'enzyme sont caractérisées à la fois au niveau moléculaire mais aussi au niveau de leur état de surface. Ensuite l'enzyme en question, une xylanase, est immobilisée sur les élastomères *via* un couple de protéines Jo et In, autorisant une immobilisation orientée et covalente. Il s'agit alors de s'assurer de l'activité de nos enzymes immobilisées

Une seconde partie de la thèse se focalise sur la fonctionnalisation des surfaces étudiée. Il est dans un premier temps mis en évidence que cette fonctionnalisation est nécessaire, puis la méthode appliquée est détaillée. Dans un dernier temps, nous indiquons la méthode de caractérisation développée pour mettre en évidence la fonctionnalisation des différentes surfaces.

La troisième partie de la thèse caractérise le greffage de protéine sur nos surfaces élastomères. Tout d'abord la protéine Jo. Son greffage est mis en place grâce à une réaction de Michael thiol-maléimide. Cette étape a nécessité la mise en œuvre d'un large éventail d'approches complémentaires afin de caractériser finement un processus complexe d'immobilisation d'une faible quantité de protéines en monocouche sur une surface lisse. Ensuite, la xylanase exprimée en fusion avec In, est greffée sur la surface par association covalente du couple Jo/In. Cette étape d'immobilisation est de nouveau caractérisée et une méthode de quantification développée spécifiquement dans ce projet permet alors de quantifier les enzymes immobilisées en surface.

La dernière partie de la thèse permet d'étudier l'effet de la distance entre les enzymes immobilisées sur leur activité spécifique. Les surfaces greffées, disposées sur un outil d'étirement spécifiquement développé au cours de ces travaux, ont été étirées dans des proportions croissantes, augmentant de fait la distance entre les enzymes. Nous mettons en évidence qu'une diminution de la densité des enzymes en surface, et donc une augmentation de la distance entre enzyme entraîne une augmentation proportionnée de leur activité spécifique, se rapprochant de celle des enzymes libres en solution. Nous pointons également les contraintes techniques de notre approche et proposons quelques solutions de développement afin d'exploiter au mieux le potentiel de notre stratégie.

Abstract

While the exploitation of plant biomass represents a great opportunity for the production of high value-added molecules or biofuels, it is very energy intensive and remains very limited in terms of yield and diversity of products extracted. One way to overcome these limitations is to look to nature for inspiration. Indeed, some microorganisms express complex cocktails within protein structures immobilized on the outer surface of their membranes in order to deconstruct and metabolize this biomass. The aim of this work is to provide an original approach to one of the questions raised by these processes of enzymatic deconstruction of a complex, insoluble substrate : how do these enzymes behave at the solid/liquid interface and how does their spatial proximity affect their action ? To answer these questions, we have developed a unique approach to immobilize enzymes on an elastomer surface. By mechanically stretching the surface, we can vary the surface density of the enzymes and thus the distance between them.

In the first part, we characterize all the elements used in this project. First, the four synthetic or commercial elastomer surfaces used for enzyme immobilisation are characterized both at the molecular level and in terms of their surface state. Then, the enzyme in question, a xylanase, is immobilized on the elastomers via a pair of Jo and In proteins, allowing oriented and covalent immobilisation. The aim is to ensure the activity of our immobilized enzymes. The second part of the thesis focuses on the functionalisation of the surfaces studied. First, the necessity of this functionalisation is highlighted, then the method used is described in detail. Finally, we describe the characterisation method developed to highlight the functionalisation of the different surfaces.

The third part of the thesis characterises the grafting of proteins onto our elastomer surfaces. First, the protein Jo. Its grafting is achieved by a Michael thiol-maleimide reaction. This step required the implementation of a wide range of complementary approaches to finely characterize a complex process involving the immobilisation of a small amount of protein in a monolayer on a smooth surface. The xylanase, expressed in fusion with In, is then grafted onto the surface by covalent association of the Jo/In pair. This immobilisation step will again be characterized and the enzymes immobilized on the surface will be quantified using a method developed specifically for this project.

The final part of the thesis investigates the effect of the distance between immobilized enzymes on their specific activity. The grafted surfaces, arranged on a stretching tool specifically developed during the course of this work, were stretched in increasing proportions, thereby increasing the distance between the enzymes. We show that a decrease of enzyme density on the surface, and therefore an increase in the distance between enzymes, leads to a proportional increase in their specific activity, approaching that of free enzymes in solution. We also highlight the technical limitations of our approach and propose some development solutions to exploit the full potential of our strategy.

Mots clés :

Chimie des polymères, chimie de surface, enzymologie, xylanase, elastomère, réaction de Michael.

Keywords :

Polymer chemistry, surface chemistry, enzymology, xylanase, elastomer, Michael reaction.

Publication :

Artico, M.; Roux, C.; Peruch, F.; Mingotaud, A.-F.; Montanier, C. Y. « Grafting of Proteins onto Polymeric Surfaces: A Synthesis and Characterization Challenge. » *Biotechnol. Adv.* **2023**, *64*, 108106. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108106>.

Brevet :

Demande en cours auprès de Toulouse Tech Transfer (TTT). Référence numéro I-23-2766

Communication :

Artico, M.; Roux, C.; Peruch, F.; Mingotaud, A.-F.; Montanier, C.Y. « Elastomeric stretchable surface to modulate enzymatic activity ». *Journées plénières du Groupe De Recherche BioIngénierie des Interfaces (GDR B2I)*, 22/09/2019.

REMERCIEMENTS	4
RESUME	7
ABSTRACT	8
LISTE DES FIGURES	1
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES ABREVIATIONS	14
INTRODUCTION	17
CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	22
A. SURFACES ELASTOMERES.....	22
1. GENERALITES	22
2. MODIFICATIONS CHIMIQUES DE POLYMERES	25
a) Synthèse d'élastomères	25
b) Modifications de polymères insaturés	27
I- Modifications de la chaîne polymère	27
II- Modification en bout de chaîne	29
3. CONCLUSION	30
B. MODIFICATION DE SURFACES POLYMERES	30
1. GENERALITES	30
2. MODIFICATION DE SURFACE POLYMERE PAR TRAITEMENT PLASMA	31
3. CONCLUSION	34
C. GREFFAGE DE PROTEINES ET D'ENZYMES EN SURFACE	35
1. GREFFAGE SUR SURFACES POLYMERES.....	35
2. GREFFAGE NON SPECIFIQUE	37
3. GREFFAGE AVEC REGIO- OU CHIMIO-SELECTIVITE	40
4. CARACTERISATION	42
a) Révéler la présence de protéines en surface	47
b) Discriminer l'adsorption du greffage et étudier l'orientation	48

c) Structure de la protéine immobilisée	48
d) Densité de greffage	49
e) Distribution des protéines en surface	49
f) Activité enzymatique	50
g) Techniques transversales	50
D. ESPACEURS	51
1. GENERALITES	51
2. Jo/IN.....	54
E. XYLANASE.....	56
1. GENERALITES	56
2. NPXYN11A	58
3. CONTROLE DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE ENZYMATIQUE	62
4. CONCLUSIONS BIBLIOGRAPHIQUES	65
<u>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES</u>	67

A. SURFACES POLYMERES ET MATERIEL BIOLOGIQUE.....	67
1. SYNTHESE DE SURFACES POLYBUTADIENE	67
a) Matériel	67
b) Méthodes	68
I- Etape 1 : PolyButadiène Aldéhyde Téléchélique (AT-PB)	68
II- Etape 2A : PolyButadiène TétraHydroxy Téléchélique (H4T-PB).....	69
III- Etape 3A : PolyButadiène TétraFurane Téléchélique (Fur ₄ T-PB)	69
IV- Etape 2B : Epoxy-PolyButadiène Aldéhyde Téléchélique (AT-EPB).....	70
V- Etape 3B : Hydroxy-PolyButadiène (OH-PB)	70
VI- Etape 3C : Maléimide isocyanate (Maléimide-NCO).....	71
VII- Etape 4B : PolyButadiène fonctionnalisé Maléimide (PB-Mal).....	72
VIII- Etape 5 : Elastomère de polybutadiène	73
2. SURFACES COMMERCIALES POLYISOPRENE ET SILICONE	74
3. BIOCHIMIE	74
a) Matériel	74
b) Méthodes	78
I- Milieux de culture	78
II- Milieu solide	78

III- Préparation des antibiotiques	78
IV- Préparation de l'IPTG	78
V- Transformation	79
VI- Préculture	79
VII- Préparation plasmidique	79
VIII- Digestion du plasmide par des enzymes de restriction.....	79
IX- Préparation d'un gel d'agarose.....	79
X- Dosage de l'ADN plasmidique.....	80
XI- Culture.....	80
XII- Purification des protéines	80
XIII- Gel d'électrophorèse SDS-PAGE.....	81
XIV- Mise en évidence de la réactivité des thiols contenus dans les protéines à l'aide d'une sonde maléimide.....	82
XV- Mesure de la concentration en protéines	82
XVI- Mesure d'activité enzymatique	82
XVII- Dessalage des protéines	82
4. FONCTIONNALISATION ET GREFFAGE SUR SURFACES ELASTOMERES	82
a) Matériel	82
b) Méthodes	83
I- Fonctionnalisation des surfaces par traitement plasma.....	83
II- Fonctionnalisation maléimide en surface	83
III- Greffage de Jo sur la surface fonctionnalisée avec maléimides	84
IV- Greffage de In-NpXyn11A sur la surface.....	85
B. CARACTERISATIONS	85
1. SURFACES POLYMERES.....	86
2. ETIREMENT DE LA SURFACE ET MONTAGE POUR TESTS D'ACTIVITE ENZYMATIQUE	86
3. ACTIVITES ENZYMATIQUE.....	90
a) Mesure chromogénique avec X ₃ .pNP	90
I- Enzymes libres en solution	90
II- Quantification des enzymes greffées en surfaces	90
III- Enzymes greffées sur des surfaces	91
b) Essai colorimétrique sur WAX	92
I- Enzymes libres en solution	92
II- Enzymes greffées sur des surfaces	92

CHAPITRE III : PRODUCTION ET CARACTERISATION DE SURFACES ELASTOMERES, DE PROTEINES ET D'ENZYMES **94**

A. FORMATION DE L'ELASTOMERE SYNTHETIQUE DE POLYBUTADIENE (PB).....	94
1. SYNTHESE DU PRECURSEUR POLYBUTADIENE FONCTIONNALISE FURANE EN BOUT DE CHAINE (FUR ₄ T-PB).....	95
2. SYNTHESE DU PRECURSEUR POLYBUTADIENE FONCTIONNALISE MALEIMIDE EN LONG ET EN BOUT DE CHAINE (PB-MAL)	98
3. REMISE EN FORME DE L'ELASTOMERE DE POLYBUTADIENE POUR OBTENIR UNE SURFACE PB	101
4. DISCUSSION	102
B. CARACTERISATION DES ELASTOMERES	104
1. CARACTERISATION DE LA NATURE CHIMIQUE DES SURFACES ELASTOMERES	104
a) Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	104
b) XPS (PB)	107
c) Taux de gonflement (PB)	108
2. CARACTERISATION DE L'ETAT DE SURFACE DES SURFACES ELASTOMERES	108
a) Microscopie optique	108
b) Microscopie électronique à balayage (MEB)	110
c) AFM	118
d) Angle de contact	120
e) Fluorimètre	120
3. CONCLUSIONS SUR LA CARACTERISATION DES SURFACES ELASTOMERES	121
C. CARACTERISATION DES PROTEINES ET ENZYMES	122
1. CARACTERISATION DES PROTEINES	123
a) Cinétique d'assemblage Jo/In	125
b) Réactivité des cystéines	125
(1) Formation de ponts disulfures inter-chaîne.....	126
(2) Réduction des ponts disulfures entre protéines Jo-Jo et In-In.	127
(3) Réactivité Cystéine-maléimide	129
c) Activité enzymatique de la xylanase <i>NpXyn11A</i>	131
2. CONCLUSIONS SUR LA CARACTERISATION DES PROTEINES ET ENZYMES UTILISEES DANS CE PROJET.....	133

CHAPITRE IV : FONCTIONNALISATION DE SURFACE **134**

A. TRAITEMENT PLASMA DES SURFACES ELASTOMERES	134
B. FONCTIONNALISATION MALEIMIDE	138
1. PRINCIPE.....	138
2. DEMONSTRATION DE LA FONCTIONNALISATION DES SURFACES ELASTOMERES AVEC DES FONCTIONS MALEIMIDES	140
3. QUANTIFICATION DES MALEIMIDES.....	144
a) Quantification des maléimides sur l'élastomère de polybutadiène avant traitement plasma et fonctionnalisation	144
b) Quantification des maléimides sur une surface élastomère PI après traitement plasma et fonctionnalisation	146

CHAPITRE V : GREFFAGE **149**

A. GREFFAGE DE PROTEINES	149
1. PRINCIPE.....	149
2. DETECTION DU GREFFAGE.....	151
a) Microscopie à épifluorescence	152
b) Quantification des protéines dans le surnageant	155
c) Mesure de la valeur de l'angle de contact	155
(1) Surface polybutadiène.....	157
(2) Surface polyisoprène.....	158
d) Surface PDMS	159
3. GREFFAGE DE IN	160
B. GREFFAGE DE L'ENZYME CHIMERIQUE IN-NpXYN11A	161
1. CARACTERISATION DU GREFFAGE DE IN-NpXYN11A EN SURFACE PAR SPECTROSCOPIE DE PHOTOELECTRONS INDUITS PAR RAYONS X (XPS).....	163
2. CARACTERISATION DU GREFFAGE DE IN-NpXYN11A EN SURFACE PAR MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE (AFM) EN MODE SPECTROSCOPIE DE FORCE.....	165
3. CARACTERISATION DU GREFFAGE DE IN-NpXYN11A EN SURFACE PAR MESURE D'ACTIVITE ENZYMATIQUE	170

CHAPITRE VI : ETUDE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES SPECIFIQUES **175**

A. VARIATION D'ACTIVITE ENZYMATIQUE SPECIFIQUE DUE AU GREFFAGE DES ENZYMES	
176	
B. EFFET DE LA DENSITE SURFACIQUE SUR L'ACTIVITE SPECIFIQUE DE IN-NpXYN11A ..	181
1. RELARGAGE D'ENZYMES IMMOBILISEES EN SURFACE DANS LE SURNAGEANT.....	181
2. ETIREMENTS DE SURFACE	187
a) Mesure d'activité des enzymes immobilisées sur des surfaces élastomères à base de polybutadiène (PB) en fonction de leur densité surfacique	187
b) Mesure d'activité des enzymes immobilisées sur des surfaces élastomères à base de polyisoprène (PI) en fonction de leur densité surfacique	192
I- Cinétiques successives sur une surface PI avec enzymes greffées en appliquant un gradient d'étirement à chaque cinétique.....	192
II- Cinétiques successives sur une surface PI avec enzymes greffées en alternant étirement et relaxation de la surface.....	197
III- Cinétiques successives sur une surface PI avec enzymes greffées avec plusieurs répétitions avec des taux d'étirement identiques.....	201
IV- Conclusion des expériences sur surface polyisoprène	205
c) Mesure d'activité des enzymes immobilisées sur des surfaces élastomères à base de polydiméthylsiloxane (PDMS) en fonction de leur densité surfacique	206
I- Cinétiques successives sur une surface PDMS avec enzymes greffées en appliquant un gradient d'étirement à chaque cinétique.....	206
II- Cinétiques successives sur une surface PDMS avec enzymes greffées en alternant étirement et relaxation de la surface.....	208
d) Mesure d'activité des enzymes immobilisées sur des surfaces élastomères à base de polydiméthylsiloxane renforcé avec des fibres de polyester (PDMSr) en fonction de leur densité surfacique	210
C. INTERPRETATION DES RESULTATS DU CHAPITRE	214

CONCLUSION ET PERSPECTIVES **217**

BIBLIOGRAPHIE **225**

Liste des figures

Figure 1 : Représentation graphique du système envisagé pour répondre aux problématiques du projet. Surface élastomère fonctionnalisée avec des maléimides. Addition de Michael entre un maléimide sur la surface et la fonction thiol de la cystéine contenue dans la séquence de Jo (en rouge) permettant le greffage covalent, spécifique et mono-point de la protéine. Assemblage Jo/In entre la protéine greffée sur la surface et le fragment In (en vert) produit en fusion avec l'enzyme NpXyn11A (en orange) permettant le greffage covalent, spécifique et mono-point de l'enzyme sur la surface. La surface est ensuite étirée pour faire varier les distances moyennes entre enzymes.	21
Figure 2 : Représentation des différentes matrices polymères. Illustration issue de Artico et al. ¹²	23
Figure 3 : Représentation de la déformation sous contrainte d'un réseau réticulé.	24
Figure 4 : Résistance à la déformation des différentes familles de polymères. ¹⁷	25
Figure 5 : Représentation des différentes liaisons présentes dans le polybutadiène	28
Figure 6 : Réactivité des fonctions époxyde en long de chaîne	28
Figure 7 : Modification des bouts de chaîne suite à une coupure oxydante avec mCPBA. A : Réduction. B et C : Aminations.....	29
Figure 8 : Représentation des produits du traitement plasma Ar + H ₂ O d'une surface PMMA. ⁶⁰	32
Figure 9 : Comparaison des effets de traitements plasma Argon ou Dioxygène sur la rugosité de surface, l'angle de contact, l'angle de contact suite à l'exposition à l'air et la résistance d'une surface conductive. ⁶⁵	34
Figure 10 : Réaction d'addition Michael thiol-maléimide, réarrangements et produits formés. ¹²⁰	40
Figure 11 : Méthodes applicables pour les différentes caractérisations associées au greffage d'enzyme en surface. ¹²	42
Figure 12 : Sur la gauche : X ₃ .pNP. Sur la droite : Acide 3,5-dinitrosalicyclique utilisé pour les « tests DNS ».....	50
Figure 13 : Mécanisme de formation d'une liaison isopeptidique.....	53
Figure 14 : A-Adhesine RrgA (<i>Streptococcus pneumoniae</i>) Jo en vert, In en rouge, adapté de Montanier et al. ⁷ B-Cinétique d'assemblage Jo/In à différentes températures détecté par fluorescence sur gel SDS-Page, donnée non publiée, C.Montanier, 2016.	55

Figure 15 : A : Représentation de la cinétique de Michaelis-Menten. ¹⁷¹ B : Equation de Michaelis-Menten. V_i : Vitesse initiale. V_{max} : Vitesse maximale. $[S]$: Concentration en substrat. K_M : Constante de Michaelis-Menten.	57
Figure 16 : Schéma d'un xylane modèle avec ses différents substituants possibles. ¹⁷⁹	59
Figure 17 : A : représentation de type Richardson (à gauche) et de surface (à droite) de la structure cristallographique de NpXyn11A (PDB 2C1F) dans le site catalytique de laquelle un xylohexaose (jaune et rouge) a été superposé à partir de la structure cristallographique de la xylanase 2 de <i>Trichoderma reesei</i> en complexe avec l'oligosaccharide (PDB 4HK8). Les deux résidus catalytiques E113 et E201 de NpXyn11A sont représentés en rouge. Les sous-sites catalytiques sont numérotés de -3 à +3, l'hydrolyse ayant lieu entre le site -1 et +1. La figure a été réalisée avec le logiciel de visualisation de structure PyMol (v0.99, DeLano Scientific). B : Mécanisme de rétention de configuration anomérique de la NpXyn11A.	61
Figure 18 : Mécanisme réactionnel permettant de doser les extrémités réductrices d'un sucre en solution grâce à la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique en acide 3-amino-5-nitrosalicylique.	62
Figure 19 : Résultats provenant de l'étude de Montanier et al. ⁷ A : Tableau indiquant les densités surfaciques en enzymes greffées obtenues sur différentes populations de billes. B : Schéma du greffage mis en place sur les billes. C : Quantités de xylooligosaccharides libérés après 5 h d'incubation en fonction des lots de billes utilisés et en utilisant pour contrôle des enzymes libres en solution.	64
Figure 20 : Schéma mettant en évidence le potentiel effet dénaturant d'un greffage multi-point d'une enzyme sur un support élastique au moment de l'étirement de celle-ci. A : Enzyme greffée de manière multi-point sur une surface élastomère avant/après étirement. B : Enzyme greffée de manière mono-point sur une surface élastomère avant/après étirement de celle-ci.	66
Figure 21 : Coupure oxydante du polybutadiène	68
Figure 22 : Fonctionnalisation en bout de chaîne de l'AT-PB.....	69
Figure 23 : Modification du H ₄ T-PB pour obtenir le Fur ₄ T-PB	69
Figure 24 : Epoxydation de l'AT-PB en long de chaîne pour obtenir l'AT-EPB.....	70
Figure 25 : Réduction des fonctions époxydes et aldéhydes de l'AT-EPB pour obtenir le OH-PB.....	70
Figure 26 : Modification de l'acide 6-maléimidohexanoïque pour obtenir le maléimide isocyanate.....	71
Figure 27 : Formation d'une liaison uréthane entre les fonctions alcools du OH-PB et les fonctions isocyanates du maléimide isocyanate pour obtenir le PB-Mal.....	72

Figure 28 : A : Moule de précision utilisé pour la remise en forme de l'élastomère à base de polybutadiène. B : Exemple de surface élastomère à base de polybutadiène obtenue suite à la remise en forme.	73
Figure 29 : A : Inhibition de l'expression du gène codant pour la protéine d'intérêt par l'expression du Lac I qui se fixe sur les promoteurs DE3 et T7. B : Levée de l'inhibition de l'expression du gène codant pour la protéine d'intérêt grâce à l'introduction en grande quantité d'IPTG neutralisant le Lac I.	77
Figure 30 : Rotaflow modifié sur mesure par un verrier. Diamètre de la pièce : 24,25 mm. Extrémité 1 : diamètre intérieur/extérieur de 4/6 mm. Extrémité 2 : Diamètre intérieur/extérieur de 8/10 mm. Longueur portion 3 : 5 cm. Longueur portion 4 : 7,5 cm.	87
Figure 31 : Montage de l'outil d'étirement. Diamètre de la pièce : 24,25 mm.	87
Figure 32 : Fixation de la surface sur l'outil d'étirement puis étirement de la surface. Diamètre de la pièce : 24,25 mm. Dans cet exemple, la surface étirée est un élastomère de polyisoprène.	88
Figure 33 : Montage pour mesure d'activité enzymatique sur des surfaces étirées. A : La surface à étudier est fixée au bout de la canule et la canule est plongée dans un réacteur contenant un barreau magnétique. Le réacteur est rempli avec une solution contenant le substrat étudié. B : Le réacteur est plongé dans un bûcher d'eau servant à réguler la température. C : L'ensemble est placé sur une plaque agitatrice thermorégulée.	89
Figure 34 : Gamme étalon représentant l'absorbance à 401 nm d'une solution incubée 30 min avec différentes concentrations d'enzyme In-NpXyn11A. La variation d'absorbance est due à l'hydrolyse du X ₃ .pNP par l'enzyme qui entraîne le relargage de para-nitrophénol en solution. La zone entre les pointillés rouges représente l'intervalle de confiance à 95 %.	91
Figure 35 : Etapes de synthèses pour obtenir les deux précurseurs PPB-Mal et Fur ₄ T-PB qui pourront être réticulés afin d'obtenir un élastomère à base de polybutadiène.	95
Figure 36 : Spectres RMN ¹ H du polybutadiène brut (en rouge) et de l'AT-PB obtenu après coupure oxydante (en bleu). L'intensité du spectre AT-PB est exacerbée afin de pouvoir visualiser le proton associé à la fonction aldéhyde. L'analyse est faite dans du CDCl ₃ à 400 MHz.	96
Figure 37 : Spectres RMN ¹ H du H ₄ T-PB (en rouge) et du Fur ₄ T-PB (en bleu). L'analyse est faite dans du CDCl ₃ à 400 MHz.	97
Figure 38 : : Spectres RMN ¹ H de l'AT-EPB (en rouge) et du OH-PB (en bleu). L'analyse est faite dans du CDCl ₃ à 400 MHz.	99
Figure 39 : Spectre RMN ¹ H du Maléimide-NCO fait dans du CDCl ₃ à 400 MHz.	100

Figure 40 : Spectre RMN ^1H du précurseur PB-Mal. Spectre réalisé dans du CDCl_3 à 400 MHz.	101
Figure 41 : A : Principe de la réaction de Diels Alder. B : Réaction de Diels Alder entre un furane et un maléimide pour former l'adduit exo (à gauche) ou endo (à droite).	102
Figure 42 : Précurseurs solubilisés dans du chloroforme. En haut : Précurseurs qui ne réticulent pas. En bas : Précurseurs capables de réticuler.	103
Figure 43 : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier des différentes surfaces utilisées dans le projet. En ordonnée : Absorbance. En abscisse : Longueur d'onde en cm^{-1}	105
Figure 44 : Analyse XPS de la surface PB performée par Dr. P. FIOUX à l'Institut de Science des Matériaux de Mulhouse	107
Figure 45 : Observation au microscope optique des différentes surfaces avec grossissement X20. Les barres représentent 100 μm . A / B : PI avant / après lavage. C / D : PDMSr avant / après lavage. E / F : PDMS avant / après lavage.....	109
Figure 46 : Images MEB de la surface polyisoprène. A/B : Surface rincée à l'eau. C/D : Surface lavée suivant le protocole indiqué plus haut (I.A.2, page 70). E/F : Surface lavée puis étirée cinq fois puis imagée sous sa forme relâchée. Les images A,C et E ont un grossissement X5 000. Les surfaces B,D et F ont un grossissement X10 000.....	111
Figure 47 : Spectre obtenu après analyse EDX des impuretés observées sur la surface PI ...	112
Figure 48 : Distribution des tailles de particules observées sur les surfaces PI imagées par MEB. A : Surface PI rincée à l'eau (298 charges). B : Surface lavée (I.A.2, page 70) (235 charges). C : Surface lavée puis étirée et relaxée 5 fois (251 charges). L'image C a été prise sur la surface après relaxation.	113
Figure 49 : Images MEB des surfaces PDMS. A/B : Surface PDMS rincée à l'eau. C/D : Surface PDMS lavée suivant le protocole indiqué plus haut (I.A.2, page 70). E/F : Surface PDMS lavée, étirée cinq fois puis imagée sous sa forme relaxée. Les images A,C et E ont un grossissement X200. Les images B,D et F ont un grossissement X2 000.....	115
Figure 50 : Distribution des tailles de particules observées sur les surfaces PDMS imagées par MEB. A : Surface lavée (I.A.2, page 70) (235 charges). B : Surface lavée puis étirée et relaxée 5 fois (490 charges). L'image C a été prise sur la surface après relaxation.	116
Figure 51 : Images MEB des surfaces PDMSr et PB. A/B : Surface PDMSr lavée suivant le protocole indiqué plus haut (I.A.2, page 70). C/D : Surface PB lavée suivant le même protocole. Les images A et C ont un grossissement X200. Les images B et D ont un grossissement X2 000.	117

Figure 52 : Images AFM obtenues sur des surfaces PI et PB. A et B : représentations 3D et 2D d'une image faite sur une surface PI dans une zone de 10 x 10 μm . C et D : représentations 3D d'images faite sur une surface PB dans des zones de 98 x 21 μm et 5 x 5 μm	119
Figure 53 : Spectres de fluorimétrie : A / B : Surface PB, Scan large / zoomé sur la zone d'auto fluorescence. C / D : Surface PI, Scan large / zoomé sur la potentielle zone d'intérêt. En ordonnée : Longueur d'onde d'excitation de la surface en nm. En abscisse : Longueur d'onde d'émission en nm. L'échelle en couleur représente l'intensité di signal émis.	121
Figure 54 : Migration électrophorétique sur gel SDS-Page des protéines In_c (puit 2), In_w (puit 3), Jo_c puit 4) et In-NpXyn11A (puit 5) en association les unes avec les autres ou non. Les associations Jo_c/In_c et Jo_c/In_w sont observables dans les puits 6 et 8 respectivement grâce aux bandes ayant migré à des masses molaires proches de 35 kg/mol. L'association $\text{Jo}_c/\text{InNpXyn11A}$ est observable dans le puit 8 grâce à la bande ayant migré à une masse molaire proche de 50 kg/mol. La masse est estimée grâce au marqueur de poids moléculaire inoculé dans le puit 1.	124
Figure 55 : Cinétique d'assemblage Jo/In dans différentes conditions analysé par migration sur gel SDS-Page. A : Gel SDS-PAGE sur lequel ont été déposées les différentes fractions de la cinétique d'assemblage Jo_w/In_w . B : Résultats issus des différentes cinétiques d'assemblage. Les trois cinétiques ont été compilées sur le même graphique.	125
Figure 56 : Mise en évidence de la formation de ponts disulfures entre les protéines par migration sur gel SDS-Page en présence de réducteur (R) ou sans réducteur (S-S). Les dimères Jo-Jo sont indiqués par des flèches rouges. Les dimères In-In sont indiqués par des flèches bleues.....	126
Figure 57 : Structure chimique du TCEP.....	128
Figure 58 : Gel SDS-Page des différents essais de réduction des ponts disulfures formés par les cystéines. 10X signifie 10 équivalents molaires. Le tableau de droite indique les échantillons inoculés dans les différents puits du gel.....	128
Figure 59 : Structure chimique de la sonde fluorescente maléimide N-(5-fluoresceiny1).	129
Figure 60 : A/C : Gels SDS-Page imagés dans le visible. B : Gels SDS-Page imagés en fluorescence. D : Gels SDS-Page imagés en UV et en fluorescence puis superposés. E : Tableau indiquant les échantillons inoculés dans chaque puits. R : fraction déposée avec du réducteur. NR : fraction déposée sans réducteur.	130
Figure 61 : A : Réaction entre une fonction alcool en surface et le DPPH entraînant la diminution de l'absorbance à 540 nm. B : Variations d'absorbance à 540 nm due à la réaction entre les fonctions hydroxyles et le DPPH.....	136

Figure 62 : Evolution de l'angle de contact pour une surface polyisoprène traitée avec un plasma argon et plongée dans l'eau 10 minutes.	138
Figure 63 : Synthèse de l'éthoxy,(5-maleimido pentyl) anhydride	139
Figure 64 : Estérification entre l'éthoxy,(5-maleimido pentyl) anhydride et les fonctions alcools disponibles sur les surfaces traitées.....	139
Figure 65 : Mesure d'angle de contact faites 10 minutes après le traitement pour mettre en évidence la fonctionnalisation des différentes surfaces. Tests statistique One-way ANOVA à comparaisons multiples. **** (p < 0,0001).	141
Figure 66 : Evolution de l'angle de contact en fonction du temps pour une surface polyisoprène fonctionnalisée avec des maléimides.	143
Figure 67 : Dosage secondaire des maléimides en surface à l'aide de la cystéamine et du 4,4'-dithiodipyridine.	144
Figure 68 : Mesure d'absorbance en tripliqua d'une solution contenant de la cystéamine de et du 4,4'-dithiodipyridine mise au contact : (en noir) d'une surface PB non traitée ; (en rouge) d'une surface PB fonctionnalisée avec des maléimides. Les barres d'erreur verticales représentent l'intervalle de confiance 95 %.	145
Figure 69 : Quantification des maléimides en surface par mesure des variations d'absorbance à 324 nm. Les mesures sont faites en tripliqua sur 3 solutions différentes et les intervalles de confiance à 95 % sont indiqués sur le graphique. En vert : solution étalon contenant tous les réactifs mais n'ayant été exposée à aucune surface. En noir : Solution Témoin négatif contenant tous les réactifs et ayant été exposé à une surface non-fonctionnalisée. En rouge : solution échantillon contenant tous les réactifs et ayant été exposée à une surface fonctionnalisée avec des maléimides.	147
Figure 70 : Mécanisme d'addition de Michael entre un thiol et un maléimide	149
Figure 71 : Figure extraite de Poole et al. ²¹⁵ permettant d'estimer le pourcentage de cystéines sous forme thiolate à pH 7,2.....	150
Figure 72 : Images d'une goutte de 3 µL de InDsRed séchée sur une surface PB. L'échelle en bas à droite représente 400µm. A : Surface excitée et observée à la longueur d'onde d'émission de DsRed. B : Surface excitée à la longueur d'onde d'excitation de DsRed et observée à sa longueur d'onde d'émission.	153
Figure 73 : Mesure d'angle de contact après greffage de la protéine Jo _c sur les surfaces A (PB) ; B (PI) ; C (PDMS). Dans la figure C, les chiffres 0,5 et 0,1 représentent les concentrations en protéines dans le surnageant (en mg.mL ⁻¹). Significativité des résultats mise en évidence avec un test One-way ANOVA à comparaisons multiples. **** (p< 0,0001) ; * (p< 0,05).....	157

Figure 74 : A gauche : Mesure d'angle de contact après greffage de la protéine In _c sur la surfaces PB. Les protéines ont été utilisées avec une concentration de 0,5 g/mL dans le surnageant. A droite : gel d'électrophorèse SDS-PAGE des différentes protéines utilisées.	160
Figure 75 : Schéma d'une surface élastomère fonctionnalisée avec maléimides et avec assemblage de Jo (en rouge) et InNpXyn11A (en vert puis orange).	162
Figure 76 : Résultats de l'analyse XPS de la surface PB après assemblage de l'enzyme InNpXyn11A sur Jo. En haut : scan large de la surface PB-M-P-E. En bas : Tableau indiquant la présence de chaque atome en pourcentage sur les différentes surfaces.	164
Figure 77 : A : Images AFM de hauteur obtenues en mode contact. De gauche à droite : PB-M, PB-M-E et PB-M-P-E. B (taille des images : 20 x 20 μm) : Mesure de la rugosité sur 10 aires de 5 x 5 μm. La rugosité est exprimée en nm. C : Représentation graphique en boîte à moustache des résultats de rugosité obtenus.	166
Figure 78 : Représentation schématique des différentes Informations qui peuvent être extraites d'une courbe de force (courbe de retrait) acquise lors de mesures de spectroscopie de force par AFM.	168
Figure 79 : Résultats des analyses AFM en mode spectroscopie de force des surfaces PB. Chaque histogramme représente les résultats obtenus en compilant les résultats extraits de 200 courbes sur chaque surface. A : Analyse de la force d'adhésion, avec le résultat indiqué en pN en abscisse. B : Analyse du travail d'adhésion, avec le résultat indiqué en x10 ⁻¹⁸ J en abscisse. C : Analyse de la distance à rupture, avec le résultat indiqué en nm en abscisse.	169
Figure 80 : Résultats des quantifications d'enzymes immobilisées en surface par le biais d'une gamme étalon faite sur des enzymes libres en solution. A/B/C : Enzymes immobilisées sur surface PB/PI/PDMS. Dans les légendes en abscisses, +/- In représente la présence ou non du fragment In associé à l'enzyme chimérique In-NpXyn11A. La concentration de l'enzyme dans le surnageant est indiquée en μM. La présence de BSA ou non dans le surnageant est indiquée par +/- . Le temps d'incubation est indiqué en heure. Dans le graphique C, la concentration de Jo _c en μM dans le surnageant au moment du greffage de cette protéine est aussi indiqué. ...	172
Figure 81 : A : Figure provenant de l'étude de Montanier et al., ⁷ variations d'activité spécifique d'enzymes In-NpXyn11A greffées sur des billes paramagnétiques poreuses en fonction de la densité surfacique en enzymes. L'étude est menée sur du xylane provenant de bois de hêtre. B : Mesure d'activité spécifique sur du WAX pour des enzymes In-NpXyn11A libres en solution ou greffées sur une surface PB.	177

Figure 82 : Mesure d'activité spécifique d'enzymes immobilisées en surface (PB) ou libres en solution sur du X₃.pNP. Les trois premières mesures ont été faites sur une même surface avec des taux d'étirement différents pour faire varier la densité des enzymes en surface. 179

Figure 83 : Représentation de la méthode mise en place pour les études d'activités enzymatiques. A : La surface à étudier est plongée dans le surnageant. B : La surface est retirée du surnageant et celui-ci est étudié seul. C : Le surnageant est changé pour être frais puis la surface est étirée et plongée dans le réacteur pour être étudiée. D : La surface est retirée du surnageant et celui-ci est étudié seul. Le même processus est répété autant de fois que nécessaire pour compléter l'étude visée. 182

Figure 84 : Etude d'activité enzymatique d'une surface greffée PI avec différentes densités surfaciques en enzymes (en noir) ainsi que des surnageants associés (en vert). Les mesures vont par paire noir/vert. Après avoir effectué les deux mesures noir/vert, le surnageant est remplacé par du surnageant frais avant de procéder à la mesure suivante. 183

Figure 85 : Gel SDS-PAGE révélé au bleu de Coomassie. Ce gel est utilisé pour mettre en évidence la présence de protéines dans le surnageant à la suite d'une mesure d'activité enzymatique sur une surface PI. Les protéines Jo_c et In-NpXyn11A sont inoculées dans les puits 2 et 3 respectivement. Les surnageants concentrés sont déposés dans les puits 4, 5 et 6. 185

Figure 86 : Equation permettant de connaître la quantité d'enzymes relarguées en solution. E_r : Quantité d'enzymes relarguées en μmol. [E_r] : concentration des enzymes dans le surnageant en μmol.L⁻¹. V : volume du surnageant en L. A : l'activité mesurée dans le surnageant en μmol.L⁻¹.min⁻¹. AS : l'activité spécifique des enzymes libres sur WAX en (μmol.min⁻¹).μmol⁻¹..... 187

Figure 87 : Résultats des cinétiques mises en place sur la surface PB greffée avec InNpXyn11A. Quatre cinétiques ont été mises en place en alternant étirement/relaxation..... 188

Figure 88 : Représentation des potentiels effets non-contrôlés rencontrés lors de l'étirement des surfaces. A : Les enzymes sont greffées avec une densité donnée sur la surface via un espaceur Jo/In. B : La surface est étirée et les premiers phénomènes sont observables. La densité surfacique moyenne des enzymes diminue. A gauche, une enzyme se rapproche de la surface par inclinaison du fait de l'espace qui lui est rendu disponible. Au milieu, rien ne se passe, c'est le cas idéal. A droite, Une enzyme se rapproche de la surface car la chaîne polymère sur laquelle elle est immobilisée commence à être internalisée sous l'effet de la traction. C : La surface est encore étirée et les phénomènes observés sont accentués. D : En rouge, les enzymes forment des interactions faibles au contact de la surface ce qui peut provoquer l'adsorption et la déformation de leur structure tridimensionnelle. 191

Figure 89 : Etude d'activité enzymatique d'une surface greffée PI avec différentes densités surfaciques en enzymes (en noir) ainsi que des surnageants associés (en vert). Un gradient d'étirement a été appliqué à chaque cycle (noir/vert) ainsi qu'un changement de surnageant pour démarrer le cycle suivant avec du surnageant frais.....	193
Figure 90 : Etude d'activité enzymatique d'une surface greffée PI avec différentes densités surfaciques en enzymes (en noir) ainsi que des surnageants associés (en vert). La surface a été successivement étirée et relaxée d'un cycle de mesure (noir/vert) à l'autre. Le surnageant a aussi été changé entre chaque cycle afin de démarrer le cycle suivant dans des conditions identiques.	198
Figure 91 : Activités spécifiques des enzymes In-NpXyn11A en fonction de leur densité surfacique sur une surface PI. Ces résultats sont obtenus en appliquant une alternance étirement/relaxation à la surface entre les différentes mesures d'activités.	200
Figure 92 : Etude d'activité enzymatique d'une surface greffée PI avec différentes densités surfaciques en enzymes (en noir) ainsi que des surnageants associés (en vert). La surface a été utilisée sous sa forme relaxée pour les trois premiers cycles (noir/vert) puis avec un étirement de + 215 % pour les deux derniers cycles. Le surnageant a été changé entre chaque cycle afin d'être dans des conditions comparables.	202
Figure 93 : Activités spécifiques des enzymes In-NpXyn11A en fonction de leur densité surfacique sur une surface PI. Ces résultats sont obtenus en maintenant l'état relaxé de la surface pendant trois cinétiques puis en appliquant un étirement constant pour trois cinétiques supplémentaires.	205
Figure 94 : Etude d'activité enzymatique d'une surface greffée PDMS avec différentes densités surfaciques en enzymes (en noir) ainsi que des surnageants associés (en vert). Un gradient d'étirement a été appliqué à la surface d'un cycle (noir/vert) à l'autre pour les quatre premières cinétiques puis la surface a été relaxée pour faire la dernière cinétique. Le surnageant est changé après chaque cycle.....	206
Figure 95 : Etude d'activité enzymatique d'une surface greffée PDMS avec différentes densités surfaciques en enzymes (en noir) ainsi que des surnageants associés (en vert). La surface a été successivement étirée et relaxée d'une cinétique à l'autre. Le surnageant est changé après chaque cycle (noir/vert).....	208
Figure 96 : Etude d'activité enzymatique d'une surface greffée PDMSr avec différentes densités surfaciques en enzymes (en noir) ainsi que des surnageants associés (en vert). Un étirement de la surface inférieur à 20 % a été appliqué à la surface à partir de la seconde cinétique. Le surnageant est changé après chaque cycle (noir/vert).	211

Figure 97 : Activités spécifiques des enzymes In-NpXyn11A en fonction de leur densité surfacique sur une surface PDMSr. Ce résultat est obtenu en faisant plusieurs cinétiques sur une même surface en appliquant un étirement inférieur à 20 %. 213

Liste des tableaux

Tableau 1 : Familles de polymères utilisés dans la production d'élastomères avec quelques exemples de monomères simples utilisés pour leur polymérisation.	26
Tableau 2 : Modifications communes en long de chaîne sur les polymères insaturés	27
Tableau 3 : Méthodes et conséquences de modification de surfaces	31
Tableau 4 : Caractéristiques des différentes matrices polymères. ¹²	36
Tableau 5 : Grandes familles de fonctions chimiques utilisables sur les surfaces polymères pour procéder au greffage covalent de protéines	39
Tableau 6 : Méthodes de greffage de protéines avec régio- ou chimiosélectivité.....	41
Tableau 7 : Récapitulatif des méthodes disponibles et de leurs principales caractéristiques... ..	46
Tableau 8 : Souches d'Escherichia Coli utilisées avec leurs génotypes et caractéristiques.....	75
Tableau 9 : Plasmides utilisés dans le cadre de ce projet. Tag-H : Tag-His. Résistance : Amp : Ampicilline ; Chlo : Chloramphénicol ; Kana : Kanamycine.	76
Tableau 10 : Elutions effectuées pour la purification de protéines sur résine cobalt. L1, L2 et L3 : Lavages 1, 2 et 3. E1 : 10/100/250 : Elution avec tampon C supplémenté avec 10/100/250 mmol.L ⁻¹ d'imidazole.....	81
Tableau 11 : Méthode de lavage des surfaces suite au greffage de protéines en surface. MES : acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique.	85
Tableau 12 : Principaux signaux attitrés dans le spectre FTIR de la surface PB	106
Tableau 13 : Principaux signaux attitrés dans les spectres FTIR des surfaces PDMS et PDMSr	106
Tableau 14 : Principaux signaux attitrés dans le spectre FTIR du de la surface PI.....	106
Tableau 15 : Résultats de l'analyse du taux de gonflement du PB.....	108
Tableau 16 : Occupation de la surface par les charges minérales avant et après étirement de la surface PI. L'écart type correspond à la racine carrée de la variance.....	114
Tableau 17 : Occupation de la surface par les charges minérales avant et après étirement de la surface PDMS. L'écart type correspond à la racine carrée de la variance.	116
Tableau 18 : Angles de contacts des différentes surfaces utilisées dans ce projet. L'écart type correspond à la racine carrée de la variance.....	120
Tableau 19 : Paramètres utilisés pour optimiser les conditions de production des protéines Jo _c et In _c . Pour chaque protéine, 18 productions avec des conditions différentes ont été étudiées.	123

Tableau 20 : Récapitulatif des activités enzymatiques spécifiques des différentes enzymes utilisées en fonction des substrats. Les résultats sont présentés en masse et en moles. Chaque mesure a été faite en tripliqua. IU = $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$	132
Tableau 21 : Indications sur les différents échantillons caractérisés par XPS.	163
Tableau 22 : Indications sur les différents échantillons caractérisés par AFM	166
Tableau 23 : Estimation des distances entre enzymes greffées en fonction de la densité de greffage. Estimations faites en considérant que le greffage est homogène sur la surface. Le diamètre de l'enzyme est proche de 5 nm. La sphère occupée par l'enzyme est estimée avec un diamètre de 10 nm en accord avec Montanier et al. ⁷ Une fois la surface occupée par les enzymes calculée, celles-ci sont associées à des cubes afin de pouvoir calculer simplement la distance séparant deux cubes.....	175
Tableau 24 : Résultats obtenus à partir de la Figure 87. Dans la dernière ligne les résultats sont comparés à l'activité spécifique des enzymes libres (3 917 IU.mg ⁻¹). IU = $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$	189
Tableau 25 : Récapitulatif des données obtenues en appliquant un gradient d'étirement à une surface PI greffée.....	193
Tableau 26 : Résultats obtenus en faisant des mesures d'activités spécifiques sur des enzymes greffées sur surface PI et en appliquant un gradient d'étirement. Résultats obtenus en faisant l'estimation que toutes les enzymes relarguées dans le surnageant étaient greffées sur des charges, impliquant que leur activité spécifique est de 571,2 IU.mg ⁻¹	196
Tableau 27 : Récapitulatif des données obtenues en appliquant une alternance étirement/relaxation à une surface PI greffée. Ces résultats ont été obtenus en supposant que l'ensemble des enzymes relarguées dans le surnageant soient sous forme libre.....	199
Tableau 28 : Résultats obtenus en faisant 5 cinétiques sur une surface PI avec enzymes greffées. La surface a été utilisée pour trois cinétiques sans étirement puis a été étirée une fois pour être utilisée dans deux cinétiques supplémentaire. Ces résultats ont été obtenus en supposant que l'ensemble des enzymes relarguées dans le surnageant soient sous forme libre.....	203
Tableau 29 : Résultats obtenus en faisant des mesures d'activités enzymatiques sur des surfaces PDMS en appliquant un gradient d'étirement. Résultats obtenus en faisant l'estimation que toutes les enzymes relarguées dans le surnageant étaient sous forme libre, impliquant que leur activité spécifique est de 3 917 IU.mg ⁻¹	207
Tableau 30 : Résultats obtenus en faisant des mesures d'activités enzymatiques sur des surfaces PDMS en appliquant une alternance d'étirement. Résultats obtenus en faisant l'estimation que toutes les enzymes relarguées dans le surnageant étaient sous forme libre, impliquant que leur activité spécifique est de 3 917 IU.mg ⁻¹	209

Tableau 31 : Résultats obtenus en faisant des mesures d'activités enzymatiques sur des surfaces PDMSr en appliquant un faible étirement. La supposition a été faite que la totalité des enzymes relarguées dans le surnageant sont sous forme libre et ont donc une activité spécifique de $3\,917\text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$	212
<i>Tableau 32 : Récapitulatif des différents phénomènes non-contrôlés suggérés dans ce chapitre en fonction des surfaces étudiées.</i>	<i>215</i>

Liste des abréviations

- ABSAcrylonitrile butadiène styrène
- AFM Microscopie à force atomique
- AT-EPB..... Epoxy-polybutadiène aldéhyde téléchélique
- AT-PB Polybutadiène-aldéhyde téléchélique
- ATR-FTIR Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy
- BETBromure d'éthidium
- BSAAlbumine de serum bovin
- CDDichroïsme circulaire
- CDC13..... Chloroforme deutéré
- CFE.....Cell free extract
- CVD..... Dépôt chimique de phase vapeur
- DBTL..... Di-n-butyldilaurate d'étain
- DCM.....Dichlorométhane
- DEA.....Diéthanolamine
- DNS Acide 3,5-dinitrosalicylique
- DO Densité optique
- DPPH..... 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
- DTDP..... 4,4'-dithiodipyridine
- EDX.....Rayon X à dispersion d'énergie
- FESEM Microscopie électronique à balayage à émission de champ
- Fur4T-PB Polybutadiène tétrafurane téléchélique
- Furane-NCO Furfuryl isocyanate
- GH O-glycoside hydrolase
- H4T-PB.....Polybutadiène tétrahydroxy téléchélique
- H5IO6.....Acide périodique
- HFBI..... Hydrophobine
- HRPHorseradish peroxydase
- IPTG Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
- IU..... $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$
- Joc.....Protéine Jo avec une cystéine à l'extrémité N-terminale
- K₂HPO₄ Hydrogénophosphate de potassium
- KH₂PO₄ Phosphate de monopotassium
- LBLysogeny Broth
- Maléimide-NCO Maléimide isocyanate
- mCPBA acide 3-métachloroperbenzoïque
- MES.....Acide 4-morpholine éthane sulfonique monohydrate
- MgSO₄ Sulfate de magnésium
- Na₂S₂O₃Thiosulfate de sodium
- NaBH(OAc)₃..... Triacétoxyborohydrure
- NaBH₄..... Borohydrure de sodium
- NaHCO₃ Bicarbonate de sodium

- NaN₃ Azoture de sodium
- NHS N-Hydroxysuccinimide
- OH-PB Hydroxy-polubutadiène
- PB Polybutadiène
- PB-Mal Polybutadiène fonctionnalisé maléimide
- PDMS Polydiméthylsiloxane
- PE Polyéthylène
- PEG Polyéthylène glycol
- PET Polyéthylène téréphtalate
- PNIPAM Poly(N-isopropyl acrylamide)
- PVDF Polyfluorure de vinylidène
- Red-Al Bis(2-méthoxyéthoxy) aluminohydrure de sodium
- Rm Outil d'étirement de la surface
- SBR Caoutchouc de styrène et butadiène
- SEM Microscopie électronique à balayage
- SFG Sum frequency generation
- SPR Résonnance plasmonique de surface
- Surface PB Surface élastomère à base de polybutadiène
- Surface PDMS Surface élastomère à base de polydiméthylsiloxane
- Surface PDMSr Surface PDMS renforcée de fibres polyester
- Surface PI Surface élastomère à base de polyisoprène
- TB Terrific Broth
- TCEP Tris(2-carboxyethyl) phosphine
- TEM Microscopie électronique à transmission
- Tg Température de transition vitreuse
- TGA Analyse thermogravimétrique
- THF Tétrahydrofurane
- ToF-SIMS Analyse de temps de vol-spectrométrie de masse
- Tris/HCl Tris(hydroxyméthyl) aminométhane
- TWEEN®20 Monolaurate de polyoxy thyl nesorbitane
- V Vitesse de réaction
- VMax Vitesse maximale de réaction
- WAX Arabinoxylane de blé
- X3.pNP à-D-xylotrioside de para-nitrophenyle
- XPS Spectrométrie photoélectronique à rayon X

Introduction

Les enzymes sont des biomolécules qui peuvent catalyser des réactions chimiques avec une grande spécificité, souvent supérieure à celle de catalyseurs chimiques. Il est notamment possible pour des enzymes de catalyser des réactions de manière stéréospécifique.¹ L'activité catalytique des enzymes présente aussi un intérêt industriel que ce soit dans le domaine de la synthèse,² de la valorisation de la biomasse³ ou même du recyclage.⁴

Plusieurs études ont mis en évidence que le l'intérêt des enzymes peut être accru quand elles ne sont pas simplement utilisées libres en solution. Il est notamment possible d'associer différentes enzymes sur des structures protéiques pour augmenter leur activité catalytique.^{5,6} La proximité entre enzymes impliquées dans une même cascade enzymatique permet d'accroître l'activité de toutes les enzymes impliquées dans la cascade car l'enzyme qui est en amont de la cascade libère des produits à proximité d'autres enzymes pour lesquelles le produit servira de substrat. La proximité entre ces enzymes permet donc d'augmenter l'accessibilité au substrat.

Les xylanases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse du xylane. Il a été mis en évidence en 2019⁷ que la distance entre des xylanases identiques, donc n'appartenant pas à une cascade enzymatique, peut aussi avoir un impact sur leur activité. La proximité entre ces enzymes entraîne une diminution de leur activité du fait d'un accès au substrat limité pour des raisons stériques. Cependant, la proximité entre les xylanases permet aussi d'avoir un meilleur contrôle sur le degré de polymérisation des xylooligosaccharides relargués en solution à la suite de l'hydrolyse du xylane. Les xylooligosaccharides sont des molécules à haute valeur ajoutée.⁸ Il est donc possible d'obtenir ce type de produits en hydrolysant par catalyse enzymatique du xylane qui, lui, est un produit à faible valeur ajoutée provenant de la biomasse.⁹

Une meilleure compréhension de l'effet de la distance entre les enzymes sur leur activité catalytique pourrait éventuellement permettre de développer des systèmes complexes avec différentes enzymes immobilisées à des distances optimales les unes des autres permettant l'obtention de produits complexes à obtenir par synthèse chimique. Il pourrait notamment devenir possible de créer des systèmes contenant différentes enzymes avec des distances contrôlées pour dégrader des substrats complexes, comme la biomasse ou les déchets industriels, et en dégager des produits à forte valeur ajoutée.

Une problématique majeur dans cet axe de recherche est que l'étude de l'effet de la distance entre enzymes sur leur activité catalytique est extrêmement chronophage. Dans les études mises

en place, les enzymes sont immobilisées sur des supports rigides.¹⁰ Il est donc nécessaire de produire de nombreux échantillons différents qui ont des enzymes immobilisées avec des distances entre elles contrôlées. De plus, il n'existe aucun standard sur les paramètres utilisés pour étudier l'effet de la distance entre enzymes sur leur activité. Chaque étude est donc indépendante et n'est pas comparable à une autre car trop de paramètres varient en fonction des enzymes et des supports d'immobilisation utilisés.

Dans ce cadre, l'objectif de ce travail de thèse est de développer un système permettant d'étudier plus rapidement l'effet de la distance entre enzymes sur leur activité catalytique. Une attention particulière a été portée à ce que la méthode développée soit transposable à différentes enzymes et supports d'immobilisation.

Le système envisagé dans ces travaux consiste à greffer des enzymes sur une surface unique puis à étirer la surface afin de faire varier la densité enzymatique en surface et, en conséquence, la distance entre les enzymes. Cette méthode permettra d'étudier une large gamme de distances inter-enzyme en utilisant un échantillon unique. Il sera donc possible d'obtenir des résultats beaucoup plus rapidement qu'auparavant car le nombre d'échantillons à préparer sera drastiquement réduit.

Pour ce projet, il sera nécessaire d'utiliser une surface étirable. Les surfaces élastomères ont la particularité de permettre une réversibilité de l'étirement, c'est pourquoi ces matériaux seront utilisés. Idéalement, le système devrait poser des standards pour l'analyse visée, ce qui implique une adaptabilité à différentes enzymes et surfaces. C'est pourquoi ce projet permettra d'étudier différentes surfaces élastomères.

La méthode d'immobilisation des enzymes doit être adaptable à différentes enzymes. Dans l'étude de Montanier et al.,⁷ un système d'espaceur Jo/In a été utilisé. Les deux protéines Jo et In s'assemblent spontanément à 20 °C en formant une liaison amide entre une asparagine et une lysine catalytique présente dans la séquence de Jo. La stratégie consistait donc à greffer la protéine Jo par réaction entre l'amine primaire d'une des 5 lysines disponibles en surface de la protéine (ce qui n'inclus pas la lysine catalytique) et le groupement carboxylique d'une fonction N-Hydroxysuccinimide (NHS) en surface. Dans un second temps, l'enzyme chimérique In-NpXyn11A, composée de la fusion entre l'enzyme NpXyn11A et, à son extrémité N-terminale la protéine In, était greffée sur la surface par assemblage Jo/In.

L'utilisation de l'espaceur Jo/In est très intéressante car adaptable à de nombreuses enzymes à condition de pouvoir les produire en association avec le fragment In. De plus, la présence de

cet espaceur permet de mettre une distance entre l'enzyme et la surface ce qui procure à l'enzyme une mobilité locale et donc une bonne accessibilité au substrat. L'espaceur permet de placer l'enzyme dans un environnement hydrophile, entre une épaisseur de protéines Jo/In d'un côté et un solvant aqueux de l'autre, ce qui leur permet d'avoir le même comportement que quand elles sont libres en solution. De cette manière, le seul facteur impactant leur activité sera la distance inter-enzyme.

L'espaceur Jo/In sera donc utilisé dans le cadre de ces travaux ainsi que l'enzyme *NpXyn11A* car celle-ci est largement utilisée au sein de l'équipe SysCarb qui m'a accueilli au Toulouse Biotechnology Institute (TBI).

En revanche, la méthode de greffage de Jo sur la surface sera modifiée. La méthode utilisée en 2019⁷ entraîne un potentiel greffage multipoint de la protéine en surface car celle-ci a plusieurs lysines dans sa séquence. Il est possible qu'en étirant une surface sur laquelle une protéine est greffée en multipoint, celle-ci soit écartelée ce qui pourrait induire des phénomènes non-contrôlés dans le système développé ici. Il sera donc nécessaire de développer une méthode de greffage spécifique, mono-point et réalisable dans des conditions de température et de pH qui ne seraient pas délétères pour les protéines.

La réaction de Michael entre un thiol et un maléimide semble être une solution intéressante. Pour cela, nous pourrions nous appuyer sur des travaux déjà réalisés dans l'équipe SysCarb. Une cystéine a été introduite dans la séquence de Jo proche de son extrémité N-terminale par génie génétique pour obtenir la protéine Jo_c. En conséquence la protéine Jo_c a une cystéine, et donc une fonction thiol, unique dans sa séquence à son extrémité N-terminale ce qui la rend réactive.

Un autre point clé de ce projet sera d'obtenir des surfaces élastomères avec des fonctions maléimides en surface. Dans cet objectif, deux pistes seront explorées. La première solution envisagée est d'utiliser des précurseurs à base de polybutadiène pour réticuler un élastomère qui contiendrait les fonctions voulues.

Une seconde voie consistant à fonctionnaliser des surfaces réticulées sera explorée. Pour cela, les surfaces subiront un traitement plasma. Cette méthode semble opportune car applicable à une large variété de surfaces.¹¹ De plus, cette méthode permet de générer une grande quantité de fonctions réactives en surface sans impacter les propriétés mécaniques du matériau au niveau macroscopique. La surface subira ensuite un traitement chimique qui utilisera les fonctions générées en surface pour greffer des groupements maléimides.

Le résultat sera une surface élastomère fonctionnalisée maléimide sur laquelle seront greffées, en mono-point et de façon covalente, des protéines Jo_c par réaction thiol-maléimide. L'enzyme chimérique In-NpXyn11A sera ensuite greffée par assemblage covalent Jo/In.

Un des défis des travaux présentés ici sera d'utiliser ou de développer des méthodes permettant de caractériser les différentes étapes du greffage. Il s'agit de greffer des protéines sur une surface non-poreuse. Les quantités de fonctions chimiques et de protéines greffées à chaque étape seront donc très faibles et pourraient être inférieures aux limites de détection pour beaucoup de méthodes de caractérisation de surface utilisées classiquement. La quantification des différentes étapes de greffage sera un point largement développé dans ce manuscrit.

Un autre objectif majeur sera de créer une méthode d'étirement de la surface permettant de contrôler, de manière homogène, la densité surfacique des enzymes. L'étirement devra donc être homogène, contrôlable et relativement lent pour éviter un gonflement plus fort des zones de la surface qui pourraient être plus faibles mécaniquement.

Une fois toutes les étapes précédentes complétées, il sera nécessaire d'adapter les protocoles d'étude d'activités enzymatiques au système développé car les quantités d'enzymes seront très faibles dans des volumes nécessairement élevés pour pouvoir immerger les surfaces étudiées.

L'activité spécifique des enzymes greffées sur la surface pourra ensuite être étudiée. Il sera intéressant d'étudier l'activité catalytique des enzymes sur deux types de substrats que sont le β -D-xylotrioside de para-nitrophényle (X₃.pNP ; M_w : 487 g.mol⁻¹) et l'arabinoxylane de blé (WAX ; M_w : 323 000 g.mol⁻¹). Le premier substrat est de petite taille ce qui lui permet de diffuser facilement et le rend accessible aux enzymes durant toute la durée de la réaction. Selon l'étude de Montanier et al., l'activité des enzymes immobilisées sur le X₃.pNP est identique à celle des enzymes libres, ce qui pourra permettre de mettre en évidence l'efficacité du greffage des enzymes en surface.

Le WAX est un substrat macromoléculaire, ce qui ralentit sa diffusion et diminue son accessibilité pour les enzymes immobilisées. C'est ce substrat qui sera utilisé pour étudier les variations d'activités enzymatiques spécifiques en fonction de la distance inter-enzyme.

Les résultats observés sur ces deux substrats permettront de vérifier si les tendances observées en 2019 par Montanier et al. se vérifient bien avec ce nouveau système. La comparaison des résultats permettra aussi de vérifier si le nouveau système envisagé permet bien d'étudier

l'activité spécifique des enzymes en fonction de leur distance les unes par rapport aux autres de manière rapide et fiable.

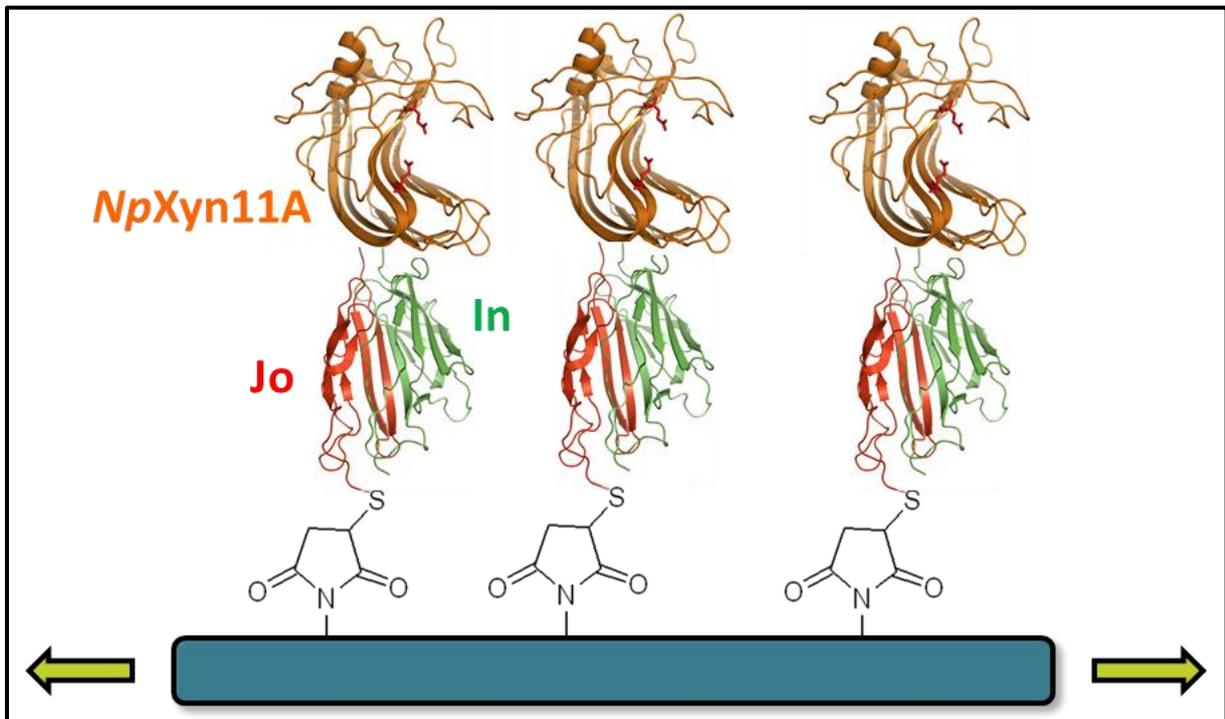


Figure 1 : Représentation graphique du système envisagé pour répondre aux problématiques du projet. Surface élastomère fonctionnalisée avec des maléimides. Addition de Michael entre un maléimide sur la surface et la fonction thiol de la cystéine contenue dans la séquence de Jo (en rouge) permettant le greffage covalent, spécifique et mono-point de la protéine. Assemblage Jo/In entre la protéine greffée sur la surface et le fragment In (en vert) produit en fusion avec l'enzyme NpXyn11A (en orange) permettant le greffage covalent, spécifique et mono-point de l'enzyme sur la surface. La surface est ensuite étirée pour faire varier les distances moyennes entre enzymes.

Chapitre I : Etude Bibliographique

A. Surfaces élastomères

1. Généralités

Les polymères sont des macromolécules constituées par l'enchaînement de molécules, ou monomères, liées le plus souvent de façon covalente. Un polymère peut être composé d'un seul type d'unité monomère, comme dans le cas du polyéthylène (PE) composé d'unités monomères éthylène, mais il peut aussi contenir plusieurs monomères différents, comme dans le cas de l'acrylonitrile butadiène styrène (ABS) composé d'acrylonitrile de butadiène et de styrène. Les polymères peuvent être d'origine naturelle comme dans le cas de l'ADN composé d'adénine, de thymine, de cytosine et de guanine, ou encore les protéines, composées d'enchaînements d'acides aminés.

Les polymères sont généralement classés en différentes catégories en fonction de leurs propriétés. Les propriétés mécaniques peuvent être expliquées à l'aide de la température de transition vitreuse (T_g). Quand un matériau polymère est en dessous de sa T_g il est rigide et fragile. Quand le matériau est au-dessus de sa T_g les chaînes polymères sont mobiles localement, ce qui induit un comportement souple et ductile. Selon les types de polymères, il peut de plus exister une température dite de fluidification ou de fusion au-delà de laquelle celui-ci devient liquide.

Parmi les polymères, on trouve les thermoplastiques (polyéthylène, polypropylène, polychlorure de vinyle, polyéthylène téréphtalate...) qui sont des matériaux composés de chaînes polymères linéaires qui peuvent être utilisées sans modifications. Les élastomères (polybutadiène réticulé, polyisoprène réticulé...) et thermodurcissables (polyuréthanes réticulés) sont des systèmes composés de polymères réticulés chimiquement, donc liés de façon covalente, ce qui les rend insolubles. Les élastomères sont utilisés au-dessus de leur T_g pour exploiter leur comportement élastique. Au contraire, les thermodurcissables sont utilisés en dessous de leur T_g pour exploiter leur haute résistance mécanique. Les élastomères thermoplastiques (Polystyrène-Polybutadiène-Polystyrène, Copolymère bloc éther-ester ...) ont été développés plus tard. Ces matériaux sont composés de copolymères à blocs, il est donc possible de les exploiter dans une large gamme de T_g pour obtenir des comportements hybrides entre les thermoplastiques et les thermodurcissables. Ils sont rigides mais peuvent facilement

être remis en forme, ce qui n'est pas possible avec des thermodurcissables classiques (Figure 2).

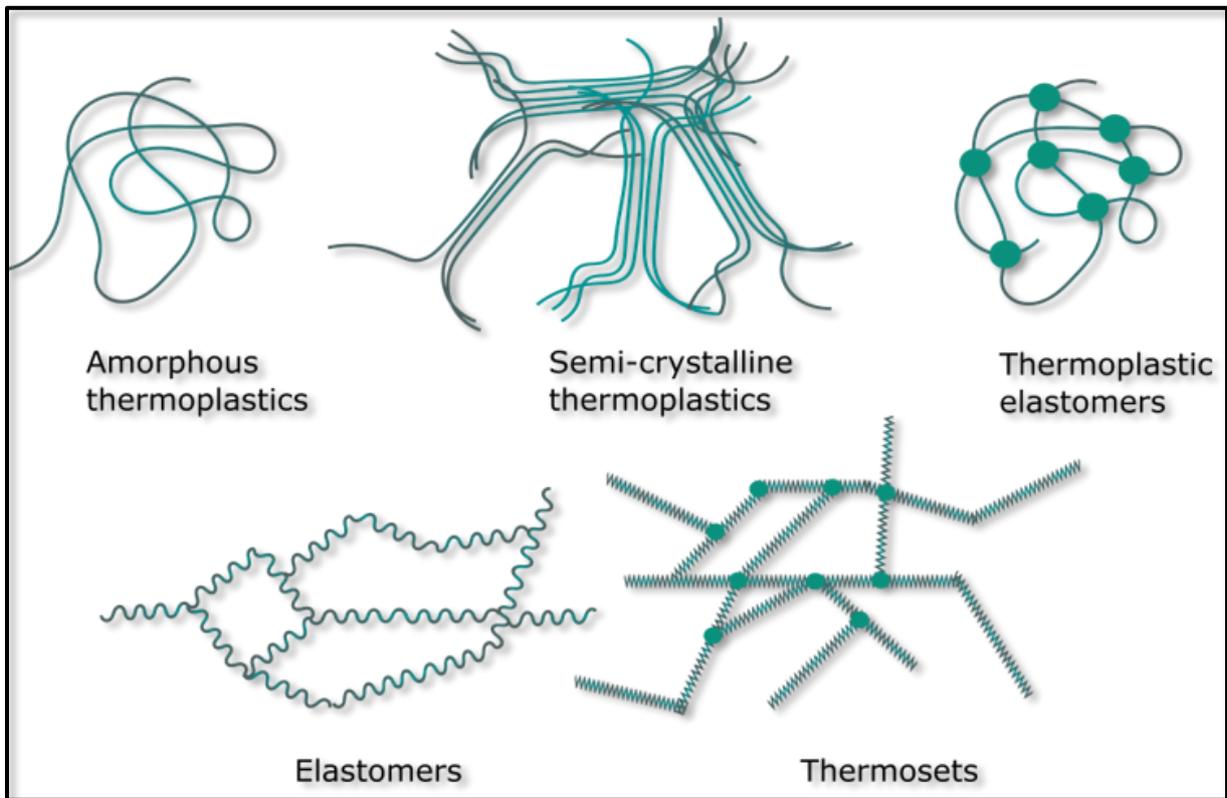


Figure 2 : Représentation des différentes matrices polymères. Illustration issue de Artico et al.¹²

Dans le cadre de ce projet, il est primordial que certaines propriétés soient respectées : insolubilité, et élasticité. C'est pourquoi seule l'étude des élastomères sera développée dans ce chapitre.

Les élastomères sont composés de chaînes polymères faiblement réticulées, à l'inverse des thermodurcissables. Ce faible niveau de réticulation fait que la distance inter maille (nombre d'unités de répétition du polymère entre deux points de réticulation) est grande. Le faible taux de réticulation des polymères, combiné avec une température d'utilisation supérieure à la T_g , donne un réseau lâche avec des chaînes polymères qui ont un haut niveau de mobilité localement (Figure 3).

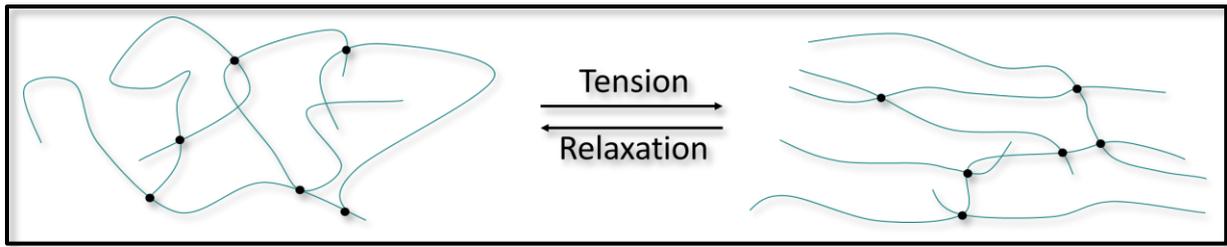


Figure 3 : Représentation de la déformation sous contrainte d'un réseau réticulé.

En conséquence, le matériau a un très fort taux de gonflement¹³ dans un solvant ad hoc. Si le matériau élastomère est placé dans une solution pour laquelle il a de l'affinité, les molécules dissoutes dans la solution vont facilement pouvoir s'insérer dans la matrice et avoir tendance à y rester.¹⁴ Pour cette raison, il sera préférable d'utiliser les élastomères hydrophobes dans le cadre du greffage d'enzymes car l'utilisation d'élastomères hydrophiles ne donnera pas un greffage localisé en surface mais plutôt réparti dans la totalité de la matrice polymère.¹⁵

Une seconde conséquence du faible taux de réticulation des polymères au sein des matrices élastomères se situe au niveau des propriétés mécaniques du matériau (Figure 4). Les matériaux élastomères ont un domaine élastique très large ce qui permet de travailler dans des niveaux de déformation très larges de façon totalement réversible.¹⁶ En contrepartie, la résistance à la rupture est très faible en comparaison de celle des matériaux thermodurcissables.

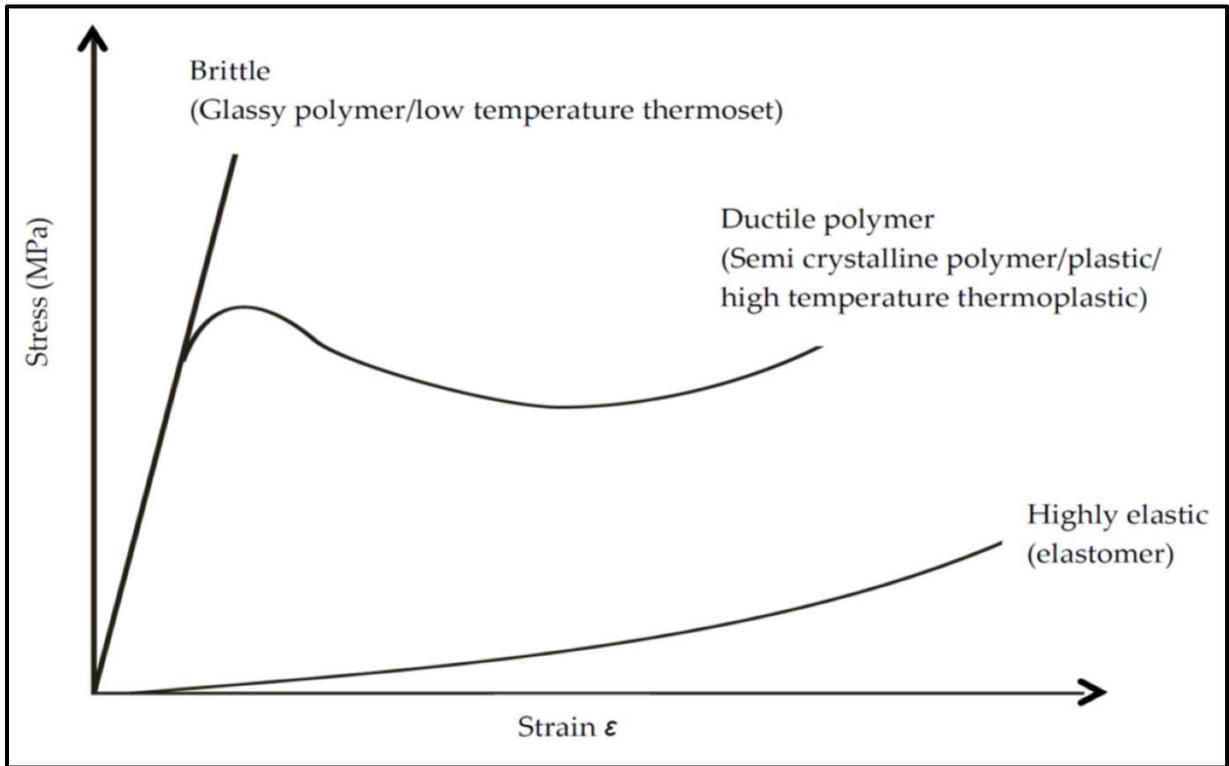


Figure 4 : Résistance à la déformation des différentes familles de polymères.¹⁷

2. Modifications chimiques de polymères

a) Synthèse d'élastomères

Les élastomères peuvent être synthétisés en réticulant des polymères naturels ou synthétiques. Les premiers élastomères ont été produits à partir de Polyisoprène naturel réticulé par un procédé inventé en 1839 par Goodyear appelé vulcanisation. Depuis, une large gamme de polymères peuvent être utilisés pour synthétiser des élastomères. (Tableau 1)

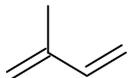
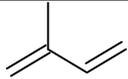
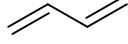
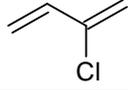
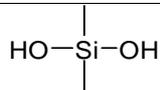
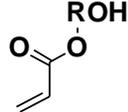
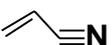
Famille	Provenance	Polymère	Exemples de monomères
Polymères d'origine naturelle			
Polysaccharides	Céréale	Amidon ¹⁸	
Résines végétales	Hévéa	PolyIsoprene ¹⁹ (latex)	
Polymères d'origine synthétique			
Insaturé	Pétrosourcé	PolyIsoprene ²⁰	
	Biomasse / pétrosourcé	PolyIsobutylène ²¹	
		Polybutadiène ²⁰	
		EPDM ²² (Caoutchouc monomère éthylène propylène diène)	
	Pétrosourcé	PolyChloroprène ²³	
	SBR ²⁴ (Caoutchouc de styrène et butadiène)		
Fluoré	Synthétique	Fluoroélastomère ²⁵	
		PerFluoroélastomère ²⁶	
Soufré		Polysulfure ²⁷	
Silice	Minéral	Silicone ²⁸	
Copolymère	Pétrosourcé	Polyéthylène chlorosulfoné ²⁹	
	Synthétique	Copolymère Acrylate d'alkyle ³⁰	
	Synthétique Pétrosourcé	Polynitrile ³¹	

Tableau 1 : Familles de polymères utilisés dans la production d'élastomères avec quelques exemples de monomères simples utilisés pour leur polymérisation.

Il sera important d'utiliser des polymères hydrophobes pour éviter le gonflement en milieux aqueux. L'utilisation de matrices les plus simples possibles chimiquement et les moins chères sont aussi à favoriser car le niveau de technicité requis pour la matrice utilisée dans cette étude peut être atteint sans difficultés avec des élastomères usuels. Il est donc intéressant d'utiliser des polymères d'origine synthétique de type insaturé pour tous les critères cités plus tôt.

b) Modifications de polymères insaturés

I- Modifications de la chaîne polymère

La présence d'insaturations sur les unités de répétition permet, par différents procédés, l'introduction d'espèces réactives qui pourront facilement être utilisées plus tard pour greffer des éléments.

La modification des polymères insaturés peut se faire en long de chaîne ou en bout de chaîne en fonction des résultats désirés. La modification en bout de chaîne permet un meilleur contrôle du taux de réticulation de la matrice finale, mais implique une distance inter-maille importante. La modification sur la chaîne permet d'atteindre des taux de réticulation plus importants et des distances inter-mailles plus réduites. En contrepartie, le contrôle du taux de fonctionnalisation des chaînes va être crucial pour avoir un taux de réticulation final précis, tout en sachant que la fonctionnalisation en long de chaîne va se répartir de façon statistique, ce qui implique une plus forte variabilité de la matrice finale.

Il existe différentes méthodes permettant de fonctionnaliser des polymères insaturés. Chaque méthode permet d'obtenir des fonctions différentes en long de chaîne et auront donc des applications différentes. Les six méthodes majeures ont été référencées ci-dessous. (Tableau 2).

Type de modification	Principe
Hydroboration	Addition du borane sur l'alcène suivi d'une substitution nucléophile du bore par un anion OH ⁻ lui-même dérivé de l'eau oxygénée. ³²
Epoxydation	Réaction des liaisons insaturées avec des peracides pour obtenir des oxiranes. ²⁰
Maléisation	Greffage de maléimides par réaction « ène » à l'aide d'un processus thermique sans coulage de chaînes. ³³
Thiol-ène	Réaction click très largement décrite dans la littérature. ³⁴
Halogénéation	Formation d'un carbocation et attaque de l'halogène nucléophile. ³⁵
Hydrosilylation	Addition de fonctions hydrogénosilane sur les insaturations le plus souvent par catalyse métallique. ^{36,37}

Tableau 2 : Modifications communes en long de chaîne sur les polymères insaturés

Le travail de cette thèse étant fondé sur une méthode de synthèse d'élastomères déjà décrite par le LCPO utilisant une fonctionnalisation par époxydes, il est intéressant de développer ce point. Il a été montré que l'époxydation peut se faire de façon contrôlée avec notamment une plus forte réactivité des unités insaturées 1,4 par rapport aux unités 1,2 dans le cas du polybutadiène (Figure 5).³⁸

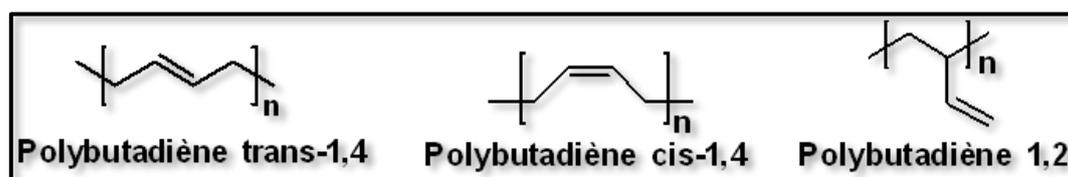


Figure 5 : Représentation des différentes liaisons présentes dans le polybutadiène

Les oxiranes en long de chaîne sont réactifs avec beaucoup de produits, comme les réducteurs, les acides, les amines, les alcools et les dialkyl phosphates^{39,40} (Figure 6).

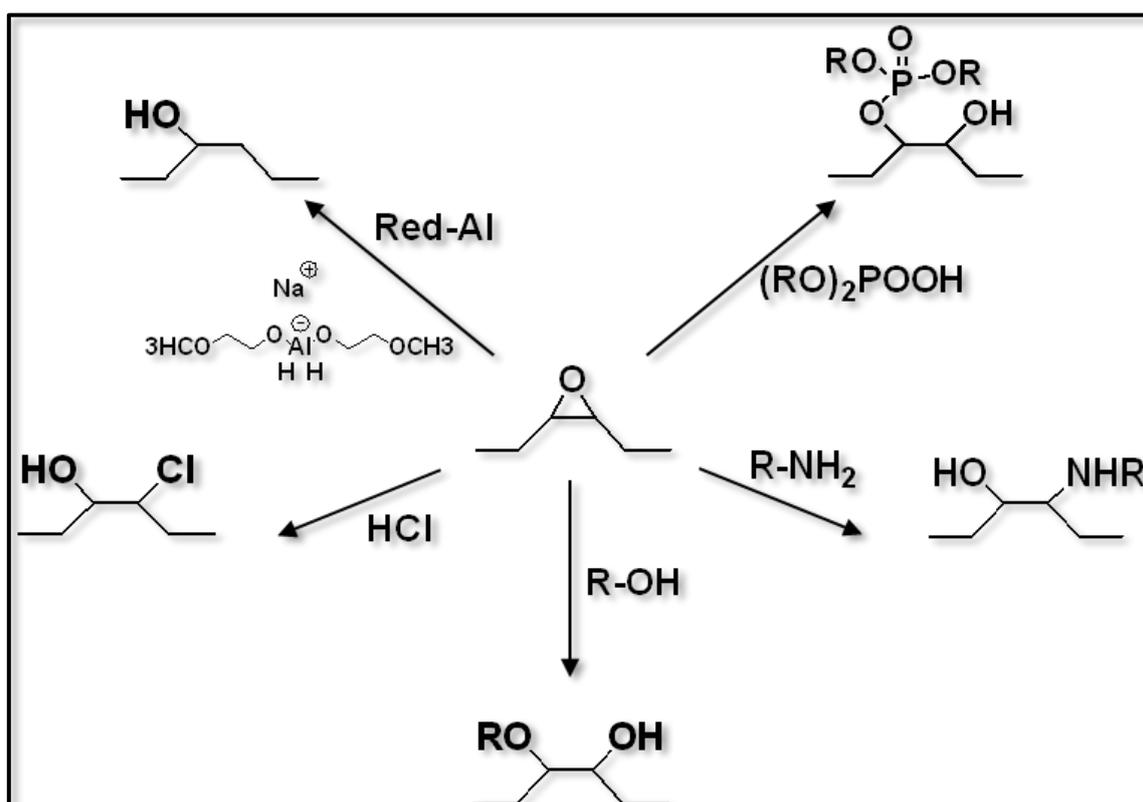


Figure 6 : Réactivité des fonctions époxyde en long de chaîne

II- Modification en bout de chaîne

Il existe de nombreuses méthodes pour modifier des polymères téléchéliques en bout de chaîne. Un polymère est dit téléchélique quand il présente des groupes différents à ses deux extrémités de chaîne. Dans le cadre de cette étude nous allons nous focaliser sur les modifications qui découlent de l'utilisation de fonctions carbonyle en bout de chaîne. Ce type de modifications est particulièrement utile à la suite d'une coupure oxydante sur les chaînes polymères car la coupure génère aussi des carbonyles en bout de chaîne ce qui limite le nombre de réactions chimiques à mettre en place.²⁰ Suite à la coupure oxydante, le produit est un polymère raccourci avec des fonctions aldéhyde et/ou cétones en bout de chaîne. Une fois ce produit obtenu il existe deux méthodes principales pour modifier les bouts de chaînes que sont la réduction et l'amination (Figure 7).

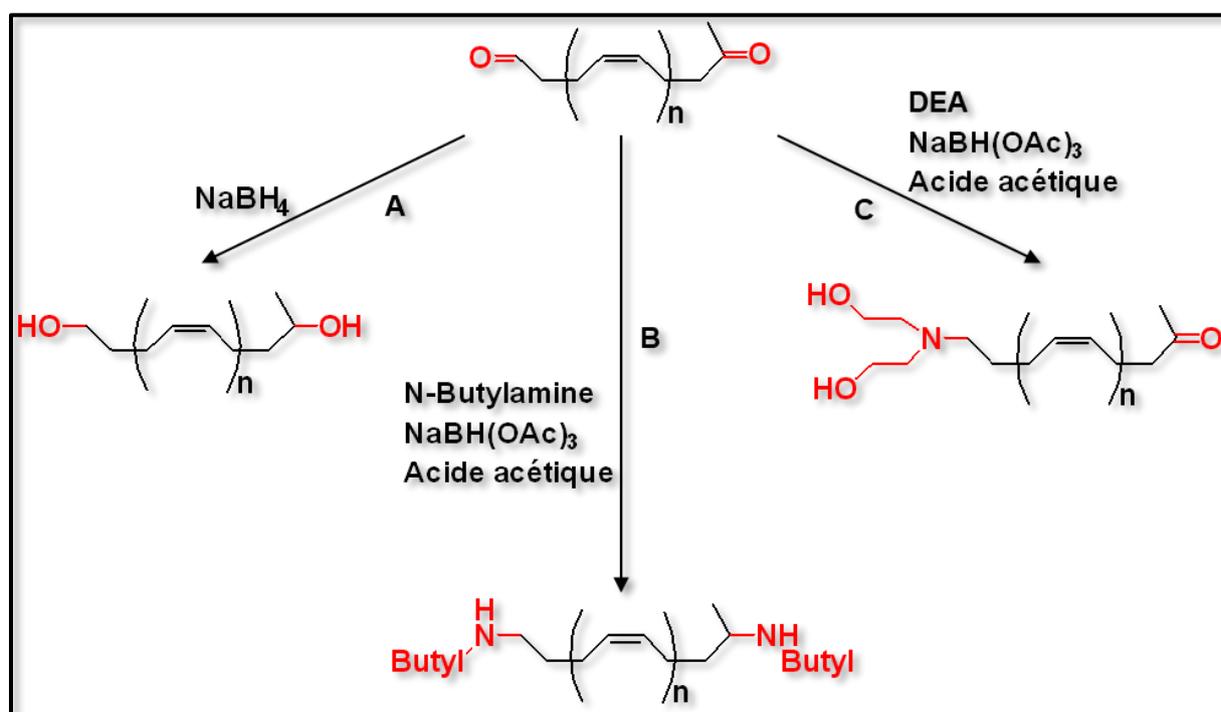


Figure 7 : Modification des bouts de chaîne suite à une coupure oxydante avec mCPBA. A : Réduction. B et C : Aminations.

La première option consiste à réduire les carbonyles à l'aide du borohydride de sodium (NaBH_4). La réduction permet d'obtenir deux fonctions alcool en bout de chaîne. Il est possible de continuer la réaction avec trois étapes supplémentaires que sont la méthylation, l'azidation et l'amination, pour obtenir des amines primaires en bout de chaîne, mais le rendement final est inférieur à 50%.⁴¹ Une seconde option consiste à faire une amination réductrice sur les groupes carbonyles pour obtenir des imines qui pourront être réduites en amines à l'aide du

triacétoxyborohydrure ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$). Il est aussi possible d'effectuer la réaction avec des amines secondaires comme la diéthanolamine (DEA), puis de faire une réduction avec du $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ et de l'acide acétique. Dans ce cas, la réaction ne se fera qu'avec les aldéhydes et les bouts de chaînes seront modifiés avec deux fonctions alcool par aldéhyde ayant réagi.⁴²

3. Conclusion

Il existe de très nombreux polymères, d'origine naturelle ou non, pouvant être utilisés en fonction des applications visées. Il est aussi possible de réticuler, ou non, les polymères afin de modifier leurs propriétés mécaniques pour mieux répondre à un cahier des charges. Les polymères étant des macromolécules, il est possible de les modifier en long et en bout de chaîne pour obtenir la réactivité voulue. Un aperçu des modifications applicables sur les polymères insaturés a été donnée dans ce chapitre. La modification de chaînes polymères est très largement référencée dans la littérature ce qui permet d'avoir une palette de méthodes disponibles sans avoir à passer par des étapes de développement

B. Modification de surfaces polymères

1. Généralités

La modification des surfaces polymères a pour objectif de modifier les propriétés chimiques, physiques et mécaniques du matériau utilisé. Il existe cinq voies majeures, résumées dans un tableau ci-dessous pour modifier les surfaces polymères (Tableau 3). Il est donc important de sélectionner la méthode la plus adaptée en fonction de l'application ultérieure. Il est à noter que les traitements physiques ou par corona n'impliquent que des modifications structurelles et physiques de la surface alors que les quatre autres modes de traitements impliquent aussi des modifications chimiques de la surface. Par souci de concision, ce chapitre ne s'étendra que sur la méthode utilisée dans le cadre de ce projet, le traitement plasma.

Méthode de modification	Principe	Principaux impacts sur la surface
Physique	La surface passe par une étape de moulage et/ou une étape d'abrasion à la suite de son extrusion. Cette méthode ne s'applique qu'aux thermoplastiques. ⁴³	-Augmentation de la rugosité. ⁴³ -Hydrophobicité accrue. ⁴⁴
Chimique	Peut se faire en plongeant la surface en solution ce qui implique un traitement qui peut être profond. ⁴⁵ Possibilité d'effectuer des revêtements ⁴⁶ et des dépôts chimiques en phase vapeur (CVD). ⁴⁷	-Modification de la rugosité et de l'adhésion. ⁴⁵ -Modification de la tension de surface. ⁴⁷
Traitement Corona	Introduction de groupes polaires par l'utilisation d'un plasma à équilibre thermodynamique non-local. Peut être mis en place dans des milieux inertes avec différents gaz. ⁴⁸	-Augmentation de l'énergie de surface. ⁴⁹ -Modification de la mouillabilité. ⁵⁰ -Modification de l'adhésivité. ⁵¹ -Modification de la rugosité. ⁵²
Ultraviolet	Exposition des surfaces à une lumière UV avec des longueurs d'onde, intensités et durées variables.	-Hydrophilie accrue. ⁵³ -Amorçage de réactions photochimiques. ⁵⁴
Thermique	La surface est chauffée entre sa Tg et sa Tf puis refroidie lentement.	-Augmentation de la cristallinité. ⁵⁵ -Réticulation. ⁵⁶
Plasma	Décrit en détail dans la partie suivante	Décrit en détail dans la partie suivante

Tableau 3 : Méthodes et conséquences de modification de surfaces

2. Modification de surface polymère par traitement plasma

Le traitement plasma consiste à placer la surface à traiter dans une chambre contenant un mélange de gaz. Le gaz est exposé à une source d'énergie électrique ou microonde ce qui va créer un plasma : mélange d'ions, de radicaux et d'électrons libres. Le plasma entre en contact avec la surface et provoque différentes modifications détaillées dans ce chapitre. Le traitement plasma peut être appliqué à tous types de surfaces mais seules les surfaces polymères seront

étudiées ici. Il est possible de modifier les propriétés de surface d'un polymère mais aussi de provoquer la réticulation de polymères déposés en surface.⁵³ Ce procédé a notamment été mis en place par Ting et al.⁵⁷ à l'aide d'un mélange de gaz O₂/Ar entraînant la réticulation du matériau en surface mais aussi une augmentation de sa rugosité.

Du fait de la complexité du plasma, les modifications sur la surface ne sont pas déterminées de façon exacte mais nous savons que le traitement va induire l'insertion et/ou la substitution de groupes fonctionnels ainsi que la création de radicaux en surface (Figure 8). Une méthode pour définir l'efficacité d'un traitement plasma est de quantifier les peroxydes générés en surface après exposition à l'air. Cette quantification peut se faire à l'aide du 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) qui va se consommer en réagissant avec les fonctions peroxydes. La fraction non consommée peut être quantifiée ultérieurement par analyse UV-Vis.⁵⁸ Les modifications apportées en surface des polymères sont temporaires du fait de la mobilité locale des chaînes polymères. Ce phénomène est notamment observable en suivant l'angle de contact des surfaces traitées au cours du temps.⁵⁹

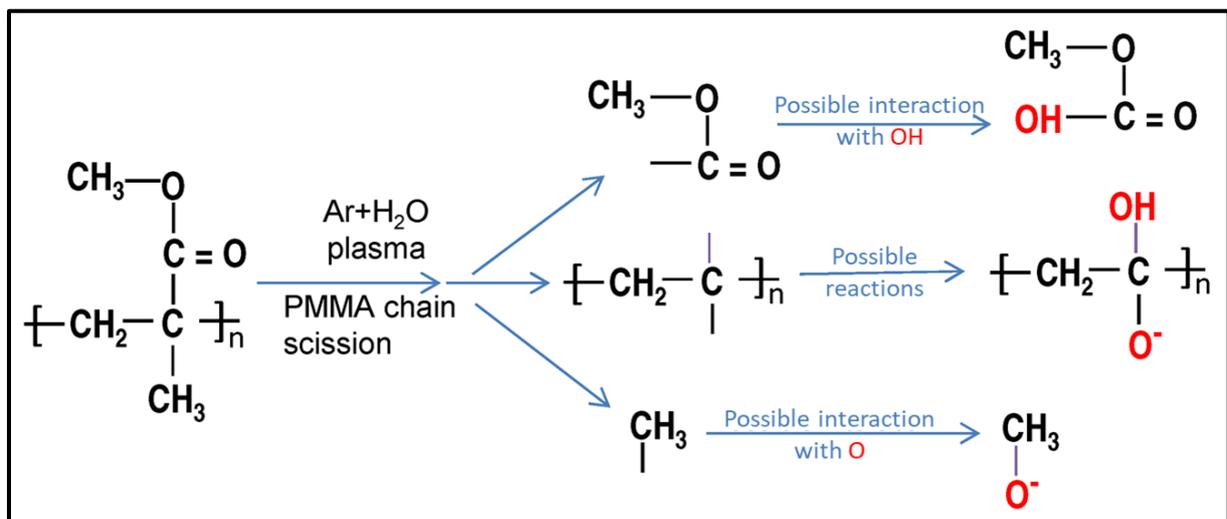


Figure 8 : Représentation des produits du traitement plasma Ar + H₂O d'une surface PMMA.⁶⁰

L'argon et le diazote sont des gaz inertes souvent utilisés dans les plasmas du fait de leur prix relativement faible en comparaison à l'hélium ou au néon. Les plasmas Argon étaient à l'origine utilisés pour nettoyer les surfaces polymères par la méthode CASING (Crosslinking by Activated Species of Inert Gases) créée en 1966.⁶¹ Quand cette méthode est appliquée, les surfaces sont exposées à des plasmas de faible énergie pendant des durées allant de la seconde à plusieurs minutes. Cette exposition est suffisante pour extraire certains hydrogènes de la

surface et former des radicaux. Ces espèces actives vont ensuite interagir pour former des liaisons et des groupes insaturés entraînant des ruptures de chaînes. Ceci permet de retirer les espèces de faible masse molaire de la surface ou de les convertir en espèces de haute masse molaire par réticulation.⁶² Les traitements plasma avec des gaz inertes sont aujourd'hui utilisés pour introduire des espèces réactives et des radicaux en surface avec pour objectif le greffage en surface de molécules d'intérêt.⁵⁸

De multiples paramètres peuvent influencer sur la qualité du traitement plasma. Le plasma CO₂ a notamment été étudié par Vasile et al.⁶³ pour mettre en évidence l'effet du temps d'exposition, de la puissance de décharge, du flux de gaz et de la distance échantillon/source d'énergie. Les mélanges de gaz peuvent aussi modifier les paramètres du traitement. Les gaz sont le plus souvent mélangés avec de l'air, mais il est aussi possible de n'utiliser que de l'air pour effectuer le traitement ce qui va entraîner des traitements plus longs, le temps de générer suffisamment de fonctions réactives en surface.⁶⁴

La très large variété de mélanges gazeux et de paramètres pouvant influencer sur la qualité d'un traitement plasma rend très complexe l'anticipation des bons paramètres pour une application spécifique. Il est donc nécessaire de passer par une étape de développement de méthode lors de la mise en place d'une nouvelle application.⁶³ C'est notamment ce qui a été fait par Yamamoto et al.⁶⁵ en étudiant l'impact du gaz utilisé, du temps de traitement et du temps d'exposition à l'air sur l'angle de contact final ainsi que sur la rugosité de surface et sur la résistivité finale du matériau. (Figure 9)

Dans cette étude, il a été mis par exemple en évidence que le temps de traitement ne devait pas être supérieur à 60 secondes sous peine de faire augmenter la rugosité de surface. Les effets optimums sur l'angle de contact et la résistance de la feuille traitée ont été obtenus après un traitement de 30 secondes. Le traitement avec dioxygène modifie l'angle de contact de façon plus durable que le traitement avec argon.

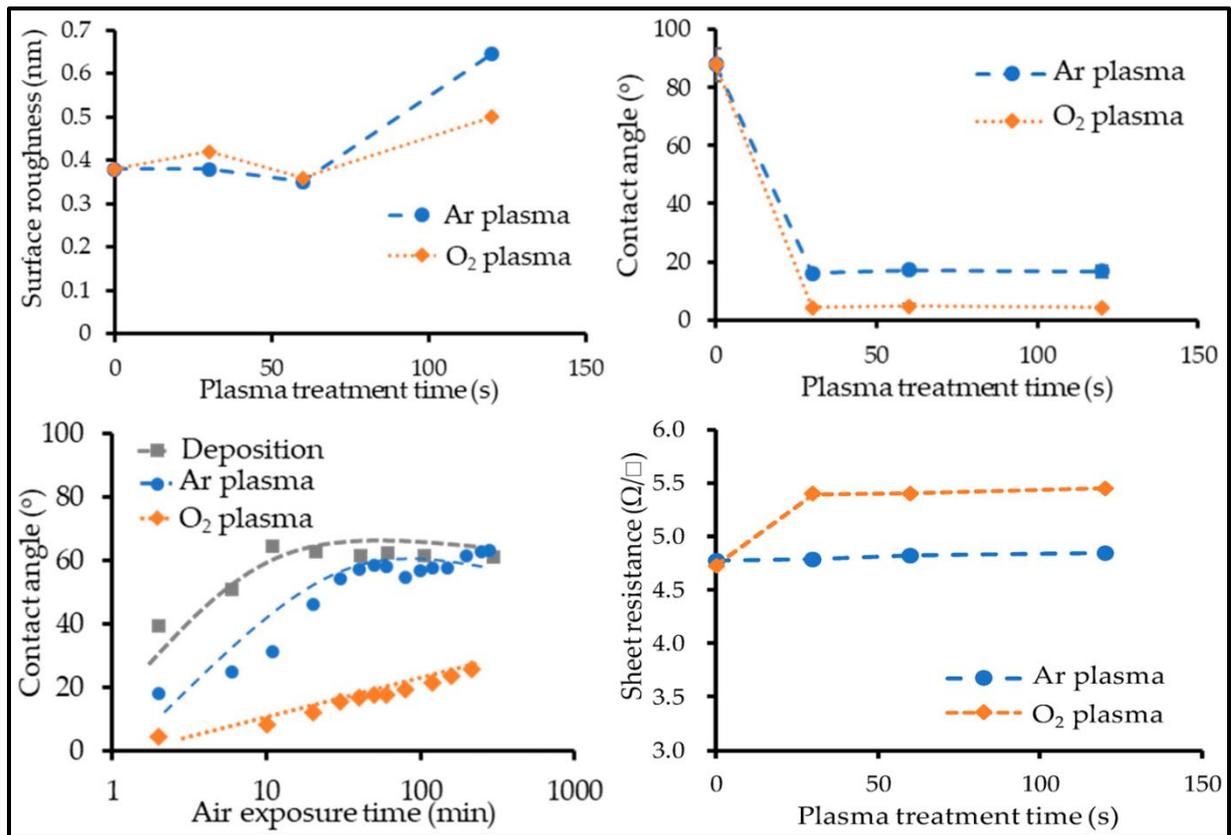


Figure 9 : Comparaison des effets de traitements plasma Argon ou Dioxygène sur la rugosité de surface, l'angle de contact, l'angle de contact suite à l'exposition à l'air et la résistance d'une surface conductive.⁶⁵

Une fois la génération d'espèces réactives contrôlée, il est très fréquent que les surfaces soient utilisées pour le greffage d'agent de réticulation comme le glutaraldéhyde,⁶⁶ de protéines⁶³ ou d'autres espèces avec pour but de modifier les propriétés de la surface.⁶⁷

3. Conclusion

En conclusion, il existe de nombreuses méthodes pour modifier les surfaces polymères en fonction des résultats visés. Le traitement plasma est simple à mettre en place mais peut avoir des effets complexes à interpréter. Il est notamment difficile, voire impossible, de déterminer précisément les modifications chimiques qui ont lieu en surface suite à ce type de traitement. Pour l'utilisation d'un traitement plasma dans une nouvelle application, il est nécessaire de passer par une étape de développement afin de déterminer les meilleurs paramètres de traitement de la surface (type de gaz et sa pression, durée de traitement et puissance du traitement).

C. Greffage de protéines et d'enzymes en surface

Le greffage de protéines, dont des enzymes, en surface de polymères est le cœur de ce projet. Cette partie de la bibliographie sera détaillée dans ce chapitre. Nous avons publié récemment une revue bibliographique plus détaillée et cette partie en est fortement inspirée.¹²

1. Greffage sur surfaces polymères

L'immobilisation de protéines et d'enzymes sur des supports solides est un procédé largement utilisé dans l'industrie agroalimentaire ou pharmaceutique, car ce processus assure la stabilité des enzymes sur le long terme et leur recyclage unitaire. La littérature sur ce point est très riche.⁶⁸⁻⁷⁰ (Différentes méthodes d'immobilisation ont été proposées dès 1979⁷¹ : greffage covalent, adsorption, réticulation ou encapsulation. Si les stratégies d'immobilisation n'ont pas évolué fondamentalement depuis, de nombreux paramètres⁷² ont été pris en considération, avec pour objectif de conserver ou améliorer l'activité des protéines immobilisées.

L'influence du support d'immobilisation a été étudiée en profondeur et il a été démontré que celui-ci a un impact majeur sur la qualité de l'immobilisation,^{73,74} que ce soit au niveau de la disponibilité des groupements chimiques en surface ou des propriétés mécaniques du support lui-même.

Récemment, de nouvelles études ont permis d'approfondir des points plus spécifiques, comme les stratégies supramoléculaires,⁷⁵ les greffages sur des nano- ou microstructures⁷⁶ ou les applications spécifiques comme les membranes pour la biocatalyse⁷⁷ ou la purification de l'eau.⁷⁸

Parmi toutes les stratégies d'immobilisation, le greffage covalent permet de garantir l'attache irréversible de la protéine en surface ce qui évite le relargage en solution. Cependant, cette méthode requiert le contrôle de l'orientation au moment du greffage afin de maintenir l'activité biologique.⁷⁹ Il est aussi très important que le point d'ancrage de la protéine sur la surface ne se situe pas à proximité de sa poche catalytique, ce qui pourrait modifier ou annuler l'activité catalytique. Un dernier point, relativement peu étudié, associé à cette méthode d'immobilisation est que l'utilisation de surfaces dures ou de surfaces polymères ne constitue pas le même challenge. Les matériaux polymères, contrairement aux matériaux durs, présentent des propriétés pouvant varier largement comme la cristallinité, la présence de transition de phases à température ambiante, l'immobilité du réseau et l'absence d'influence des solvants au contact de la matrice. (Tableau 4)

	Polymère simple	Polymère réticulé	Hydrogel
Réseau	1D	3D	3D
Morphologie	Semi-cristallin ou amorphe, non poreux	Semi-cristallin ou amorphe, poreux ou non	Amorphe, poreux
Liaisons	Covalentes	Covalentes, ioniques ou complexes	Covalentes, ioniques ou complexes
Transition de phase proche de T_{amb}	Possible transition vitreuse ou fusion	Possible transition vitreuse ou fusion	Possible transition d'ordre/désordre
Mobilité des chaînes	Dépend des températures T_g et T_f	Dépend des températures T_g et T_f	Mobilité intrinsèque due à la haute teneur en eau
Influence du solvant	Aucune, gonflement ou dissolution	Aucune ou gonflement	Modification du gonflement

Tableau 4 : Caractéristiques des différentes matrices polymères.¹²

Pour effectuer un greffage covalent en surface, il est nécessaire que des fonctions chimiques soient disponibles. Il existe de nombreuses méthodes pour générer des fonctions en surface,⁸⁰ mais il est à noter que les polymères permettent la disponibilité d'une large gamme de fonctions chimiques. En effet, grâce aux différentes méthodes de polymérisation (radicalaire, ionique, polycondensation ...), la palette de monomères utilisés est très large, allant des simples acrylates aux molécules multifonctionnelles en passant par des cyclosiloxanes. Beaucoup de ces monomères sont disponibles commercialement mais il est aussi possible de passer par une étape de synthèse pour générer une gamme encore plus large de fonctions chimiques. Les polymères peuvent aussi être greffés directement sur des surfaces inorganiques pour les fonctionnaliser tout en profitant de leurs propriétés mécaniques.⁸¹⁻⁸⁴

Les propriétés physiques de la surface sont aussi importantes à prendre en compte lors du greffage de protéines sur des polymères. Les spécificités associées aux matériaux polymères ont été présentées plus tôt. (Voir I.A.1 page 22) La spécificité majeure est l'existence d'une T_g

au-dessus de laquelle les macromolécules composant la matrice polymère ont une mobilité locale. De ce fait, les fonctions chimiques présentes de façon ponctuelle en surface peuvent être internalisées dans la matrice, rendant impossible tout greffage ultérieur de protéines. Ce phénomène est facilement observable par mesure d'angle de contact^{85,86} suite au traitement chimique ou physique de la surface, ce qui met en évidence que le greffage doit être mis en place rapidement suite à la fonctionnalisation. La température peut aussi être un paramètre important dans la mesure où elle peut provoquer de fortes variations d'hydrophilicité de la surface. Ce phénomène est notamment observé à 32 °C sur les surfaces poly(N-isopropyl acrylamide) (PNIPAM).^{87,88} Un dernier paramètre important concerne la sensibilité de la surface à l'environnement chimique. Ceci est particulièrement vrai pour les polyélectrolytes dont la solubilité va dépendre du pH et de la force ionique. L'utilisation de ces polymères pour l'immobilisation de protéines peut aussi être délicate, car elle peut entraîner la dénaturation des protéines ainsi qu'une forte répulsion en cas de non-greffage. Cette propriété peut cependant être utilisée pour faire varier l'accessibilité des enzymes en surface ainsi que leur activité.⁸³

2. Greffage non spécifique

Comme détaillé précédemment, le greffage de protéines requiert la présence de groupements fonctionnels provenant des monomères utilisés pour la polymérisation (I.C.1 page 35) ou par une étape de modification de surface. (I.B page 30) Les familles de fonctions réactives disponibles pour procéder au greffage sont relativement limitées et seront présentées dans ce paragraphe. Afin de rester succinct, seules ces grandes familles seront décrites ici.

La stratégie principale de greffage covalent consiste à utiliser les groupements amines présents sur les protéines et les faire réagir avec différents groupements fonctionnels en surface (Tableau 5) ce qui évite d'avoir à faire des modifications complexes sur les protéines.¹²

Groupe fonctionnel	Principe	Support polymère	Protéine
Epoxyde	Adsorption de la protéine via des interactions faibles suivi du greffage covalent multipoint par réaction amine-époxyde.	Poly (glycidyl Méthacrylate- <i>co</i> -méthylméthacrylate)	Lipase B ⁸⁹
		Poly (acrylonitrile- <i>co</i> -2-hydroxyéthylméthacrylate)	Epichondritine et lipase ⁹⁰
		Alcool polyvinylique	α -Amylase ⁹¹
		Poly (chlorure de propylène)	Laccase ⁹²
		Europergit C : Copolymère de méthacrylamide, bisacrylamide et monomères époxydés	β -galactosidase et chymotrypsine ^{93,94}
Aldéhyde	Réaction amine-aldéhyde pour former une imine. La réaction est réversible, il faut donc réduire l'imine en amine secondaire stable.	Fibres cellulosiques	α -chymotrypsine, ⁹⁵ papain, ⁹⁶ glucoamylase, ⁹⁷ Protéine A, ⁹⁸ Lipase, ⁹⁹ Laccase. ¹⁰⁰
		Agarose/Sépharose modifiée par voie glycosylée. ¹⁰¹	Pénicilline G acylase, ¹⁰¹ α -galactosidase, ¹⁰² β -galactosidase ¹⁰³ ...
		Fibres de soie avec greffage préalable de poly(acrylonitrile)	β -galactosidase ¹⁰⁴

		Très large gamme de polymères avec un greffage de glutaraldéhyde (α -bis-aldéhyde) préalable. ¹²	Lipase, ¹⁰⁵ Laccase, ¹⁰⁶ Tyrosinase ¹⁰⁷ ...
Acide carboxylique et ses dérivés	Utilisation directe de l'acide carboxylique avec un faible rendement final, ou activation préliminaire de la fonction. ¹⁰⁸	Très large gamme de polymères suite à une fonctionnalisation NHS.	Lipase, ¹⁰⁹ Anticorps, ¹¹⁰ Pectinase ¹¹¹ ...
Hydroxyle	Les fonctions hydroxyles doivent être activées via une réaction avec du 1,1'-carbonyldiimidazole ¹¹²	Surfaces contenant du PVA	α -Amylase, ¹¹³ Peroxydase de raifort, ¹¹⁴ Collagène. ¹¹⁵

Tableau 5 : Grandes familles de fonctions chimiques utilisables sur les surfaces polymères pour procéder au greffage covalent de protéines

Une autre voie de greffage, importante à décrire car utilisée dans ce projet, consiste à utiliser les fonctions thiols au lieu des groupements amines. Dans les protéines, les thiols sont uniquement présents au niveau de la chaîne latérale des résidus de cystéine, un acide aminé relativement peu présent dans les protéines.¹¹⁶ Ces fonctions réactives peuvent permettre le greffage des protéines en surface par un processus dit de chimie click en réagissant avec des alcènes.³⁴ Cette méthode nécessite une fonctionnalisation préalable de la surface avec des groupements réactifs qui sont le plus souvent des maléimides. La réaction thiol-maléimide (Figure 10) a été largement étudiée^{117,118} et présente plusieurs atouts pour le greffage de protéines. Ainsi, le greffage des protéines peut se faire de façon rapide et à température ambiante, préservant le plus souvent la fonctionnalité de ces protéines. De plus, si la structure tri-dimensionnelle de ces protéines est connue, et pour peu que ce résidu cystéine ne soit pas impliqué dans un pont disulfure protéique,¹¹⁹ il est alors possible de connaître l'accessibilité de cette cystéine, et donc d'orienter le greffage de la protéine sur la surface.⁷⁹ Il est également possible d'introduire par génie génétique une cystéine dans la séquence d'une protéine, de

manière contrôlée. Ce point est très important car il constitue un des éléments clés du projet d'étude décrit ici.

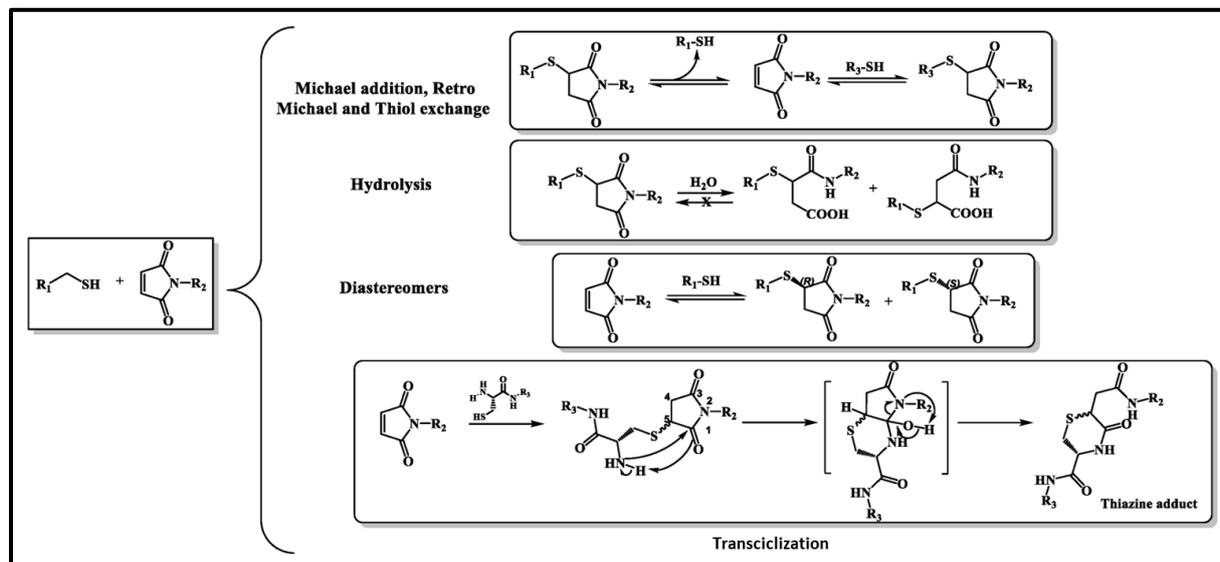


Figure 10 : Réaction d'addition Michael thiol-maléimide, réarrangements et produits formés.¹²⁰

Toutefois, la présence de fonctions thiols à la surface de la structure d'une protéine peut engendrer la formation de ponts disulfures inter-protéines, et donc rendre la fonction thiol non disponible pour leur immobilisation. Les ponts disulfures devront alors être réduits chimiquement avant le greffage pour permettre la réaction thiol-maléimide. Une méthode classique consiste à incuber les protéines en présence d'un agent réducteur tel que le tris(2-carboxyethyl) phosphine) (TCEP).¹²¹ La seconde problématique, majeure cette fois, réside dans le fait que, bien que covalente, la liaison thiol-maléimide peut être réversible.¹²² Il existe une « concurrence » entre les fonctions thiols qui vont venir se remplacer les unes les autres dans la liaison thiol-maléimide. Il est donc possible de décrocher les protéines greffées en surface par cette méthode en mettant la surface en présence d'une solution contenant des thiols qui eux n'appartiendraient pas à une protéine. Il a été mis en évidence dans l'étude de Huang et al.¹²³ qu'il est possible de stabiliser cette liaison en appliquant une tension stérique précise sur le lien thiosuccinimide. Une méthode beaucoup plus simple et largement utilisée dans la littérature consiste à ouvrir le cycle maléimide par hydrolyse pour stabiliser la liaison.¹²⁴

3. Greffage avec régio- ou chimio-sélectivité

Une problématique majeure associée à l'immobilisation de protéines est la perte de fonctionnalité dans le processus. Des méthodes de greffage covalent existent (I.C.2 page 37)

mais elles sont non sélectives et mènent à des orientations aléatoires des protéines en surface.^{125,126} Pour assurer le maintien des propriétés des éléments greffés il est important que le point d'ancrage soit bien maîtrisé et localisé. Ces méthodes n'ayant pas été nécessaires dans ce projet, elles sont décrites de façon succincte ici, (Tableau 6) mais une description beaucoup plus approfondie en a été faite dans la revue.¹²

Méthode	Principe	Exemples de protéines greffées par ce procédé
N-Terminal	Amine primaire disponible sur la plupart des protéines exprimées. L'abondance de lysines dans la séquence peut diminuer la sélectivité mais le processus reste possible car l'amine terminale est moins basique.	Rnase, GFP, Avidine. ¹²⁷
C-Terminal	L'utilisation de la fonction carboxylique en bout de chaîne nécessite une modification préliminaire pour garantir une bonne efficacité de greffage.	Protéine A, ¹²⁸ Protéines contenant le motif CaaX modifiées par la PTFase. ¹²⁹
Acides aminés internes non naturels	Introduction d'un acide aminé non naturel dans la séquence de la protéine avant sa production.	GFP, ¹³⁰ TGF- β 1. ¹³¹
Unités glycosidiques oxydées	Couplage d'unités glycosidiques avec des fonctions générées en surface, comme des amines.	Anticorps Anti CD34, ¹³² fragments d'anticorps. ¹³³
Esters boroniques à partir d'unités glycosidiques	Greffage non-covalent par complexation métallique ou covalent par réaction avec des unités saccharidiques.	Peroxydase de raifort. ¹³⁴
Groupes exogènes	Ajout de groupes fonctionnels non-naturels dans la séquence de la protéine.	Biomolécule protéique. ¹³⁵

Tableau 6 : Méthodes de greffage de protéines avec régio- ou chimiosélectivité

4. Caractérisation

La caractérisation à la suite du greffage est essentielle pour valider le succès du procédé ainsi que pour étudier le comportement de l'enzyme greffée. Il existe différentes méthodes en fonction des éléments à étudier (Figure 11) mais la difficulté majeure réside dans le fait que la quantité de protéines ou d'enzymes greffées est très basse (dans le cas de surfaces non poreuses) et qu'elles ont une faible stabilité ce qui vient limiter le nombre de techniques de caractérisation disponibles. Ce travail de caractérisation devient d'autant plus compliqué dans le cas de surfaces polymères car ce matériau vient encore limiter le nombre de techniques de caractérisation disponibles.

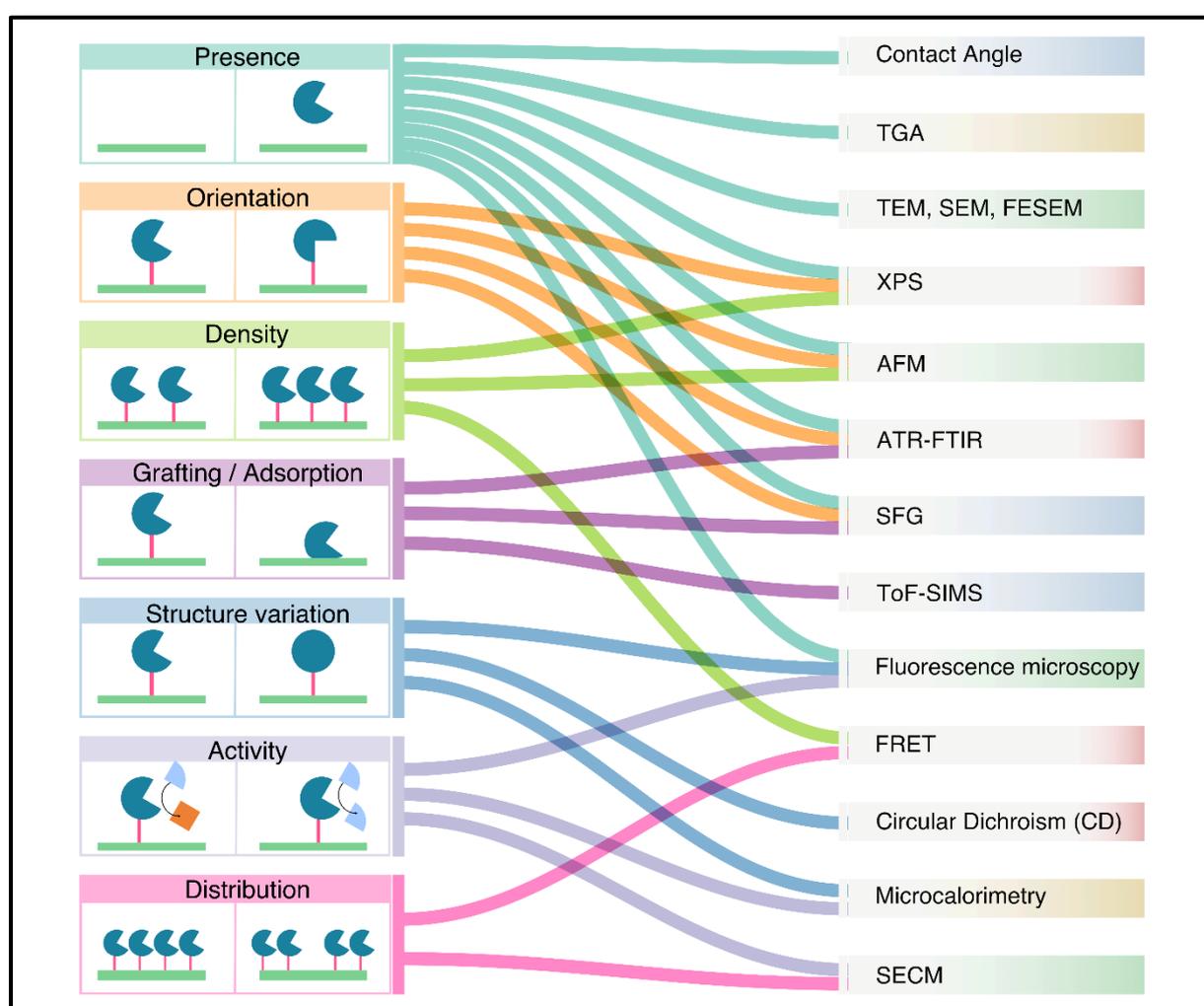


Figure 11 : Méthodes applicables pour les différentes caractérisations associées au greffage d'enzyme en surface.¹²

Méthode	Principe	Avantages	Inconvénients
Angle de contact	Caractérisation de la mouillabilité de surfaces solides par mesure de l'angle de contact à l'interface entre une goutte de liquide, l'air et la surface solide.	Facile d'accès Pas de préparation requise Non destructif	Multiples mesures requises
XPS	Bombardement de la surface avec des rayons X ayant des longueurs d'ondes très spécifiques entraînant la rétro-diffusion d'électrons cœurs. Chaque électron a une énergie spécifique de l'atome dont il provient. Cette méthode permet de déterminer la composition atomique de la surface avec une profondeur maximale de 10 nm.	Possiblement quantitatif	Besoin d'expertise
AFM	Une pointe navigue ou tape sur la surface avec sa pointe. Son mouvement est détecté grâce à une photodiode ce qui permet de cartographier, entre autres, la topologie de la surface.	Facile d'accès Large variété d'analyses possibles	Vigilance requise dans l'analyse des résultats Expertise requise pour les analyses non classiques
Sum Frequency Generation (SFG)	Deux faisceaux laser se croisent sur une interface générant un faisceau avec une fréquence égale à la somme des deux lasers d'origine.	Préparation d'échantillons très simple Non destructif Efficace sur des monocouches	Interprétation des résultats complexe

ATR-FTIR	Mesure du spectre d'absorption infrarouge de molécules. Les différents types de liaisons dans les molécules entraînent des variations du signal.	Facile d'accès Non destructif	Peu sensible
Spectroscopie de fluorescence	Un faisceau de lumière excite les électrons et provoque l'émission de lumière. La lumière émise rencontre un détecteur ce qui donne un signal.	Facile d'accès Très sensible	Besoin d'un groupement fluorescent
TGA	Mesure de la variation de masse de l'échantillon en fonction du temps et du profil de température appliqué.	Facile d'accès Pas de préparation requise	Destructif Peu sensible

TEM, SEM FESEM	<p>TEM : transmission d'électrons à travers un échantillon et utilisation des électrons résultants pour imager l'échantillon. Elle peut atteindre des résolutions de 0,1 nm dans les meilleurs cas.</p>	Facile d'accès	Préparation des échantillons requis
	<p>SEM : L'échantillon est balayé à l'aide d'un faisceau focalisé d'électrons. Il renseigne sur la topographie de l'échantillon mais aussi sur sa composition grâce aux électrons rétrodiffusés et aux rayons X caractéristiques. La résolution est comprise entre 1 dans de rares cas et 20 nm.</p>	Très sensible	Interprétation des résultats complexe dans certains cas
	<p>FESEM : Même principe que la SEM mais il utilise un seul filament de tungstène comme source d'électrons. Cette différence permet une meilleure résolution (2-3 nm) et aussi une plus faible pénétration dans l'échantillon.</p>		
CD	<p>Basé sur l'absorption différentielle de la lumière polarisée gauche ou droite. Les molécules chirales avec une activité optique absorbent préférentiellement l'une des deux lumières polarisées. En utilisant de la lumière UV, cette méthode peut être utilisée pour obtenir des informations sur la structure secondaire des protéines.</p>	Facile d'accès	Peu sensible
		Pas de préparation requis	
		Non destructif	

Micro-calorimétrie	Mesure de l'enthalpie. Quand une réaction chimique a lieu proche de la surface, une variation d'énergie est observable du fait de la libération ou de l'absorption de chaleur. Cette méthode permet de suivre en temps réel les réactions chimiques catalysées par les enzymes en surface.	Sensible Suivi de la catalyse en temps réel	Préparation des échantillons complexe
FRET	Excitation d'un premier chromophore qui, quand il se relaxe, libère de l'énergie qui peut être reçue par un second chromophore qui émettra de la fluorescence à son tour. Cette méthode ne fonctionne qu'avec des chromophores compatibles et ne donne que des informations sur la distance entre ces deux éléments.	Très sensible	Sensible au pH Requiert un tag fluorescent
SECM	Mesure du comportement électrochimique local aux interfaces. En déplaçant la pointe, il est possible de cartographier la surface. Cette méthode n'est applicable que dans des conditions aqueuses.	Non destructif Quantitatif	
ToF-SIMS	La surface est bombardée avec des ions primaires. Des ions secondaires sont émis et analysés en fonction de leur temps de vol pour déterminer leur provenance. Cette méthode est utilisée pour cartographier la composition de la surface.	Très sensible Cartographie de surface	Destructif Résultats complexes à interpréter

Tableau 7 : Récapitulatif des méthodes disponibles et de leurs principales caractéristiques.

a) Révéler la présence de protéines en surface

La plupart des méthodes décrites dans ce chapitre pourraient être utilisées pour détecter la présence de protéines en surface mais certaines sont plus efficaces et simples à mettre en place.

La mesure d'angle de contact sur un tensiomètre est très simple à mettre en place sur n'importe quelle surface lisse mais il faut effectuer 10 mesures pour amortir la forte variance des résultats. L'hydrophilicité de la surface est le plus souvent modifiée par l'immobilisation de protéines. Il est même possible de différencier les protéines immobilisées car l'hydrophilicité dépend des groupes fonctionnels contenus dans celles-ci.¹³⁶ Une grosse limitation de cette méthode est cependant de choisir un bon couple surface/protéine afin que la tension de surface du polymère soit suffisamment différente de celle de la protéine immobilisée.¹³⁷ Il est aussi nécessaire de disposer d'un grand échantillon (plusieurs cm²) afin de pouvoir répéter les mesures et obtenir une valeur moyenne fiable.

Les techniques de microscopie électronique comme la microscopie électronique à transmission, la microscopie électronique à balayage et la microscopie électronique à balayage à émission de champ (TEM, SEM et FESEM) peuvent être utilisées pour détecter la présence de protéines sur certaines surfaces. Même si la TEM et la SEM ne sont pas suffisamment précises pour observer des protéines seules, elles peuvent être utilisées pour détecter des variations de tailles de nanoparticules sur lesquelles des protéines sont greffées.¹³⁸ La FESEM, au contraire, peut détecter des protéines uniques, il est donc possible de l'utiliser comme une méthode d'imagerie directe.¹³⁹

La microscopie de fluorescence peut aussi être intéressante mais elle requiert l'utilisation de protéines fluorescentes. Cette analyse a été utilisée par Vasile et al.⁶³ pour montrer que le greffage est une technique d'immobilisation bien plus efficace que l'adsorption sur des surfaces polyfluorure de vinylidène (PVDF). Il est aussi possible de procéder au greffage d'anticorps sur les protéines immobilisées et de faire une imagerie indirecte mais ces procédés sont beaucoup plus complexes à mettre en place.

La « Spectrométrie photoélectronique à rayons X » (XPS) est une des techniques très répandue dans la caractérisation de protéines sur des surfaces. Il suffit de comparer les spectres des surfaces obtenus avant/après immobilisation pour observer des différences dans leur composition. Il est notamment possible de quantifier les liaisons C-N, C=O et C-O en surface.¹⁴⁰

La « Microscopie à force atomique » (AFM) est la seconde technique majeure dans ce domaine. La méthode requiert des surfaces planes ce qui peut être contraignant, mais une fois en place elle permet de faire beaucoup plus que de simplement détecter des protéines en surface. Dans l'objectif de simplement détecter des protéines, le mode tapping peut notamment être utilisé pour détecter des fibronectines immobilisées sur des surfaces de verre.¹⁴¹

Il est aussi possible d'utiliser l'analyse thermogravimétrique (TGA) qui est relativement simple. Dans cette méthode, la perte de masse de l'échantillon est mesurée au fur et à mesure de l'augmentation de la température. En présence de protéines, un pic est observé à 100 °C correspondant à l'évaporation de l'eau contenue dans celles-ci.

b) Discriminer l'adsorption du greffage et étudier l'orientation

Il est très important de différencier adsorption et greffage car cela va avoir un fort impact sur l'orientation et la mobilité locale de l'enzyme. Cette caractérisation est d'autant plus importante que certaines protéines, comme l'hydrophobine (HFBI), sont résistantes à la désorption une fois qu'elles ont formé une monocouche en surface.¹⁴² La méthode de routine consiste à laver abondamment la surface avec des conditions de pH variées, ou de force ionique élevée puis à analyser à nouveau la surface pour détecter la présence de protéines.

Un autre aspect intéressant à étudier est celui de l'orientation des protéines en surface. Pour cette caractérisation, il est possible d'utiliser l'analyse de temps de vol – spectrométrie de masse (ToF-SIMS) et de coupler cette analyse avec la résonance plasmonique de surface (SPR). Dans ce cas il faut traiter la surface avec du trialose à la suite du greffage de protéines et comparer les résultats obtenus avant/après greffage. Quand les protéines sont immobilisées de façon aléatoire, le trialose augmente la corrélation entre les résultats de ToF-SIMS et SPR qui montrent des comportements différents en fonction de l'orientation des protéines. Dans le cas d'un greffage spécifique, les protéines seront orientées en surface ce qui n'est pas le cas avec de l'adsorption.^{143,144}

c) Structure de la protéine immobilisée

Des modifications de structure des protéines/enzymes, même minimales, peuvent totalement modifier leur activité biologique. Il est nécessaire pour certaines applications d'avoir la certitude que les objets greffés n'ont subi aucune modification pendant le processus.

Il peut être possible dans des cas particuliers d'utiliser le dichroïsme circulaire (CD) en comparant les résultats obtenus sur différentes surfaces comme le quartz et le Téflon par

exemple.¹⁴⁵ La méthode peut aussi être utilisée dans certains cas pour analyser les modifications de structures secondaires et tertiaires.¹³⁸

d) Densité de greffage

Le sujet de cette thèse portant sur une variation apparente de la densité de greffage des enzymes par étirement de la surface, il est utile de connaître les solutions permettant d'étudier la densité enzymatique en surface. L'XPS peut être utilisée pour cette problématique. Comme vu précédemment, cette méthode peut être utilisée pour suivre les différentes étapes de modification de la surface⁶⁶ et ce sur différents types de polymères comme le polyéthylène (PE)¹⁴⁶ ou même des polymères électro actifs.¹⁴⁷ En étudiant l'intensité des bandes correspondant à différents types de liaisons il est possible de connaître la densité de surface de cette liaison. Pour avoir des résultats solides, il est nécessaire de corréler les résultats de différents types de liaisons. Dans le cas des enzymes, il peut être intéressant de corréler ces résultats avec ceux obtenus par mesure d'activité enzymatique.^{146,148}

L'AFM peut aussi être une solution envisageable. Il est possible de détecter en surface la présence d'agrégats par l'observation d'objets qui sont plus gros qu'une protéine.⁶⁶ En utilisant le mode spectroscopie de force il est possible de scanner la surface molécule par molécule pour avoir une image précise de la répartition des protéines en surface.¹⁴⁹

La technique du FRET (Förster Resonance Energy Transfer) est une technique utilisable mais complexe à mettre en place, elle ne fonctionne qu'avec des protéines spécifiques. Pour cette raison, cette méthode est surtout utilisée pour étudier les interactions entre protéines dans des matériaux biologiques.¹⁵⁰

e) Distribution des protéines en surface

Quand le greffage n'atteint pas la saturation de la surface disponible, il peut être utile de vérifier si les protéines sont greffées de façon homogène ou si elles forment des îlots. Comme décrit plus haut, il est possible d'utiliser le FRET pour détecter la présence de protéines comme cela a été fait par Resnier et al.,¹⁵¹ mais la méthode reste complexe.

La SEM peut être utilisée, pour observer des zones et non des protéines individuelles, sur des supports comme de PVDF ou le PET mais il est nécessaire de métalliser la surface au préalable.¹⁵² Cette approche de microscopie permet aussi de réaliser une cartographie des protéines immobilisées en surface sans avoir à utiliser de marqueurs.

f) Activité enzymatique

L'immobilisation d'enzyme sur une surface peut être délétère pour leur activité catalytique, soit parce que ce greffage applique des contraintes sur leur structure tridimensionnelle, modifiant ainsi la distance ou l'orientation des résidus catalytiques, soit parce que cela gêne la mobilité de boucles impliquées par exemple dans la reconnaissance avec leur substrat, soit parce qu'à la suite de cette immobilisation, le site catalytique est inaccessible pour le substrat de l'enzyme. Il est donc important de s'assurer que l'enzyme immobilisée conserve son activité.

La méthode la plus commune est de suivre la dégradation d'un substrat chromogénique par l'enzyme par spectroscopie UV-Vis. Le suivi d'activité enzymatique doit être effectué comme pour des enzymes libres. Cette méthode est très facile à mettre en place s'il y a des substrats disponibles commercialement. C'est le cas du 4-nitrophényl- β -D-xylotrioside (X_3 .pNP) qui, une fois hydrolysé par une xylanase, va libérer du para-nitrophénol absorbant à 401 nm.⁷ Le suivi d'activité enzymatique des O-glycoside hydrolases (GH) peut aussi être fait avec de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) (Figure 12) ou toute autre méthode colorimétrique.

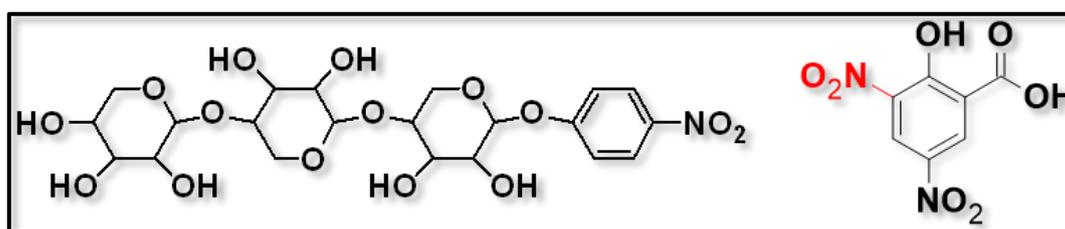


Figure 12 : Sur la gauche : X_3 .pNP. Sur la droite : Acide 3,5-dinitrosalicylique utilisé pour les « tests DNS ».

Dans les cas où cette première méthode chromogénique n'est pas disponible, l'activité enzymatique peut être détectée, mais pas quantifiée, par SECM. Cette méthode a cependant l'avantage significatif de localiser l'activité en surface. C'est ce qui a été démontré par Glidle et al.¹⁵³ en comparant les résultats obtenus par SECM et XPS dans le cas de greffages inhomogènes d'HRP (Horseradish peroxydase).

g) Techniques transversales

Certaines méthodes peuvent donner de multiples informations en une seule analyse. C'est le cas lorsque l'on couple une méthode de SFG à une analyse ATR-FTIR pour étudier l'orientation d'enzymes greffées en monocouche.^{79,154} Un microscope SFG a aussi été développé pour coupler les deux analyses précédentes avec la mesure d'activité enzymatique,¹⁵⁵ ce qui permet

d'obtenir des informations sur l'orientation des enzymes, leur activité, leur structure et leur stabilité.

La mesure d'activité enzymatique peut à elle seule permettre la quantification des enzymes en surface mais aussi l'étude de leur stabilité dans le temps, à condition que l'enzyme immobilisée ait un comportement identique à celui de l'enzyme libre. Cette méthode peut aussi donner une information sur l'homogénéité d'orientation à la suite du greffage et sur l'impact du greffage sur le comportement de l'enzyme. Il est par exemple possible de suivre, par évolution de l'absorbance à 420 nm, l'évolution de la concentration en H₂O₂ due à la présence de peroxydases.¹⁵⁶

Une dernière méthode consiste à étudier la surface avec des méthodes indirectes. C'est notamment ce qui a été fait par Grosjean et al.¹⁵⁷ et par Huan et al.¹⁵⁸ après avoir greffé des sondes sur les protéines immobilisées et les avoir étudiées respectivement par SPR et par suivi de potentiel zeta.

D. Espaceurs

1. Généralités

Connus sous leurs dénominations anglaises « linkers » ou « spacers », les espaceurs sont des éléments qui sont greffés de façon covalente sur le support en amont du greffage de protéines. Ils permettent ainsi d'immobiliser une protéine de manière indirecte. Les espaceurs peuvent être d'origine chimique ou biologique, de taille variable, rigides ou flexibles.

L'utilisation d'espaceurs présente plusieurs avantages. Comme vu précédemment, (I.C page 35) le greffage de protéine sur des surfaces rencontre plusieurs problématiques (contrôle de l'orientation au moment du greffage ; potentielle proximité entre point d'ancrage et poche catalytique ; transitions de phase et cristallinité potentielles des surfaces polymères) dont certaines peuvent être résolues par l'utilisation d'espaceurs.

La gamme d'espaceurs utilisables étant très large, il est possible de les faire réagir avec de nombreux groupes fonctionnels sur la surface à traiter. Il est aussi à noter que les espaceurs sont bifonctionnels. Ils peuvent donc se greffer par une extrémité à la surface et par l'autre à la protéine ciblée par le biais de deux fonctions chimiques différentes, et donc gagner en spécificité de greffage. Ce phénomène est largement mis en valeur par Kujawa et al.¹⁵⁹ dans une étude où différents espaceurs sont greffés sur une surface céramique. Tous les espaceurs de

cette étude sont greffés avec les mêmes réactions chimiques, ils ont cependant tous des extrémités secondaires différentes. Cette étude montre que des fonctions secondaires vont favoriser le greffage ou l'absorption des protéines en surface et que la longueur des espaceurs va aussi avoir une grande influence sur la quantité de protéines immobilisées ainsi que sur leur activité finale.

Les espaceurs sont souvent considérés comme une solution pour fonctionnaliser des surfaces en amont du greffage. C'est notamment ce qui a été fait par Leung et al.¹⁶⁰ dans une étude où du polyéthylène glycol (PEG) a été greffé sur une surface polydiméthylsiloxane (PDMS). La fonction hydroxyle en bout de chaîne PEG a ensuite été convertie en groupe N-hydroxysuccinimide (NHS). La surface PDMS obtenue est hydrophile et ses fonctions NHS pendantes la rendent réactive avec les amines des chaînes latérales des lysines d'une antithrombine-héparine.

Au-delà de la simplification du protocole de greffage, les espaceurs ont une réelle influence sur l'activité finale des protéines greffées. L'activité catalytique des enzymes est décrite en détail plus loin dans ce chapitre bibliographique, (I.E page 56) mais il est à noter que l'orientation du site catalytique, l'espace conformationnel et le maintien de la conformation des enzymes sont trois facteurs qui impactent fortement l'activité catalytique. Les espaceurs, en mettant une distance entre les enzymes et la surface, limitent les interactions non spécifiques et ont donc un impact positif sur ces trois facteurs.

Les espaceurs sont greffés sur la surface à traiter et forment une couche supplémentaire. Si certains espaceurs, comme ceux dérivés du glutaraldéhyde, n'auront qu'un impact très limité sur les propriétés de surface du fait de leur petite taille,⁶⁶ d'autres espaceurs plus grands vont entraîner une forte augmentation de l'hydrophilicité. C'est pour cette raison que des espaceurs à base de PEG sont souvent utilisés, car ils vont faciliter l'approche des protéines, qui sont hydrophiles, et donc leur greffage.¹⁶¹ Les espaceurs permettent aussi un bon contrôle de la régio-spécificité du greffage et donc de l'orientation catalytique vers le milieu aqueux pour favoriser l'accessibilité au substrat des enzymes ce qui accroît leur activité. Vallières et al.¹⁴¹ ont mis en avant ce phénomène en greffant des fibronectines sur des surfaces de silice fonctionnalisées avec deux espaceurs ayant des fonctions en bout de chaîne différentes, ce qui a entraîné une modification de l'orientation finale des fibronectines.

L'utilisation d'espaceurs beaucoup plus gros peut aussi être intéressante, c'est notamment le cas des ensembles biotine-avidine,¹⁵⁶ ou biotine-streptavidine¹⁴⁴. Ces espaceurs sont composés

d'une petite molécule, la biotine, qui va être immobilisée à la surface, le plus souvent par réaction avec des fonctions NHS. Il suffit alors de produire une protéine en fusion avec l'avidine ou la streptavidine qui présentent toutes deux une très forte affinité pour la biotine. Ces protéines peuvent se lier à quatre biotines ce qui va donner un multi-ancrage en surface quasi-irréversible. L'avidine et la streptavidine, une fois immobilisées, forment une couche épaisse et hydrophile en surface sur laquelle les protéines d'intérêt peuvent venir se greffer. Grâce à l'hydrophilie de la surface, les substrats qui sont le plus souvent en solution aqueuse, vont diffuser plus facilement à proximité des protéines greffées ce qui va permettre une meilleure accessibilité au substrat et donc une meilleure activité. Le second point important est qu'il n'y aura pas de contact direct entre les protéines d'intérêt et la surface, ce qui va permettre d'éviter les phénomènes d'interactions faibles et d'adsorption qui peuvent venir perturber la structure des protéines greffées et donc diminuer leur activité.¹⁶²

Une dernière solution consiste à utiliser des espaceurs qui sont composés de deux éléments qui peuvent s'assembler de façon covalente en présence l'un de l'autre. Les protéines mVirD2, BsIA ou les paires SnoopTag/SnoopCatcher et SpyTag/SpyCatcher sont des systèmes qui appartiennent à cette classe.¹⁶³ Le système SpyTag/SpyCatcher est intéressant car il s'approche beaucoup de ce qui a été mis en place dans ce projet. Il est composé d'un peptide, SpyTag, qui en présence de sa protéine partenaire, SpyCatcher, forme spontanément une liaison isopeptidique en quelques minutes (Figure 13). La liaison résultant de cet assemblage est une liaison amide, ou isopeptidique, covalente et irréversible.¹⁶⁴

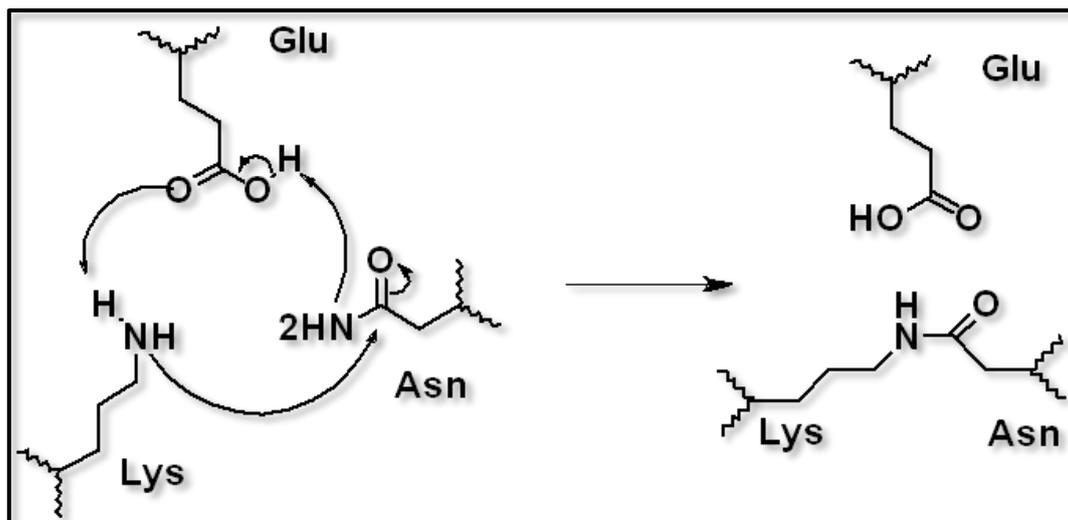


Figure 13 : Mécanisme de formation d'une liaison isopeptidique.

Ce couple peptide/protéine a été décrit dans de nombreuses études que ce soit pour répondre à des problématiques de greffage de protéines ou non.¹⁶⁵ Dans une étude de Zhang et al.,¹⁶⁶ ce système a été utilisé pour produire des protéines artificielles de type élastines avec des topologies non linéaires. Il a été montré dans cette étude que les séquences codant pour le SpyTag et le SpyCatcher peuvent être placées en fusion dans le gène codant pour la protéine artificielle voulue. En fonction de la disposition de SpyTag et SpyCatcher dans la séquence, ils ont pu obtenir des protéines artificielles circulaires, en étoile ou même en forme de H.

Le mécanisme d'assemblage SpyTag/SpyCatcher étant très efficace, de nombreuses recherches visent à créer des dérivés de ce système pour des applications spécifiques. C'est dans cette optique que Tan et al.¹⁶⁷ ont développé le couple SdyTag/SdyCatcher ou que Keeble et al.¹⁶⁸ ont développé le couple DogSpy/DogCatcher. Ce dernier couple a notamment été utilisé pour lier des protéines entre elles au niveau de boucles flexibles reliant des éléments de structure secondaires, ce qui s'avérait complexe avec le couple SpyTag/SpyCatcher.

2. Jo/In

Les protéines Jo et In ont été mises en évidence par Bonnet et al.¹⁶⁹ en 2016, la même année que le système Spytag/Spycatcher, dont elles partagent le même principe d'association. En observant la structure cristallographique de l'adhésine RrgA du pilus de *Streptococcus pneumoniae*, les auteurs ont mis en évidence une interaction covalente entre deux domaines pourtant éloignés dans la séquence codante de RrgA. Les régions des gènes codant pour Jo et In ont pu être isolées et sous-clonées dans des plasmides d'expression. Un marqueur de purification hexahistidine His-Tag a été inséré du côté N-terminal de chaque protéine pour faciliter leur purification. Les protéines His-Jo et His-In ont ainsi pu être exprimées, purifiées et étudiées par des méthodes décrites en détail.¹⁶⁹

Il a été montré que les deux fragments de protéines produits ont conservé leur capacité à s'auto-assembler à 20 °C. Cet assemblage est très efficace dans une gamme de pH allant de 6 à 8, en moins de 1 h mais la cinétique d'assemblage diminue très fortement dans des conditions très acides. Il est très probable que cette dépendance au pH soit due à la présence d'un acide aspartique (pKa entre 5 et 6) très proche de la liaison isopeptidique. Il semblerait que la déprotonation de cet acide aminé favorise la formation de la liaison amide. La température peut aussi avoir un impact important sur la cinétique d'assemblage de ces deux protéines. Ce dernier facteur a été mis en évidence en 2016 sans avoir été publié (Figure 14).

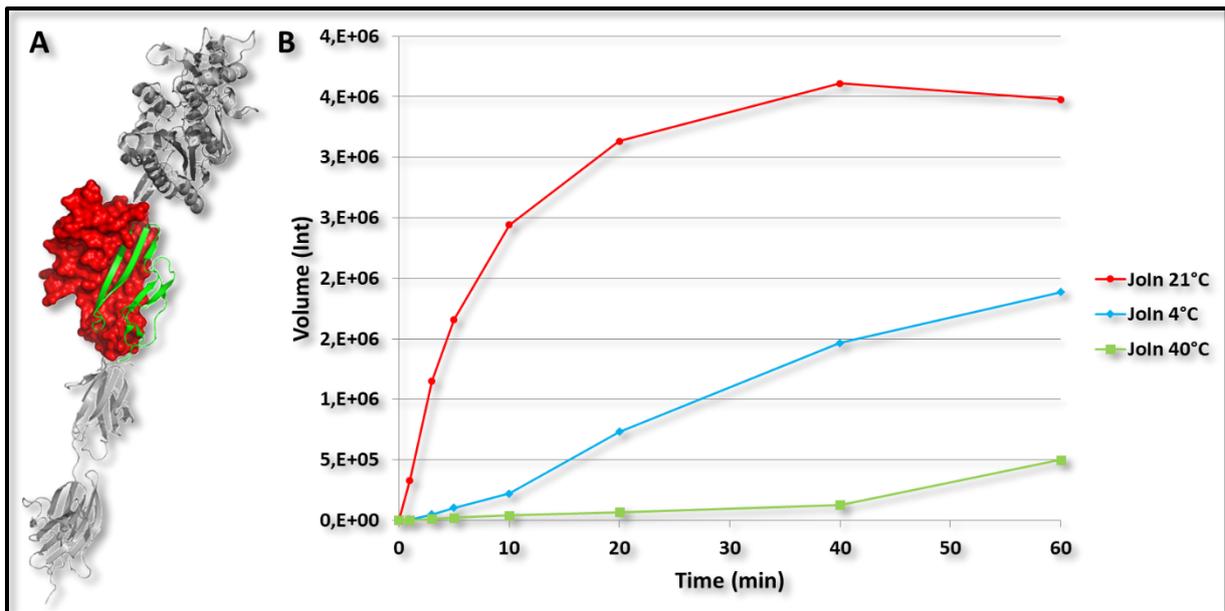


Figure 14 : A-Adhesine RrgA (*Streptococcus pneumoniae*) Jo en vert, In en rouge, adapté de Montanier et al.⁷ B-Cinétique d'assemblage Jo/In à différentes températures détecté par fluorescence sur gel SDS-Page, donnée non publiée, C.Montanier, 2016.

L'utilisation de l'espaceur Jo/In présente plusieurs caractéristiques intéressantes pour la mise en place du projet décrit ici. Etant composé de deux protéines, cet espaceur est plus volumineux (27 kDa) que des couples peptide/protéine comme SpyTag/SpyCatcher (13.7 kDa). Il reste cependant beaucoup plus petit que le couple biotine/Streptavidine (55 kDa). Cet espaceur permet de créer une distance de 6 nm entre l'enzyme et la surface, tout en restant plus petit qu'une enzyme, ce qui permettra d'avoir un excès d'espaceurs sur la surface et donc de pouvoir saturer la surface en enzymes.

Une fois la première protéine du couple greffée, la surface est recouverte d'une couche de protéines hydrophiles, ce qui n'est pas le cas lors de l'utilisation de SpyTags ou de biotines. Comme décrit plus haut (I.C.1 page 35), la couche hydrophile en surface joue un rôle prépondérant dans le greffage car elle permet une approche facilitée pour les autres protéines et donc une cinétique de greffage plus rapide. Les protéines greffées en surface permettent aussi d'éviter l'adsorption ainsi que la potentielle perte de conformation des enzymes à immobiliser ultérieurement.

L'association covalente de In en fusion avec une enzyme d'intérêt et de Jo (en solution ou immobilisé sur une surface) présente l'avantage d'être très spécifique et de former un ensemble très rigide.^{169,170} L'utilisation de l'espaceur Jo/In permet ainsi un greffage covalent d'une

enzyme de façon rapide et spécifique. Le contrôle de l'orientation de l'espaceur et sa rigidité permettent à l'enzyme d'avoir son site catalytique disponible et bien orienté pour faciliter l'accès au substrat. Du fait de la taille de cet espaceur, l'enzyme greffée est éloignée de la surface ce qui lui donne une bonne mobilité locale et un accès au substrat facilité. Il a été montré par Montanier et al.⁷ que l'utilisation de l'espaceur Jo/In pour le greffage covalent de l'enzyme In-NpXyn11A sur des billes poreuses paramagnétiques permet non seulement de conserver une activité identique à l'enzyme libre en solution, mais aussi de contrôler la densité de surface statistique de greffage et donc la distance moyenne entre les enzymes.

E. Xylanase

Ce projet ne concernant pas uniquement des spécialistes en enzymologie, il est important de décrire quelques principes ainsi que certains termes essentiels à la compréhension de ce domaine avant de décrire plus en profondeur l'utilisation des enzymes et en particulier des xylanases.

1. Généralités

Les enzymes sont des protéines capables de catalyser une réaction chimique de manière très spécialisée. Il s'agit de polypeptides qui adoptent en solution une conformation tridimensionnelle permettant la formation d'une poche catalytique à l'intérieur de laquelle des résidus vont assurer la catalyse. La réaction catalysée par une enzyme se produit en général en deux étapes : formation d'un complexe enzyme-substrat par des liaisons faibles, puis à la suite d'une réaction chimique, libération de produit et retour de l'enzyme à son état original. L'enzyme peut ensuite répéter cette réaction de nombreuses fois.

Il existe sept grandes familles d'enzymes classées en fonction des types de réactions chimiques qu'elles catalysent : oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases, translocases et ligases. L'activité catalytique des enzymes peut être dépendante ou non de la présence de composés non protéiques appelés cofacteurs. Les cofacteurs peuvent être des ions ou des molécules organiques qui vont se positionner dans la poche catalytique des enzymes et permettre leur activité. De plus une enzyme sera toujours active à un pH, une température et une force ionique déterminés. Le pH modifie les cinétiques mesurées car les enzymes possèdent un grand nombre de groupes latéraux ionisables. L'ionisation de ces groupes peut modifier les structures secondaires et tertiaires de l'enzyme mais aussi avoir un impact au niveau de la poche catalytique, modifiant l'affinité de l'enzyme pour le substrat. La température a aussi un fort

impact qui peut être à double sens. Généralement, l'activité enzymatique double tous les 10 °C jusqu'à arriver aux alentours de 50 °C où la plupart des enzymes vont perdre en stabilité et se dénaturer, entraînant une forte baisse de l'activité.

Les enzymes catalysent des réactions chimiques en diminuant leur énergie d'activation, ce qui permet aux substrats d'avoir plus facilement l'énergie nécessaire pour atteindre l'état de transition et être transformés en produits. La diminution de l'énergie d'activation accélère donc la vitesse de réaction. La vitesse de réaction (V) est dépendante de la concentration en substrat. Plus il y a de substrat disponible en solution, plus V augmente jusqu'à former une asymptote et s'approcher de la vitesse maximale (V_{Max}). La dépendance à la concentration en substrat a été décrite en 1913 grâce à l'équation dite de Michaelis-Menten. Un large excès de substrat par rapport à la quantité en enzyme permet d'être dans la condition dite saturante en substrat, condition permettant que chaque enzyme puisse à tout moment transformer son substrat (Figure 15).

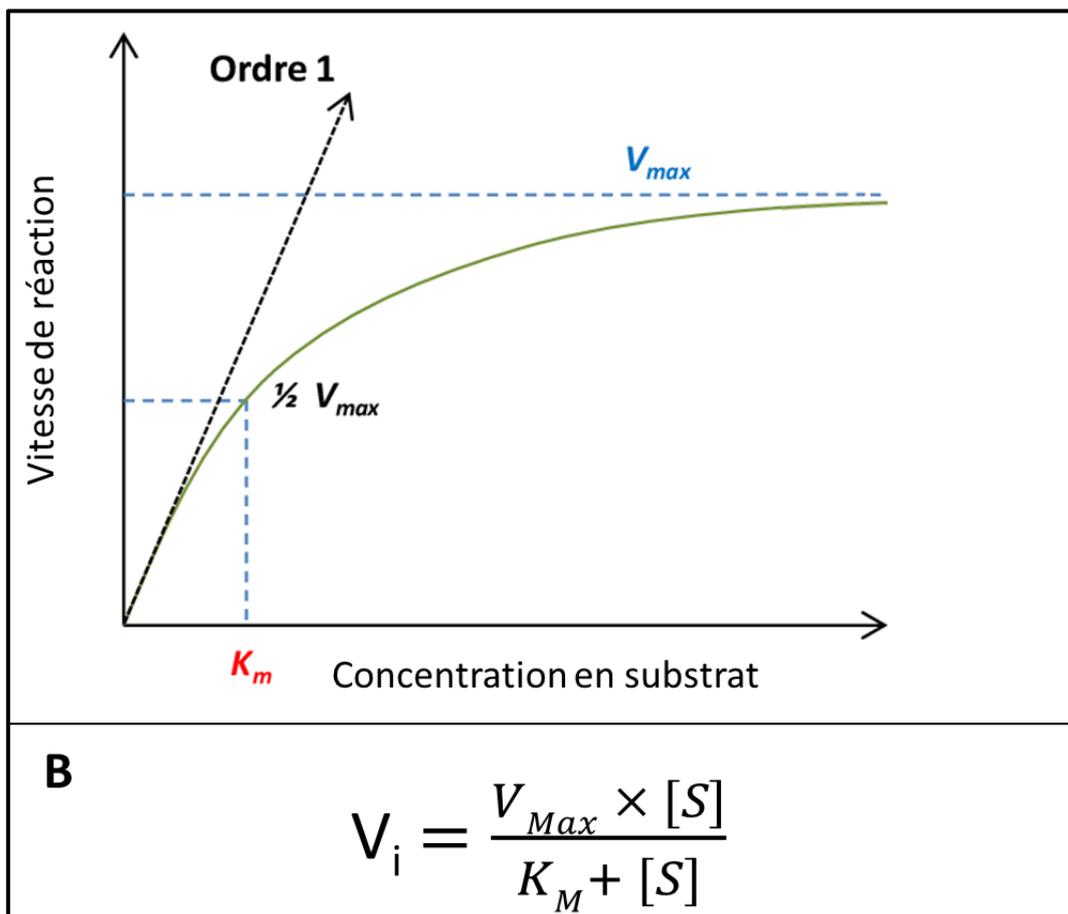


Figure 15 : A : Représentation de la cinétique de Michaelis-Menten.¹⁷¹ B : Equation de Michaelis-Menten. V_i : Vitesse initiale. V_{max} : Vitesse maximale. $[S]$: Concentration en substrat. K_M : Constante de Michaelis-Menten.

En exploitant cette réaction, il est clair qu'à une concentration saturante en substrat la vitesse de réaction sera maximale : $V = V_{\text{Max}} = k_{\text{cat}}.[E]$, avec $[E]$ la concentration en enzymes. L'activité enzymatique se mesure en $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$ noté « IU ». A l'aide de la mesure d'activité enzymatique, il est possible de déduire l'activité enzymatique spécifique en $\text{IU}.\text{mg}^{-1}$ ou $(\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}).\text{mg}^{-1}$, qui correspond à des micromoles de substrat converties par minute et par milligramme d'enzyme. Un dernier paramètre très important est la constante de Michaelis, K_M , qui correspond à la concentration en substrat nécessaire pour atteindre la moitié de V_{Max} . A l'aide de cette constante, il est possible de déterminer l'efficacité d'une enzyme par le rapport k_{cat}/K_M . L'efficacité est un paramètre intéressant car elle représente à la fois l'affinité entre l'enzyme et le substrat mais aussi la vitesse de catalyse.

La description des mécanismes et cinétiques des catalyses enzymatiques pourrait être beaucoup plus exhaustive mais il ne s'agit pas du cœur de ce projet. Il est à noter que ces sujets ont été largement étudiés et renseignés dans la littérature.¹⁷²⁻¹⁷⁴

2. *NpXyn11A*

Les xylanases sont des O-Glycoside hydrolases (GH), EC 3.2.1.8. Ce code correspond à une classification en fonction du type de substrat reconnu (EC = Enzyme commission number). Ces enzymes sont classées par homologie de séquence dans une base de données (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>) regroupant toutes les enzymes actives sur les sucres en 183 familles (Données recueillies en Août 2023). Les xylanases sont présentes majoritairement dans les familles GH10 et 11 mais peuvent aussi être trouvées dans les familles 5, 6, 8, 26, 30, 43 et 98. Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des liaisons 1,4- β - entre deux xyloses de la chaîne principale du xylane.¹⁷⁵ Le xylane (Figure 16) est le second plus abondant polysaccharide trouvé dans les parois des cellules végétales après la cellulose. C'est le principal polysaccharide parmi les hémicelluloses. Le xylane est présent dans la plupart des parois des cellules des végétaux comme les bois durs ou tendres ou même dans les plantes. Il existe une grande variabilité de structures chimiques du xylane en fonction du type de plantes dans lesquelles il se trouve. Il peut être linéaire ou réticulé,¹⁷⁶ avoir un degré de polymérisation élevé ou non¹⁷⁷ mais aussi avoir des substituants différents en chaînes latérales.¹⁷⁸ Les xylanases vont être sensibles à cette diversité chimique des xylanes, présentant des affinités très variables en fonction de la composition et de la structure du substrat. Cette particularité des xylanases, comme des enzymes en général, provient de la topologie de leur poche catalytique, capable d'accueillir ou non tel ou tel substrat. Ainsi donc, la grande variabilité des xylanes justifie une grande diversité de xylanases (2 475 GH11 classifiées dans CAZy en Août 2023).

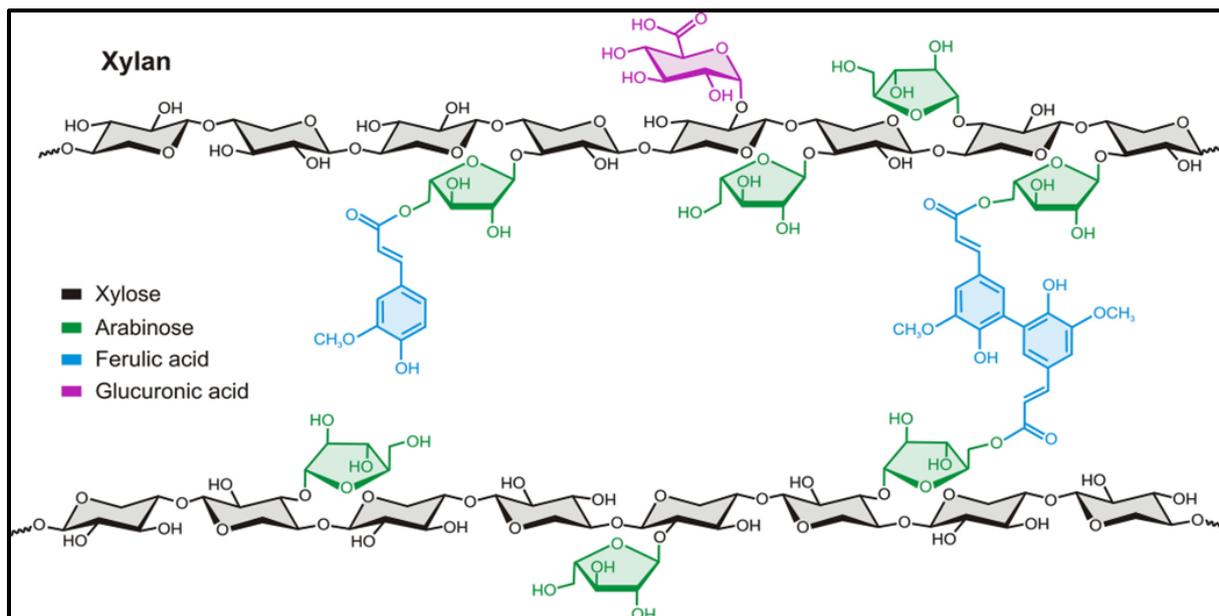


Figure 16 : Schéma d'un xylane modèle avec ses différents substituants possibles.¹⁷⁹

Une proposition de classification des xylanases a été faite en 1998 par Wong et al.¹⁸⁰ Dans cette étude, les auteurs ont proposé de classer les xylanases en fonction de leurs masses molaires, mais il a été démontré dans les années qui ont suivi que beaucoup de xylanases ne pouvaient pas rentrer dans cette classification. Un nouveau système, qui est le standard actuel, permet de classer l'ensemble des glucoside hydrolases en fonction de la structure primaire de leur domaine catalytique.¹⁸¹ Le nombre de familles incluses dans cette classification évolue avec les multiples études faites.

La xylanase utilisée dans cette thèse est la Xylanase A de la famille GH11 produite par le champignon *Néocalimastix patriciarum*. Par convention, cette enzyme est nommée *NpXyn11A*. Sa structure cristallographique a été résolue et ses paramètres cinétiques déterminés.¹⁸² Comme pour toutes les xylanases de la famille GH11, *NpXyn11A* présente un repliement β « jelly-roll ».¹⁸³ *NpXyn11A* présente une structure tridimensionnelle ressemblant à une main partiellement fermée.¹⁸³ Le domaine catalytique est formé par deux feuillets β plissés qui entourent le site catalytique.¹⁸⁴ Deux autres feuillets β viennent former les doigts et une boucle mobile forme le pouce au-dessus du site catalytique.¹⁸⁵ La mobilité de cette boucle flexible est très importante pour la fonction catalytique de l'enzyme car il semblerait que son mouvement modifie la topologie de la poche catalytique. Un mécanisme proposé par Cortés et al.¹⁸⁶ induit une boucle en position ouverte au moment de l'approche du substrat. Dans un second temps, la boucle viendrait se refermer pour favoriser la reconnaissance du substrat et des conditions de

catalyse optimales. Suite à l'hydrolyse, la boucle s'ouvrirait à nouveau pour faciliter le relargage des produits et l'entrée d'un nouveau substrat dans la poche catalytique.

La poche catalytique de *NpXyn11A* comporte 6 sites de reconnaissance numérotés -3, -2, -1, +1, +2, +3 qui peuvent interagir via des liaisons hydrogènes avec une unité saccharidique, chacun avec certaines spécificités au niveau des substituants (Figure 17). En effet, certains sites de reconnaissance peuvent s'associer avec le xylane malgré la présence de certains substituants alors que d'autres ne peuvent pas. Une fois le substrat reconnu dans la poche catalytique, l'enzyme hydrolyse la liaison glycosidique située entre les sites de reconnaissance numérotés -1 et +1. Ceci implique que les xylanases, contrairement aux xylosidases peuvent hydrolyser des liaisons en milieu de chaîne et génèrent comme produit final principalement des xylooligosaccharides de degrés de polymérisation 3 ou 4. En conséquence, les xylosidases libèrent des monomères saccharidiques alors que les xylanases libèrent des morceaux de chaîne, des oligomères ou, en fin de digestion, des monomères.

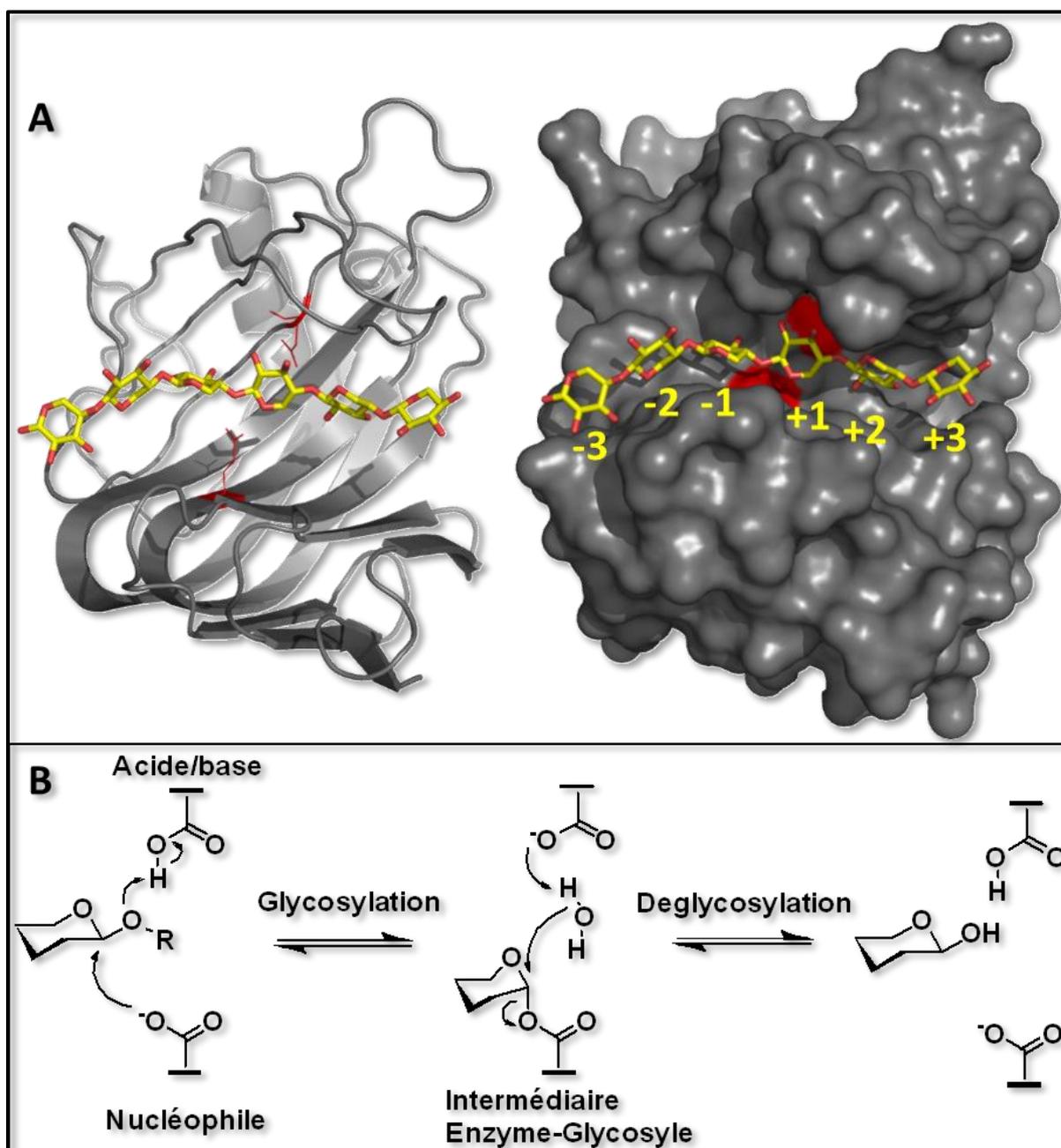


Figure 17 : A : représentation de type Richardson (à gauche) et de surface (à droite) de la structure cristallographique de NpXyn11A (PDB 2C1F) dans le site catalytique de laquelle un xylohexaose (jaune et rouge) a été superposé à partir de la structure cristallographique de la xylanase 2 de *Trichoderma reesei* en complexe avec l'oligosaccharide (PDB 4HK8). Les deux résidus catalytiques E113 et E201 de NpXyn11A sont représentés en rouge. Les sous-sites catalytiques sont numérotés de -3 à +3, l'hydrolyse ayant lieu entre le site -1 et +1. La figure a été réalisée avec le logiciel de visualisation de structure PyMol (v0.99, DeLano Scientific). B : Mécanisme de rétention de configuration anomérique de la NpXyn11A.

NpXyn11A est la xylanase modèle utilisée à plusieurs reprises comme enzyme de travail pour les études utilisant le système Jo/In en particulier à TBI.¹⁸⁷ Comme toutes les GH11, il est

possible d'utiliser un substrat chromogénique modèle, le β -D-xylotrioside de para-nitrophényle (X_3,pNP) (Figure 18). Ce substrat mime un xylotétraose, permettant ainsi la coupure de la liaison entre le troisième xylose et le groupe partant 4-paranitrophénol, dont l'accumulation dans le milieu est quantifiable par absorbance dans le visible à 405 nm.⁷ Une autre option pour étudier l'activité enzymatique de cette enzyme consiste à doser les extrémités réductrices d'un xylane en présence de *NpXyn11A* au cours du temps. Tous les sucres possèdent deux extrémités, une réductrice et une non-réductrice. L'hydrolyse du xylane génère de nouvelles extrémités réductrices qui peuvent être dosées à l'aide du DNS pour quantifier l'activité enzymatique. Le DNS est réduit par le sucre pour générer de l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique qui a un pic d'absorbance à 540 nm (Figure 18).

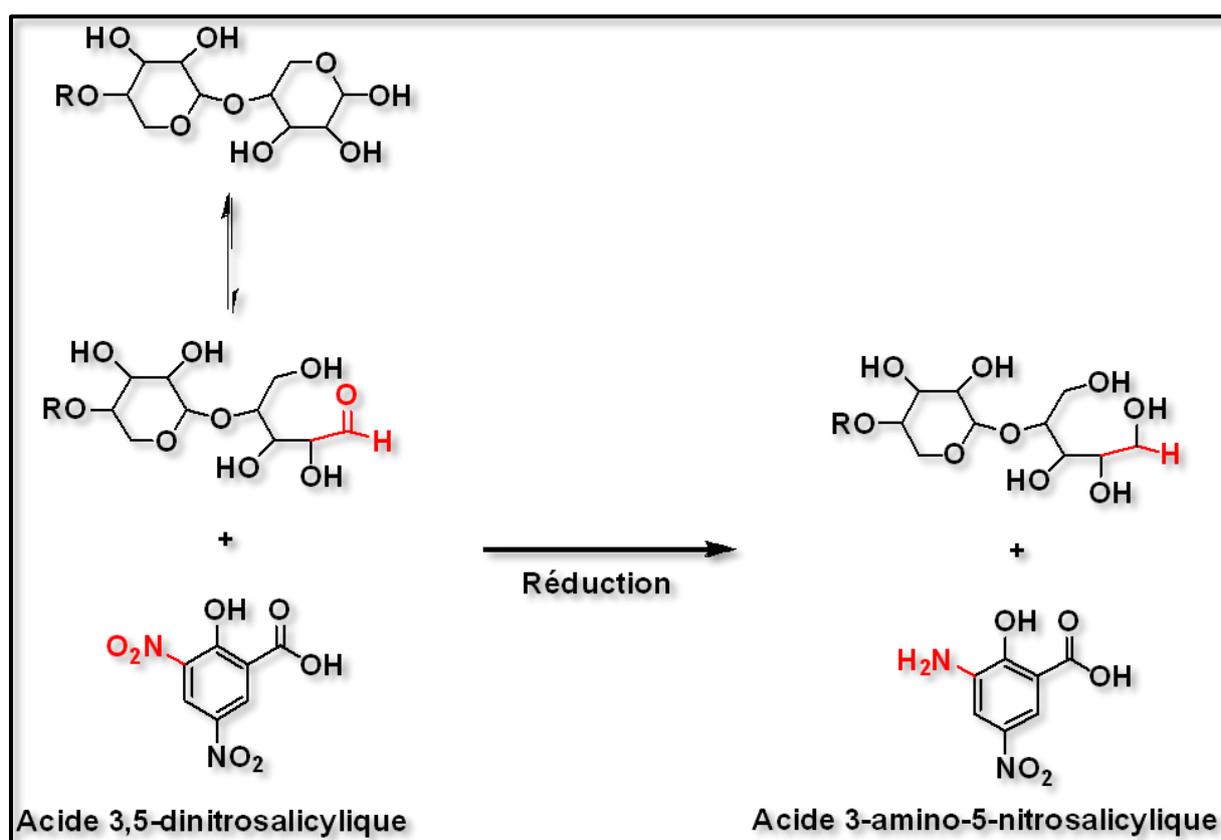


Figure 18 : Mécanisme réactionnel permettant de doser les extrémités réductrices d'un sucre en solution grâce à la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique en acide 3-amino-5-nitrosalicylique.

3. Contrôle de l'activité spécifique enzymatique

Il a été montré dans ce chapitre bibliographique que l'activité enzymatique spécifique peut être contrôlée en faisant varier les paramètres expérimentaux : température, pH et concentration en

substrat. Mais il est aussi possible de faire varier cette activité en immobilisant les enzymes sur des surfaces. En effet, une fois immobilisées, les enzymes vont voir leur mobilité locale, leur accessibilité au substrat ainsi que leur environnement proche modifiés ce qui peut impacter leur comportement que ce soit en termes d'activité enzymatique¹⁰ ou de stabilité dans le temps.¹⁸⁸

En 2019, une étude de Montanier et al.⁷ a consisté à greffer une enzyme, *NpXyn11A*, de façon covalente sur des billes de silice paramagnétiques fonctionnalisées N-Hdroxysuccinimide (NHS) par le biais de l'espaceur protéique Jo/In (Figure 19). L'originalité de ce greffage est que l'espaceur, en particulier la partie Jo, est greffé en multipoint mais l'enzyme est greffée en mono-point à la partie In de l'espaceur. Cette étude a montré que les enzymes greffées ont conservé la totalité de leur activité enzymatique spécifique sur le substrat $X_3.pNP$. Une étude enzymatique a ensuite été faite sur du xylane provenant de bois de hêtre comme substrat et l'activité enzymatique spécifique était plus faible que celle des enzymes libres. Le dernier point de cette étude a consisté à produire différentes populations de billes et à étudier l'activité des enzymes greffées. Plus les enzymes sont greffées densément plus leur activité enzymatique spécifique diminue sur le xylane. Il a aussi été montré qu'en fonction de leurs densités surfaciques, les enzymes relarguaient des produits avec des degrés de polymérisation différents. Il est donc possible de contrôler le profil des produits libérés par des enzymes en faisant varier la distance entre elles.

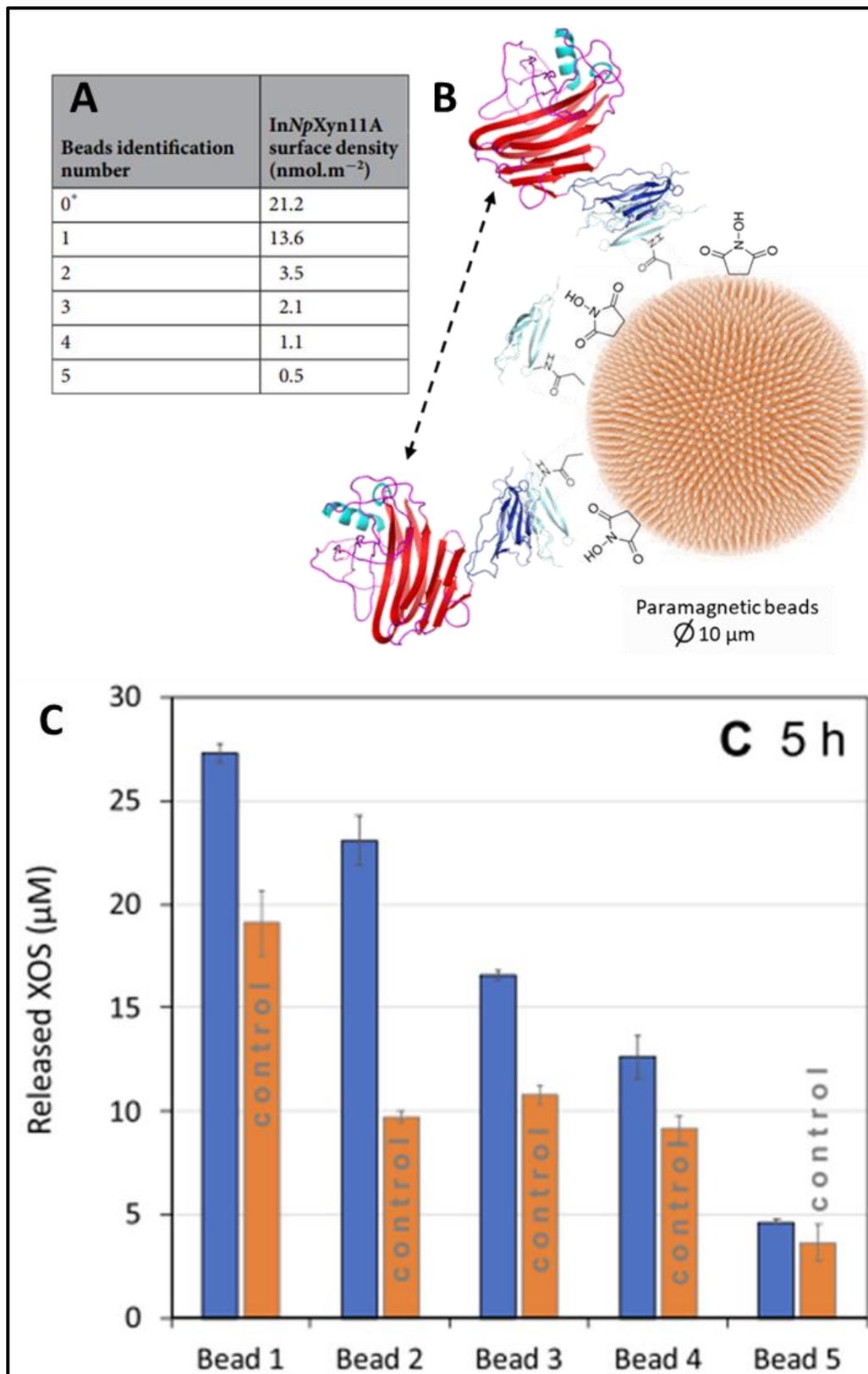


Figure 19 : Résultats provenant de l'étude de Montanier et al.⁷ A : Tableau indiquant les densités surfaciques en enzymes greffées obtenues sur différentes populations de billes. B : Schéma du greffage mis en place sur les billes. C : Quantités de xylooligosaccharides libérés après 5 h d'incubation en fonction des lots de billes utilisés et en utilisant pour contrôle des enzymes libres en solution.

Suite à cette étude, il paraît clair que la distance entre enzymes peut avoir un impact sur leur activité spécifique et que l'impact de la distance inter-enzymes peut être étudié par le biais d'une immobilisation sur une surface rigide. En contrepartie, l'étude de ce paramètre est extrêmement chronophage car elle implique la production de différentes populations de billes avec des densités de greffage différentes. C'est en tirant les conclusions de cette étude que le projet décrit ici est né et que le cahier des charges décrit plus bas s'est imposé.

4. Conclusions bibliographiques

Pour avoir des résultats comparables, l'enzyme *NpXyn11A*, la même que dans l'étude de Montanier 2019, sera utilisée. Il a aussi été démontré par différentes études^{10,189} qu'il n'est pas simple de trouver un espaceur permettant de maintenir toute l'activité enzymatique spécifique à la suite du greffage, c'est donc le même espaceur que dans l'étude de Montanier 2019, Jo/In, qui sera utilisé. La problématique majeure à résoudre étant l'utilisation d'un unique échantillon d'enzymes greffées pour étudier les effets de la distance inter enzymes, il a été décidé que le greffage se ferait sur une surface étirable. Une fois les enzymes greffées, l'étirement de la surface permettra de faire varier la distance entre les enzymes.

La surface élastique utilisée sera un élastomère dont l'étirement est totalement réversible ce qui permet de multiplier les mesures sur un seul échantillon avec des taux d'étirements différents. L'immobilisation de l'espaceur sur la surface élastomère devra rester covalente pour éviter les phénomènes de désorption mais devra être mono-point. Il a été montré dans différentes études que le greffage multipoint d'enzymes entraîne, au moment de l'étirement, des modifications de la structure enzymatique qui peuvent être bénéfiques¹⁹⁰ ou non¹⁹¹ pour l'activité mais qui peuvent surtout être irréversibles.¹⁹² Les différentes méthodes de greffage covalent ayant été décrites dans ce chapitre, il semble que l'utilisation d'un système thiol-maléimide est pertinent pour ce projet et devrait permettre d'éviter de potentiels phénomènes d'écartèlement des protéines (Figure 20). La réaction thiol-maléimide permet un greffage mono point car ni Jo ni In ne contiennent de cystéines. Cette méthode de greffage s'effectue à 20 °C en conditions aqueuses ce qui permet de préserver la conformation des protéines et enzymes même après greffage.

L'objectif de cette thèse sera donc de greffer *NpXyn11A* de façon covalente et mono-point via un espaceur Jo/In et un greffage thiol-maléimide sur une surface élastomère qui sera ensuite étirée pour étudier l'effet de la distance entre enzymes sur leur activité spécifique.

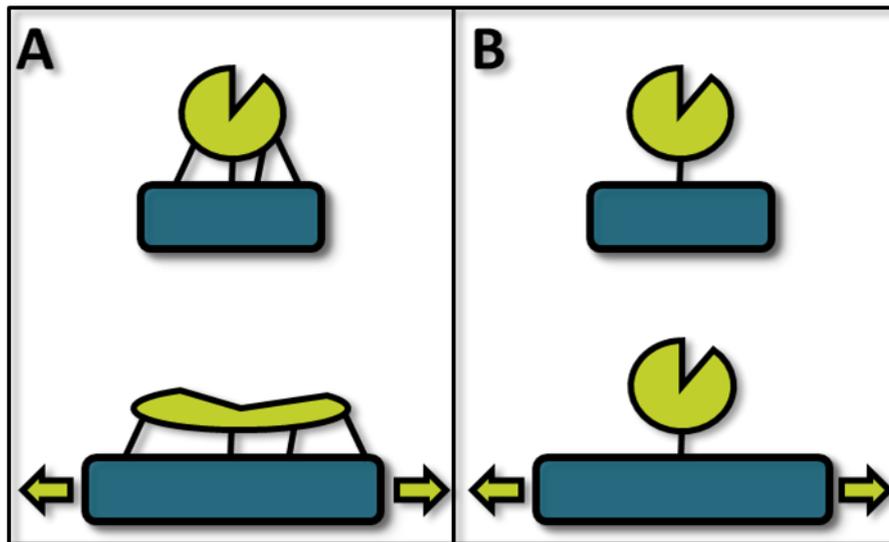


Figure 20 : Schéma mettant en évidence le potentiel effet dénaturant d'un greffage multi-point d'une enzyme sur un support élastique au moment de l'étirement de celle-ci. A : Enzyme greffée de manière multi-point sur une surface élastomère avant/après étirement. B : Enzyme greffée de manière mono-point sur une surface élastomère avant/après étirement de celle-ci.

Chapitre II : Matériel et méthodes

A. Surfaces polymères et matériel biologique

1. Synthèse de surfaces polybutadiène

Les protocoles présentés dans cette partie sont des exemples chiffrés qui ont été appliqués au cours de la thèse. La synthèse des polymères utilisés pour la réticulation d'un élastomère à base de polybutadiène est composée de sept étapes détaillées dans ce chapitre.

a) Matériel

Cis-1,4-polybutadiène (PB, 98% cis-1,4, $M_n = 340 \text{ kg.mol}^{-1}$, Dispersité : 1,9, donné par EMAC : 64130 Mauléon, France) ; acide 3-métachloroperbenzoïque (mCPBA, < 77 %, Aldrich) ; Célite® 545 (traitée avec du carbonate de sodium et calcinée, Aldrich) ; thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, ReagentPlus®, 99 %, Aldrich) ; bicarbonate de sodium (NaHCO_3 , ACS Reagent, 99,7 %, Aldrich) ; sulfate de magnésium (MgSO_4 , ReagentPlus®, 99 %, Aldrich) ; acide périodique (H_5IO_6 , > 99 %, Aldrich) ; diéthanolamine (DEA, Reagent Grade, > 98 %, Aldrich) ; acide acétique (Reagent Grade, > 99 %, Aldrich) ; sodium triacétoxyborohydrure ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, 99 %, Alfa Aesar) ; furfuryl isocyanate (Furane-NCO, 97 %, Thermo Scientific) ; di-n-butyldilaurate d'étain (DBTL, 95 %, Thermo Scientific) ; bis(2-méthoxyéthoxy) aluminohydrure de sodium (Red-Al, 70 w/w % dans du toluène, Thermo Scientific) ; acide 6-maléimidohexanoïque (90 %, Aldrich) ; triéthylamine (99,5%, Aldrich) ; chloroformiate d'éthyle (97 %, Thermo Scientific) ; azoture de sodium (NaN_3 , 99 %, Alfa Aesar).

Solvants : tétrahydrofurane (THF, 99,6 %, Thermo Fisher Scientific) ; dichlorométhane (DCM, > 99,8 % stabilisé, VWR Chemicals) ; éther diéthylique (> 98 % stabilisé, VWR Chemicals) ; chloroforme (Analytical reagent grade, 99,8 %, Thermo Fisher Scientific) ; toluène (Reagent Grade, Thermo Fisher Scientific) ; éthanol absolu (VWR) ; éthanol technique (> 96 %, VWR) ; chloroforme deutéré (99,8 % d'atomes D, Aldrich).

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été obtenus en milieu liquide à 298 K sur un spectromètre Bruker Avance 400 utilisé à 400 MHz et 100 MHz, respectivement, dans du chloroforme deutéré. Les données ont été analysées avec le logiciel MestreNova développé par MestreLab Research. Les chromatographies d'exclusion stérique ont été faites avec du THF comme éluant

à 40 °C. La ligne SEC est équipée avec une pompe Waters, un détecteur RI Waters et un détecteur de diffusion de la lumière NanoStar® de chez Wyatt. La séparation est faite avec 3 colonnes Tosoh TSK gel (300 * 7,8 mm) : G5000 HXL, G6000 HXL et Multipore HXL avec des limites d'exclusion allant de 500 à 40 000 000 Da pour une vitesse d'élution de 1 mL.min⁻¹. Le volume injecté est de 100 µL. Les masses molaires ont été estimées avec une calibration polystyrène. Les données ont été étudiées avec le logiciel Astra de Wyatt. Les analyses de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ont été faites sur un Nicolet 6700 de chez Thermo Scientific.

b) Méthodes

I- Etape 1 : PolyButadiène Aldéhyde Téléchélique (AT-PB)

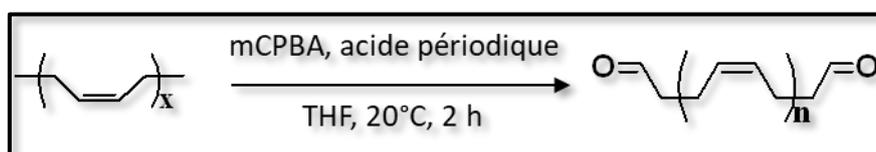


Figure 21 : Coupure oxydante du polybutadiène

20 g de PB (370,4 mmol) sont dissous dans 500 mL de THF. Le PB est ensuite époxydé par ajout goutte à goutte à 0 °C d'une solution de mCPBA (1,068 g, 2.7 mmol car pur à 70 %) dissous dans 40 mL de THF. La solution est agitée 2h à 20 °C. Une solution d'acide périodique (1,076 g, 4 mmol) dissous dans 30 mL de THF est ajoutée goutte à goutte. La solution est agitée 2h à 20 °C. Le solvant est ensuite évaporé à pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le produit obtenu est dissous dans l'éther diéthylique (150 mL). La solution est filtrée sur Célite. La solution est concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif puis lavée 2 fois avec 40 mL de solution saturée en thiosulfate de sodium (Na₂S₂O₃) dans une ampoule à décanter. La solution est lavée 2 fois avec 40 mL de solution saturée en bicarbonate de sodium (NaHCO₃) et 2 fois avec 40 mL d'eau distillée toujours dans une ampoule à décanter. Toutes les phases aqueuses sont rassemblées et une extraction est faite avec 50 mL d'éther diéthylique. Les deux phases organiques sont rassemblées puis séchées sur sulfate de magnésium (MgSO₄) et filtrées sur Célite®. Le solvant est évaporé puis le produit est séché sous vide. Le produit obtenu est jaune et visqueux. Mn = 8 800 g.mol⁻¹ ; Đ = 1,7 ; Rendement : 98% ; NMR ¹H (400 MHz, CDCl₃) : (δ, ppm) 9,77 (-CH₂-CHO), 5,39 (-CH₂-CH=CH₂-), 2,49 (-CH₂-CH₂-CHO), 2,37 (-CH₂-CH₂-CHO), 2,09 (CH₂-CH=CH-CH₂-).

II- Etape 2A : PolyButadiène TétraHydroxy Téléchélique (H4T-PB)



Figure 22 : Fonctionnalisation en bout de chaîne de l'AT-PB

16,98 g d'AT-PB ($9\,882\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) sont dissous dans 100 mL de THF sec. Sous atmosphère inerte, 3 équivalents de diéthanolamine (DEA, 0,944 mL) sont ajoutés au goutte-à-goutte puis 1,2 équivalents d'acide acétique (0,266 mL) sont aussi ajoutés au goutte à goutte. Le mélange est agité 2h à 40 °C sous atmosphère inerte puis 3 équivalents de sodium triacétoxyborohydrure ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, 2,13 g) sont ajoutés. Le mélange est agité la nuit, environ 16h, à 40 °C sous atmosphère inerte. La solution est concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif puis le produit est purifié par précipitation/dissolution dans l'éthanol/DCM trois fois. L'éthanol est au préalable refroidi avec de l'azote liquide pour être très proche de sa température de fusion de -114 °C. Les solvants sont ensuite évaporés et le produit est séché sous vide. Le rendement final est très proche de 100 %. $M_n = 10\,050\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $D = 1,7$; NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3) : (δ , ppm) 5,38 ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 3,75 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), 2,86 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), 2,78 ($-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH})_2$), 2,09 ($\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$).

III- Etape 3A : PolyButadiène TétraFurane Téléchélique (Fur₄T-PB)

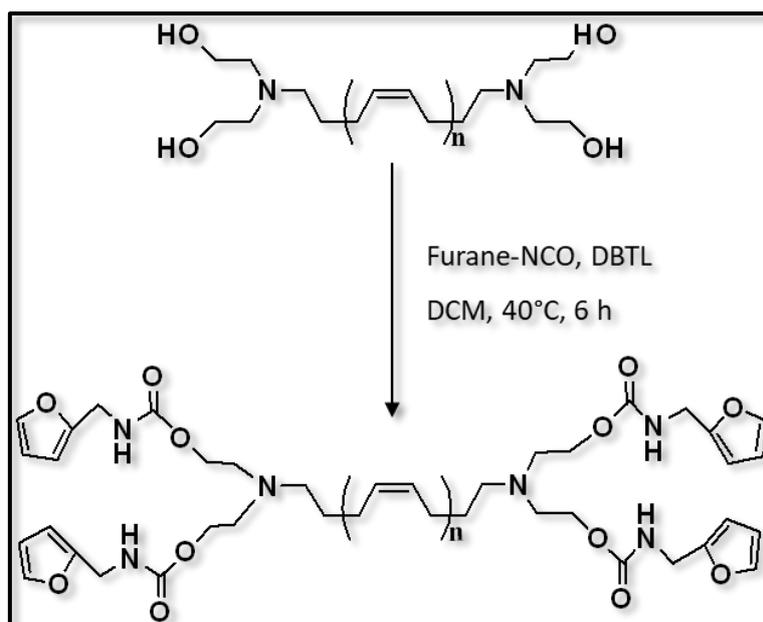


Figure 23 : Modification du H₄T-PB pour obtenir le Fur₄T-PB

16 g de H₄T-PB sont solubilisés dans du DCM sec. 1,2 équivalents de furane-NCO (0,864 mL) sont ajoutés sous atmosphère inerte puis 0,326 mmol de DBTL (203 μ L) sont ajoutés, toujours sous atmosphère inerte. La solution est agitée 6 h à 40 °C. Le mélange est ensuite concentré et purifié par précipitation/dissolution dans l'éthanol/DCM trois fois en ayant au préalable refroidi l'éthanol proche de sa température de fusion à l'aide d'azote liquide. Le solvant est évaporé puis le produit est séché sous vide. Le rendement obtenu est proche de 100 %. $M_n = 10\,500$ g.mol⁻¹ ; $\bar{D} = 1,7$; NMR ¹H (400 MHz, CDCl₃) : (δ , ppm) 7,34 (-CH=CH=O-furane), 6,31 (-CH=CH=O-furane), 6,22 (-C=CH-CH=CH-O-furane), 5,38 (-CH₂-CH=CH-CH₂-), 4,38 (furane-CH₂-NH-), 4,20 (-N-CH₂-CH₂-O-), 2,09 (-CH₂-CH=CH-CH₂-).

IV- Etape 2B : Epoxy-PolyButadiène Aldéhyde Téléchélique (AT-EPB)

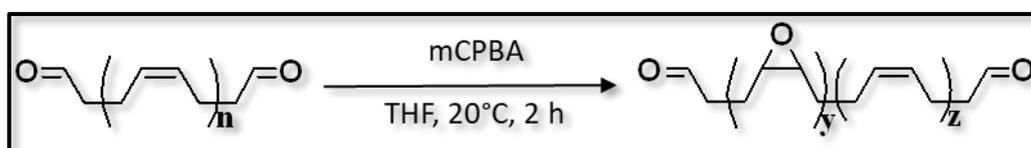


Figure 24 : Epoxydation de l'AT-PB en long de chaîne pour obtenir l'AT-EPB.

L'objectif dans ce cas particulier est d'atteindre 7 % des unités de répétition époxydées. 11,05 g d'AT-PB (8 802 g.mol⁻¹, 204,6 mmol) sont solubilisés dans 150 mL de THF. L'époxydation est faite par ajout goutte à goutte à 0 °C de mCPBA (7% du nombre de moles d'unités de répétition, 3,21 g) au préalable dissous dans 40 mL de THF. La solution est agitée 2 h à 20 °C puis le produit est purifié par précipitation/dissolution dans l'éthanol/DCM trois fois en ayant au préalable refroidi l'éthanol proche de sa température de fusion à l'aide d'azote liquide. Le solvant est évaporé puis le produit est séché sous vide. Rendement proche de 100 %, Pourcentage d'époxy de 7,2 % (déterminé par RMN). $M_n = 8\,989$ g.mol⁻¹ ; $\bar{D} = 1,7$; NMR ¹H (400 MHz, CDCl₃) : (δ , ppm) 9,77 (-CH₂=CHO), 5,38 (-CH₂-CH=CH-CH₂-), 2,92 (-CH-epoxy-CH-), 2,22 (-CH₂-CH-epoxy-CH-CH₂-), 2,08 (-CH₂-CH=CH-CH₂-).

V- Etape 3B : Hydroxy-PolyButadiène (OH-PB)

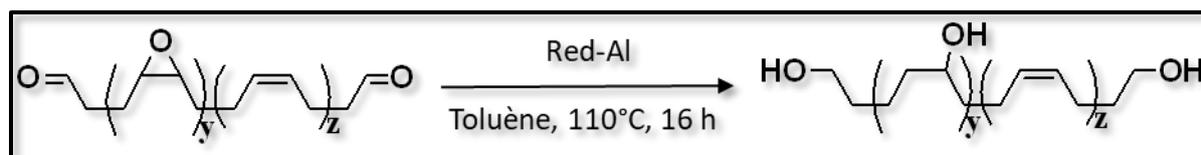


Figure 25 : Réduction des fonctions époxydes et aldéhydes de l'AT-EPB pour obtenir le OH-PB.

11,25 g d'AT-EPB ($8\,989\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 7,2 % époxy) sont solubilisés dans du toluène sec. 6 équivalents de Red-Al (25,7 mL) sont ajoutés goutte à goutte à température ambiante et sous atmosphère inerte. La solution est agitée à $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ sous reflux pendant la nuit, environ 16 h. 30 mL de toluène sont ajoutés goutte à goutte pour commencer la désactivation du Red-Al résiduel. La désactivation est poursuivie par ajout goutte à goutte de 15 mL d'éthanol puis de 5 mL d'eau distillée. La solution est ensuite séchée avec du MgSO_4 et filtrée sur Célite®. Le solvant est évaporé et le produit est séché sous vide. Rendement : 90 % ; $D = 1,7$; NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3) : (δ , ppm), 5,38 ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 3,64 ($-\text{CH}_2-\text{OH}$), 3,60 ($-\text{CH}(\text{OH})$), 2,08 ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$).

VI- Etape 3C : Maléimide isocyanate (Maléimide-NCO)

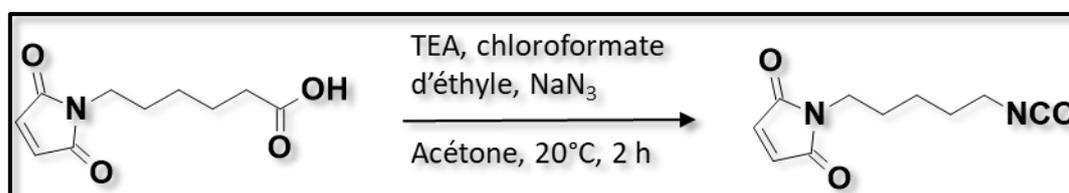


Figure 26 : Modification de l'acide 6-maléimidohexanoïque pour obtenir le maléimide isocyanate.

6 g d'acide 6-maleimidohexanoïque sont solubilisés dans 40 mL d'acétone à -5°C puis la solution est mise sous atmosphère inerte pour toute la durée de la réaction. 1,1 équivalents de triéthylamine (4,32 mL) sont ajoutés goutte à goutte. 0,9 équivalents de chloroformate d'éthyle (2,98 mL) dissous dans 20 mL d'acétone sont ensuite ajoutés au goutte-à-goutte. Le mélange est agité 10 min à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis 1 équivalent d'azoture de sodium (NaN_3 , 1,84 g) est ajouté et le mélange est agité 2 h à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La solution est ensuite versée dans 500 mL d'eau distillée. Le mélange est versé dans une ampoule à décanter et le produit est extrait 3 fois avec 40 mL de toluène. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et filtrées sur Célite. La solution est ensuite agitée 100 min à $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ sous reflux. Le solvant est évaporé et le produit est séché sous vide. Rendement 62 % ; NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3) : (δ , ppm), 6,68 ($-\text{N}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-$), 3,29 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{isocyanate}$), 1,35 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 3,52 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{maléimide}$).

VII- Etape 4B : PolyButadiène fonctionnalisés Maléimide (PB-Mal)

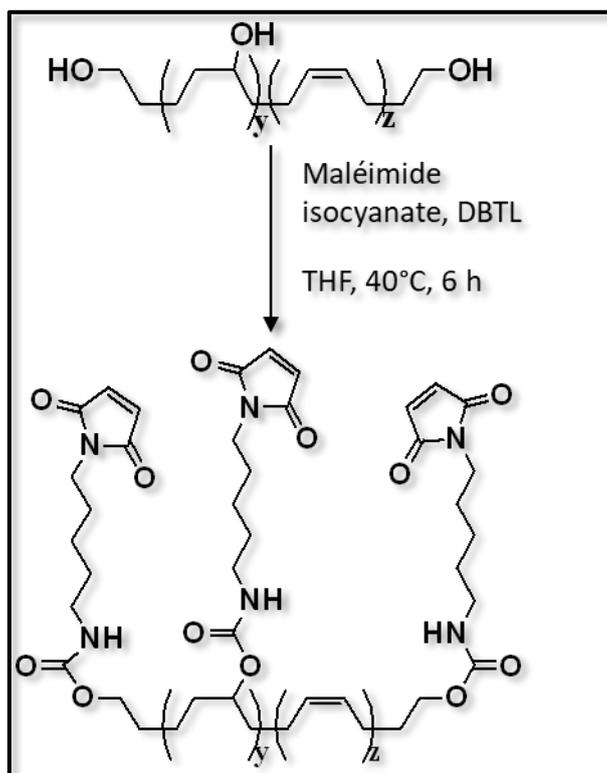


Figure 27 : Formation d'une liaison uréthane entre les fonctions alcools du OH-PB et les fonctions isocyanates du maléimide isocyanate pour obtenir le PB-Mal.

Dans ce cas particulier, l'objectif a été de produire un polymère fonctionnalisé maléimide avec des fonctions hydroxyles résiduelles. Il est aussi possible de consommer tous les alcools en long de chaîne en ajustant le ratio molaire.

3,59 g de OH-PB ($8700 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, hydroxy : 8 %) contenant 66,5 mmol d'unités de répétition et donc 5,3 mmol d'unités de répétition hydroxylées, sont solubilisés dans 50 mL de THF sec. Sous atmosphère inerte, 1,1 équivalents du nombre de moles de fonctions hydroxyles sont ajoutés en maléimide-NCO (517 μL) et 5 % molaires de DBTL (83 μL) sont aussi ajoutés. La solution est agitée 6 h à 40 °C sous atmosphère inerte. La solution est concentrée puis purifiée par précipitation/dissolution dans l'éthanol/DCM trois fois en ayant au préalable refroidi l'éthanol proche de sa température de fusion à l'aide d'azote liquide. Le solvant est évaporé puis le produit est séché sous vide. Rendement proche de 100 %, Taux de fonctionnalisation : maléimide 4,3 %, hydroxyle 3,7 % ; $D = 1,7$; NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3) : (δ , ppm), 6,68 (-N-CO-CH=), 5,38 (- $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH-CH}_2\text{-}$), 2,08 (- $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH-CH}_2\text{-}$).

VIII- Etape 5 : Elastomère de polybutadiène

Il est possible de faire varier le ratio furane/maléimide en fonction du taux de réticulation souhaité. Pour obtenir des films bien réticulés, il est préférable d'avoir un ratio furane/maléimide inférieur à 1 ce qui permet, en théorie, à chaque chaîne polymère d'avoir au moins 4 points de réticulation. Une des multiples réticulations faites est décrite ici.

0,25 g de Fur₄T-PB (4 furanes/chaîne polymère) et 0,25 g de PB-Mal (6 maléimides/chaîne polymère) sont solubilisés dans 3 mL de chloroforme. La solution est placée dans un moule en Téflon ouvert. Le récipient est placé dans un bain sec et chauffé à 60 °C pendant 1 h ce qui permet à la réaction Diels-Alder d'avoir lieu et au solvant de s'évaporer. L'élastomère obtenu est ensuite placé sous vide sur la nuit.

Deux feuilles de Téflon ajustées à la bonne taille sont placées dans un moule de précision en acier de 7*4 cm fabriqué par la société Précision Midi Pyrénées. L'élastomère est placé entre les deux feuilles de Téflon et le moule est refermé. Le moule de précision est ensuite placé dans une presse Carver pendant 20 minutes à 100 °C avec une pression de 0,2 tonnes.m⁻². Les feuilles de Téflon, collées à l'élastomère, sont sorties du moule et placées à 4 °C 5 min. Le film est ensuite décollé des feuilles Téflon. Le film est conservé sous atmosphère inerte à 4 °C. Avant utilisation, le film est rincé abondamment avec de l'éthanol technique puis séché sous flux d'argon.

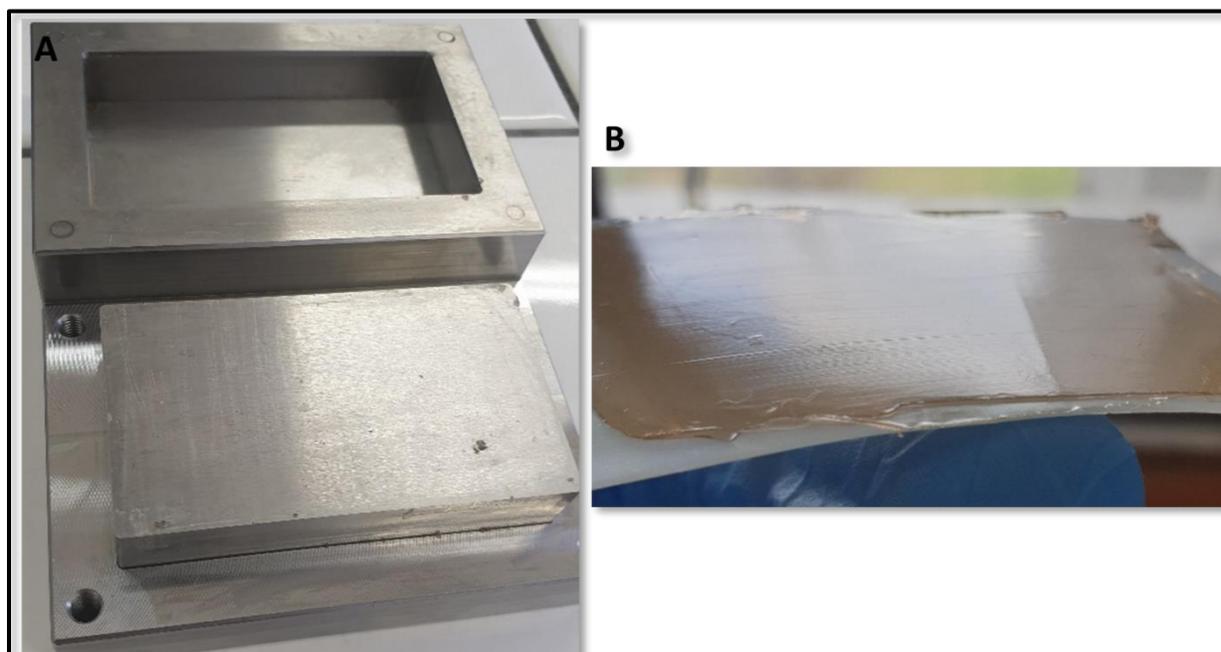


Figure 28 : A : Moule de précision utilisé pour la remise en forme de l'élastomère à base de polybutadiène. B : Exemple de surface élastomère à base de polybutadiène obtenue suite à la remise en forme.

2. Surfaces commerciales polyIsoprène et silicone

Les surfaces polyisoprène (PI) utilisées dans ce projet proviennent de chez Durex® avec la référence Natural 5000 3544. Les surfaces silicones utilisées proviennent de GoodFellow avec la référence SI30-FM-000135.

Les deux types de surface sont lavés avant utilisation. Le lavage consiste à faire successivement deux bains ultrasons dans de l'eau milliQ, 5 min à 30 °C, puis de faire deux autres bains dans l'éthanol technique pendant 5 min à 30 °C. Les surfaces sont ensuite séchées sous flux d'argon et sont prêtes pour utilisation. En cas de non utilisation, les surfaces sont stockées sous atmosphère inerte à 4 °C.

3. Biochimie

a) Matériel

L'eau utilisée dans toutes les manipulations est déionisée à l'aide d'un distributeur Veolia ELGA ELECT50. L'eau est produite par le système Flex PF2L260088. Toutes les étapes d'autoclave sont réalisées avec le Sanoclav Adolf Wolf, 20 minutes à 121 °C. La centrifugeuse utilisée est un modèle Avanti® J-26 XP de chez Beckam Coulter. Les deux rotors utilisés proviennent aussi de chez Beckam Coulter. Pour les volumes de 400 mL, un rotor J-Lite Series JLA 10,500 a été utilisé. Pour les volumes inférieurs à 50 mL, c'est un rotor J-Series Instrument, JA 25,50 qui a été utilisé. Le sonicateur FB705, Fisher Scientific a été utilisé avec deux cycles de 1 min puis 30 s à 25 % d'amplitude. Les gels d'électrophorèse d'agarose ont migré dans un Mupid® One de chez Advance. Les gels d'électrophorèse SDS-Page ont migré dans un Power Pac de chez BioRad. Les gels d'électrophorèse ont été imagés sur un Chemidoc MP Imaging System de chez BioRad.

NaCl (Aldrich) ; extrait de levures (Biokar Diagnostics) ; tryptone (Biokar Diagnostics) ; glycérol (VWR) ; phosphate de monopotassium (KH₂PO₄, VWR) ; hydrogénophosphate de potassium (K₂HPO₄, VWR) ; agar (grade bactériologique type E, Biokar) ; gel SDS-Page (TGX, stainfree gels, Mini-Protean® precast gels, BioRad) ; résine Cobalt (Talon® metal affinity resin from TAKARA, Thermo Scientific) ; lysosyme (> 90 %, Chicken egg white, Sigma) ; isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, >99 %, Molecular Biology Grade, Euromedex) ; ampicilline (Cell Culture Grade, Euromedex) ; kanamycine (Celle Culture Grade, Euromedex) ; chloramphénicol (Celle Culture Grade, Euromedex) ; Imidazole (> 99 %, Merck) ; rCutSmartBuffer (rCutSmart®, BioLab) ; enzyme de restriction (rCutSmart®,

BioLab); bromure d'éthidium (BET, 1 %, Euromedex); β -mercaptoéthanol (BioRad); Laemmli Sample Buffer 4X (BioRad); gel SDS (Mini-Protean® Precast Gels, TGX Stainfree gels, BioRad); marqueur de masse molaire (Protein Unstained Standards, BioRad); bleu de Coomassie (Page Blue Protein Staining Solution, Thermo Scientific).

Les différentes cellules compétentes utilisées sont dans le Tableau 8.

Souche d'E. coli	Génotype	Caractéristiques
BL21(DE3)	E. coli str. B F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) [malB ⁺] _{K-12} (λ^S)	Cellules de la souche B d'E. coli avec DE3, un prophage λ portant le gène de la polymérase ARN T7.
Tuner (DE3)		Cellules dérivées des cellules B834. Délétion du lacZY par rapport aux cellules BL21, ce qui permet un ajustement des niveaux d'expression des protéines. DE3 correspond au prophage λ portant le gène de la polymérase ARN T7
TOP 10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ^-	Cellules très similaires aux cellules DH10B. Résistance à la streptomycine.

Tableau 8 : Souches d'Escherichia Coli utilisées avec leurs génotypes et caractéristiques.

Les différents plasmides utilisés sont dans le Tableau 9.

Plasmide	Taille (bp)	Phénotype et Génotype	Protéine codée
pETDuet	5 636	Tag H, Amp, T7, lacI	Jo _c
pETDuet	5 636	Tag H, Amp, T7, lacI	Jo _w
pACYDuet	4 386	Tag H, Chlo, T7, lacI	In _c
pACYDuet	4 386	Tag H, Chlo, T7, lacI	In _w
pET28	6 535	Tag H, Kana, T7, lacI	In-NpXyn11A
pACYDuet	5 160	Tag H, Chlo, T7, lacI	InDsRed
pADG16		Tag H, Kan, T7, lacI	GFP-In
pETDuet	6 410	Tag H, Amp, T7, lacI	JoDsRed
pET28	6 239	Tag H, Kan, T7, lacI	JoNpXyn11A
pET22	6 045	Tag H, Amp, T7, lacI	NpXyn11A

Tableau 9 : Plasmides utilisés dans le cadre de ce projet. Tag-H : Tag-His. Résistance : Amp : Ampicilline ; Chlo : Chloramphénicol ; Kana : Kanamycine.

L'ensemble des plasmides utilisés dans cette thèse sont compatibles avec le système pET expliqué ci-après. Le gène *DE3* est présent dans le génome d'*Escherichia Coli* (*E. coli*). Ce gène code pour le promoteur lacUV5, le site Lac O et le gène codant pour l'ARN polymérase T7. Le promoteur lacUV5 est inactif lorsque le répresseur Lac se lie au site Lac O. Le gène Lac I est également présent dans le génome de la bactérie, et sa transcription et traduction produisent le répresseur Lac. Lorsque le répresseur Lac est dissocié en présence de lactose ou d'ITPG, le promoteur lacUV5 devient actif et permet la transcription du gène T7 grâce à l'ARN polymérase T7 produite en faibles quantités et de manière constitutive par *E. coli*. Le même système est présent sur le plasmide pET (Figure 29), qui contient un gène codant pour le promoteur T7, le site Lac O, un gène codant pour la protéine d'intérêt et le gène Lac I. L'ARN polymérase T7 active le promoteur T7 uniquement si le répresseur Lac I est dissocié.

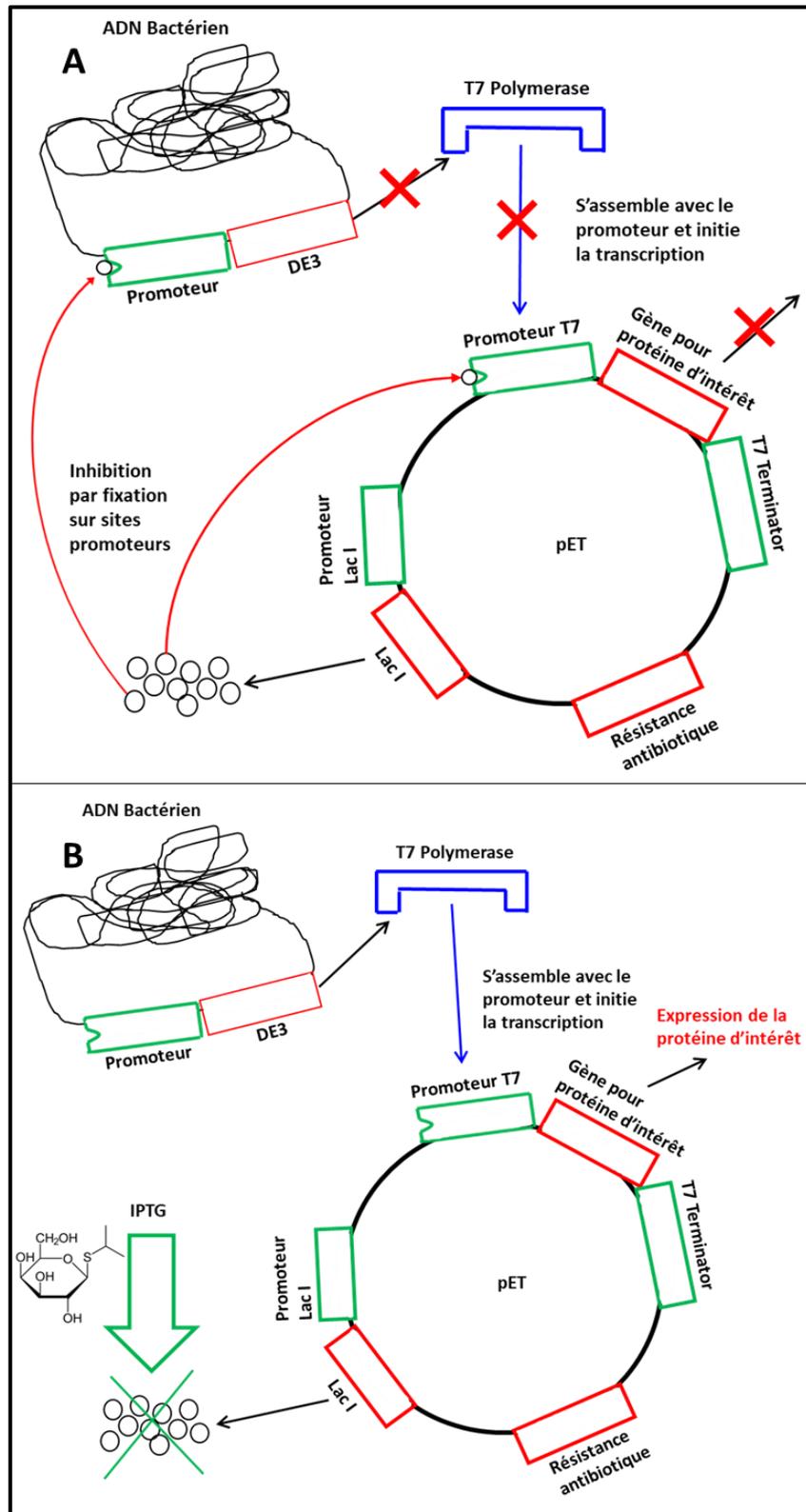


Figure 29 : A : Inhibition de l'expression du gène codant pour la protéine d'intérêt par l'expression du Lac I qui se fixe sur les promoteurs DE3 et T7. B : Levée de l'inhibition de l'expression du gène codant pour la protéine d'intérêt grâce à l'introduction en grande quantité d'IPTG neutralisant le Lac I.

b) Méthodes

I- Milieux de culture

Tous les milieux sont autoclavés avant utilisation avec une autoclave Sanoclav Adolf Wolf, 20 min à 121 °C.

Le Lysogeny Broth (LB) est obtenu en solubilisant 10 g.L⁻¹ de tryptone, 5 g.L⁻¹ d'extrait de levures (Biokar diagnostics), 10 g.L⁻¹ de NaCl dans de l'eau déionisée.

Le Terrific Broth (TB) est obtenu en solubilisant à 12 g.L⁻¹ de tryptone, 24 g.L⁻¹ d'extrait de levure, 0,4 v/v % de glycérol, dans un tampon phosphate (0,89 mol.L⁻¹) à 10 v/v %. Le tampon phosphate est préparé en solubilisant dans de l'eau du dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄) à 23,14 g.L⁻¹ (0,17 mol.L⁻¹) et de l'hydrogénophosphate de potassium (K₂HPO₄) à 125,41 g.L⁻¹ (0,72 mol.L⁻¹).

II- Milieu solide

Le milieu LB agar est composé de 10 g.L⁻¹, de tryptone, 5 g.L⁻¹ d'extrait de levures, 10 g.L⁻¹ de NaCl et 15 g.L⁻¹ d'agar. Après autoclavage, le milieu est supplémenté en antibiotique (Tableau 8). Les boîtes sont coulées avec du milieu LB supplémenté avec 15 g.L⁻¹ d'agar ainsi que l'antibiotique adapté à la transformation prévue en aval (Tableau 9).

III- Préparation des antibiotiques

1 g de kanamycine ou d'ampicilline est dissous dans 15 mL d'eau milliQ. Le volume d'eau est ajusté à 20 mL pour que la concentration finale soit de 50 mg.L⁻¹. La suite du protocole est réalisée sous environnement stérile. La solution est filtrée à 0,22 µm (Minisart syringe filter) puis la solution est aliquotée à 1 mL dans des Eppendorfs de 1,5 mL et stockée à - 20 °C.

340 mg de chloramphénicol sont dissous dans 10 mL d'éthanol 100 % pour obtenir une concentration de 34 g.L⁻¹. La suite du protocole est réalisée sous environnement stérile. La solution est filtrée à 0,22 µm puis aliquotée à 1 mL dans des Eppendorfs de 1,5 mL et stockée à - 20 °C.

IV- Préparation de l'IPTG

5 g d'IPTG sont dissous dans 15 mL d'eau milliQ. Le volume d'eau est ajusté à 21 mL pour que la concentration finale soit de 1 M. La suite du protocole est réalisée sous environnement stérile. La solution est filtrée à 0,22 µm puis aliquotée à 1 mL dans des Eppendorfs de 1,5 mL et stockée à - 20 °C.

V- Transformation

Un volume de 50 µL de cellules compétentes *E. coli* ont été transformée avec 1 µL d'ADN et incubées pendant 10 minutes dans la glace. 200 µL de milieu LB sont ajoutés et les cellules sont ensuite incubées une heure à 37 °C sous agitation orbitale à 200 rpm. Les cellules sont ensuite étalées sur une boîte de milieu LB agar contenant l'antibiotique adéquat. Les boîtes sont incubées à 37 °C sur la nuit.

VI- Préculture

Une pré-culture de 8 mL de milieu LB estensemencée à partir d'une colonie de cellules compétentes transformées avec l'ADN d'intérêt. La pré-culture est incubée à 37 °C sur la nuit, sous une agitation orbitale 120 rpm (Infors HT multitron).

VII- Préparation plasmidique

Une miniprep est réalisée selon le protocole décrit dans le kit Qiagen spin miniprep (<https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=ebb38a38-c61c-40a7-910d-9b10d1148022&lang=en>). Ce kit permet de réaliser trois étapes qui sont la préparation et le lavage du lysat bactérien, l'adsorption de l'ADN sur la membrane de silice, le lavage et l'élution de l'ADN plasmidique avec 50 µL de tampon EB (tampon Tris HCl à pH 8,5). Les plasmides sont ensuite stockés à - 20 °C.

VIII- Digestion du plasmide par des enzymes de restriction

Une quantité de 1 µg du plasmide contenant le gène d'intérêt est digéré par 0,5 µL de chacune des deux enzymes de restriction. Une quantité de 3 µg du plasmide qui permettra de stocker le gène d'intérêt est digéré avec 1 µL de ces deux enzymes de restriction. Un volume de 5 µL du tampon CutSmart (New England Biolabs) ainsi que de l'eau milliQ (quantité suffisante pour 50 µL) sont ajoutés. L'ADN est incubé à 37 °C pendant 2 heures sans agitation (dans un bain d'eau). Une quantité de 1 µg du plasmide contenant le gène d'intérêt est digérée par 0,5 µL d'une des deux enzymes de restriction pour servir de contrôle négatif.

IX- Préparation d'un gel d'agarose

Le tampon de charge est composé de glycérol 50 v/v%, dans de l'eau milliQ et de quelques grains de méthylorange. Un volume de 1 µL de l'échantillon à tester correspondant à 40 ng d'ADN est mélangé avec 4 µL du tampon de charge et de l'eau milliQ (Quantité pour atteindre 8 µL). La solution est déposée sur un gel d'agarose 0,7 % dans du tampon Tris Acétate EDTA. Le marqueur de poids moléculaire (1 kb DNA Ladder, New England Biolabs) est déposé en parallèle. Après migration par électrophorèse des échantillons pendant 30 minutes à 100 V, le

gel est plongé 20 minutes dans un bain contenant 1 % de bromure d'éthidium. La présence des brins d'ADN est révélée en lumière UV.

X- Dosage de l'ADN plasmidique

1,2 µL d'un échantillon d'ADN plasmidique purifié est dosé à 260 nm en utilisant un nanodrop ND10 spectrophotometer. Le blanc est réalisé avec le tampon EB (kit Qiagen spin miniprep).

XI- Culture

Une pré-culture de 8 mL est utilisée pour ensemercer à 1 %, un volume de 800 mL de milieu LB ou TB. Le milieu est incubé à 37 °C sous agitation orbitale dans un Infors HT multitron. La densité optique (DO) à 600 nm est suivie en faisant des prélèvements de 1 mL. Quand la DO est entre 0,4 et 0,6, l'expression de la protéine d'intérêt est induite par ajout d'IPTG à une concentration finale de 1 mM. L'induction dure 4 heures à 37 °C. La culture est stoppée par centrifugation 10 minutes à 5 000 xg à 10 °C. dans une centrifugeuse Avanti J-26 (Beckman Coulter). Les culots cellulaires sont repris dans 25 mL de tampon phosphate (50 mM, pH 7,2) supplémenté avec 1 % de cocktail antiprotéase PIM 100X (0,2 g.L⁻¹ d'aprotinine, 0,05 g.L⁻¹ de leupeptine, 0,1 g.L⁻¹ de pepstatine A, 1,57 g.L⁻¹ de chlorhydrate de benzamidine, 1,9 g.L⁻¹ métabisulfite de sodium et 25 % d'éthanol dans de l'eau). Les cellules re suspendues sont conservées à - 20 °C jusqu'à purification.

XII- Purification des protéines

Le tube contenant 27 mL est décongelé à 20 °C en agitant régulièrement. Le tube est placé sur un lit de glace et une pointe de spatule de lysozyme est ajoutée. Agitation régulière (toutes les 3 min pendant 30 min). La solution passe ensuite par une étape de sonication. La sonication est appliquée deux fois 1 minute avec 25 % de la puissance en restant sur lit de glace. La solution est centrifugée à 60 000 × g pendant 30 minutes à 10 °C.

Une colonne d'affinité avec résine cobalt Talon® est montée. La résine est rincée avec 5 mL d'eau distillée, puis avec 40 mL de tampon C (50 phosphate mM, 300 mM NaCl, pH 7,4) qui sont ajoutés et maintenus dans la colonne 20 minutes à 4 °C en agitant légèrement toutes les 5 minutes.

Le surnageant, ou cell free extract (CFE), obtenu après l'étape de centrifugation est déposé sur la résine. Quelques microlitres de surnageant sont conservés pour être caractérisés plus tard. Plusieurs solutions d'éluion sont ensuite inoculées sur la résine. Toutes les fractions éluées sont conservées. Les différentes éluions sont indiquées dans le Tableau 10.

L'imidazole entre en compétition avec le His-Tag pour se complexer avec le cobalt. Quand la concentration en imidazole augmente, les protéines avec His-Tag sont décrochées de la résine et se retrouvent dans la fraction éluée. Toutes les fractions récupérées sont caractérisées sur Gel-SDS PAGE.

Nom de la Fraction	Volume	Solution
L1, L2 et L3	Trois fois 10 mL	Tampon C
E1 : 10	10 mL	Tampon C supplémenté avec 10 mmol.L ⁻¹ d'imidazole
E1 : 100	6 mL	Tampon C supplémenté avec 100 mmol.L ⁻¹ d'imidazole
E2 : 100	6 mL	Tampon C supplémenté avec 100 mmol.L ⁻¹ d'imidazole
E1 : 250	4 mL	Tampon C supplémenté avec 250 mmol.L ⁻¹ d'imidazole

Tableau 10 : Elutions effectuées pour la purification de protéines sur résine cobalt. L1, L2 et L3 : Lavages 1, 2 et 3. E1 : 10/100/250 : Elution avec tampon C supplémenté avec 10/100/250 mmol.L⁻¹ d'imidazole.

Les fractions obtenues sont déposées sur gel d'électrophorèse SDS-Page.

XIII- Gel d'électrophorèse SDS-PAGE

Un aliquot de chaque fraction de la purification est préparé afin d'être analysé sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE, gel précoulé Any kD mini-Protean TGX Gel stain free, BioRad, 200 V, 27 minutes). Les échantillons sont dilués (1 µL d'échantillon pour 8 µL d'eau) avant ajout du tampon de 3 µL du tampon de charge (450 µL de Laemmli sample buffer 4X et de 50 µL de 2 β-mercaptoéthanol). Les échantillons sont incubés 5 minutes à 95 °C. La totalité du volume est déposée sur gel et 6 µL du marqueur de poids moléculaire sont également déposés (Biorad Precision plus protein unstained standart, BioRad). En cas d'absence de tryptophane dans la protéine d'intérêt le gel est révélé par une coloration au bleu de Coomassie (PageBlue Protein Staininf Solution, Fermentas). Le gel est imagé en UV quand des tryptophanes sont présents ou dans le visible dans le cas d'une coloration au bleu de Coomassie avec un Chemidoc MP Imaging System de chez BioRad.

XIV- Mise en évidence de la réactivité des thiols contenus dans les protéines à l'aide d'une sonde maléimide

Un tampon phosphate (20 mM phosphate, 150 mM NaCl et pH 7,2) est préparé. Ce tampon est utilisé pour toutes les dilutions. Une solution de 500 μL contenant $2 \cdot 10^{-5}$ mol de la protéine à étudier et $3,5 \cdot 10^{-3}$ mol de maléimide N-(5-fluoresceinyl) est préparée. Incuber 2 h à 20 °C avec une agitation de 900 rpm. Les différentes fractions étudiées sont déposées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE.

XV- Mesure de la concentration en protéines

Suite au gel d'électrophorèse, la fraction contenant les protéines est identifiée. L'absorbance à 280 nm est mesurée sur un nanodrop ND10 spectrophotometer en déposant 2 μL de solution. La concentration est directement obtenue en $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ sur le nanodrop grâce à la loi de Beer-Lambert.

XVI- Mesure d'activité enzymatique

Plusieurs méthodes de mesure d'activité enzymatique ont été développées dans ce projet et ont été regroupées dans la même section (I.B.3 page 90). Suite à leur purification, l'activité spécifique des enzymes a été mesurée sur deux substrats : le WAX ((I.B.3.b) page 92) et le X₃.pNP ((I.B.3.a) page 90).

XVII- Dessalage des protéines

Après analyse du gel d'électrophorèse, les fractions contenant les protéines sont dessalées. La colonne de dessalage PD10 (GE Healthcare) est utilisée selon les préconisations du fabricant. La résine est équilibrée avec 25 mL de tampon phosphate (50 mM pH 7). Un volume de 2,5 mL d'échantillon est déposé sur la colonne et est élué par 3,5 mL de tampon phosphate. La solution protéique est ensuite supplémentée avec 1 % de cocktail d'antiprotéase PIM 100X avant d'être aliquotée (200 μL /tube) et conservée à -20 °C.

4. Fonctionnalisation et greffage sur surfaces élastomères

Cette partie décrit le matériel et les méthodes associés au greffage d'enzymes sur les surfaces. Le greffage comporte quatre étapes : Traitement plasma de la surface, fonctionnalisation maléimide de la surface, greffage de Jo_c et greffage de In-NpXyn11A.

a) Matériel

Le traitement plasma est réalisé avec un Femto commercialisé par Diene Electronic ; la totalité des tampons sont faits avec de l'eau milliQ déminéralisée à l'aide du distributeur Veolia ELGA

ELECT50. L'eau est produite par le système Flex PF2L260088, les incubations sont faites dans un Thermomixer C de chez Eppendorf.

Acétone (>99,8 %, HPLC grade, Sigma) ; acide 6-maléimidohexanoïque (90 %, Merck) ; triéthylamine (>99,5 %, Sigma) ; chloroformiate d'éthyle (>98 %, Sigma) ; tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP, Immobilized TCEP disulfide reducing resin : 50 v/v % in water, ThermoScientific) ; monolaurate de polyoxyéthylènesorbitane (TWEEN®20, Sigma-Aldrich) ; acide 2-(N-Morpholino) éthane sulfonique et Acide 4-morpholine éthane sulfonique monohydrate (MES, >99 %, Sigma-Aldrich) ; tris(hydroxyméthyl) aminométhane (Tris/HCL, Gen Apex, VWR) ; albumine de serum bovin (BSA, >98 %, Sigma-Aldrich).

b) Méthodes

I- Fonctionnalisation des surfaces par traitement plasma

Avant d'être utilisées, les surfaces sont au préalable lavées comme indiqué dans les parties précédentes (I.A.2 page 74).

Les surfaces à traiter sont placées sur une plaque en verre dans le générateur de plasma. Il est à noter que les surfaces PB, PDMS et PDMSr sont légèrement adhésives ce qui n'est pas le cas des surfaces PI. Ce point implique une différence majeure au niveau du traitement plasma qui ne se fera que sur les surfaces exposées à l'atmosphère du plasma. Les surfaces PB et Si ne sont donc traitées qu'en recto alors que la surface PI est traitée en recto/verso.

Le traitement plasma est effectué avec les conditions suivantes : 40 kHz, 0.5 mbar d'argon pendant 30 secondes.

II- Fonctionnalisation maléimide en surface

Suite au traitement plasma les surfaces sont plongées dans environ 100 mL d'eau milliQ avec agitation pendant 10 min. Les surfaces sont ensuite trempées successivement dans 3 bains d'acétone (25 mL) pendant 30 secondes, puis dans une solution réactive qui a été préparée au préalable. La préparation de cette solution est décrite dans le paragraphe suivant.

0,25 g d'acide 6-maléimidohexanoïque (1,18 mmol) sont solubilisés dans 1,5 mL d'acétone et injectés dans un tube de Schlenk à 4 °C avec agitation sous atmosphère inerte. La solution est refroidie à -5 °C en ajoutant du NaCl dans le bain de glace. 1,1 équivalents de triéthylamine séchée sur KOH (118.6 µL) sont ajoutés en restant sous atmosphère inerte. 0,9 équivalents de chloroformiate d'éthyle (104,1 µL) sont dilués avec 1,5 mL d'acétone avant d'être ajoutés à la

solution sous atmosphère inerte. La solution est agitée 10 min à -5 °C puis 4 mL d'acétone sont ajoutés.

Les surfaces préparées plus haut sont introduites dans la solution réactive. Le ratio utilisé pour l'ensemble des manipulations est de 2,67 cm² de surface pour 1 mL de solution réactive. Il y a donc 3 surfaces de 2,5×2,5 cm pour 7 mL de solution réactive.

La solution contenant les surfaces est incubée 6 h à 20 °C et 300 rpm sous atmosphère inerte. Les surfaces sont ensuite plongées 2 min dans deux bains d'acétone (25 mL) puis elles sont plongées 1 min dans un bain de tampon phosphate à 50 mM, pH de 7,2 (10 mL).

III- Greffage de Jo sur la surface fonctionnalisée avec maléimides

1 mL de suspension TCEP (TCEP immobilisé sur billes d'agarose, billes à 50 w/w% dans de l'eau) est introduit dans un tube Eppendorf de 2 mL. Le tube est centrifugé 30 secondes à 3 000 rpm à l'aide d'une centrifugeuse de paillasse et le surnageant est éliminé. 500 µL de tampon phosphate 50 mM, pH 7,2 sont ajoutés au tube. Le tube est à nouveau centrifugé et le surnageant est éliminé. Cette étape de rinçage est répétée deux fois pour obtenir 500 µL de billes fonctionnalisées TCEP sans surnageant. 1 mL de protéines Jo à 1.5 mg.mL⁻¹ est ajouté dans le tube. Les protéines sont incubées en présence du TCEP dans le tube Eppendorf disposé dans un thermomixer à 20 °C pendant 15 minutes à 900 rpm. Le tube est à nouveau centrifugé et le surnageant est récupéré. La solution de 1 mL à 1,5 mg.mL⁻¹ est diluée pour atteindre 0,75 mg.mL⁻¹. 1 700 µL de solution sont introduits dans un tube Eppendorf, puis la surface à traiter est ajoutée dans le tube. Le tube est ensuite incubé sur la nuit, environ 16h, à 20 °C sous une agitation de 900 rpm.

A J+16 h, la surface est extraite du tube et est rincée abondamment avec différents tampons décrits ci-dessous (Tableau 11). Chaque lavage s'effectue en ajoutant 2 mL dans le tube puis en vortexant 30 s avant de retirer la solution. A la suite des lavages, la surface est conservée dans un tube avec 2 mL de tampon de conservation à 4 °C.

Solution de lavage	Fonction	Composition
Tampon 1	Rinçage	50 Phosphate mM, pH 7,2
Tampon 2	Lavage	50 Phosphate mM, NaCl 250 MM, TWEEN 20 à 1%, pH 7
Tampon 3	Lavage	MES 500 mM, NaCl 500 mM, pH 5
Tampon 4	Lavage	Tris/HCl 500 mM, NaCl 500 mM, pH 9
Tampon 1	Rinçage	Phosphate 50 mmol.L ⁻¹ , pH 7.2
Tampon 5	Conservation	Phosphate 50 mmol.L ⁻¹ , BSA 1mg.mL ⁻¹ , pH 7.2

Tableau 11 : Méthode de lavage des surfaces suite au greffage de protéines en surface. MES : acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique.

IV- Greffage de In-NpXyn11A sur la surface

Les enzymes In-NpXyn11A sont diluées dans un tampon phosphate à 50 mM pH 7,2. Le tampon a été ajouté additivement, dans le cas des surfaces PB PDMS et PDMSr, de la BSA à 1 mg.mL⁻¹. Dans le cas de la surface PI, aucune BSA n'est ajoutée au tampon.

Dans le cas d'un greffage sur les surfaces PB, PDMS et PDMSr la concentration enzymatique est de 2 µM. Dans le cas d'un greffage sur des surfaces PI, la concentration enzymatique après dilution est de 1 µM.

1 700 µL de solution enzymatique sont placés dans un tube Eppendorf de 2 mL. La surface à traiter est placée dans le tube. Le tube est ensuite incubé dans un thermomixer 6 h à 20 °C avec une agitation de 900 rpm. Après le temps d'incubation, la surface est rincée, lavée et stockée exactement comme pour le greffage de Jo indiqué dans la partie précédente. (Tableau 11)

B. Caractérisations

Dans cette partie, les différentes méthodes de caractérisation utilisées sont détaillées. Cette partie présente dans un premier temps les caractérisations faites sur les surfaces polymères, puis les différentes méthodes pour caractériser les matériels biologiques produits pour finir avec les protocoles expérimentaux utilisés pour décrire les surfaces avec protéines/enzymes greffées en surface.

1. Surfaces polymères

Les surfaces polymères ont été caractérisées avec un microscope optique BX53F commercialisé par Olympus. Les mesures d'angle de contact ont été faites avec un PAT1M v4 de chez Sinterface, avec de l'eau milliQ et des gouttes de 3 μ L. L'auto-fluorescence des surfaces a été analysée avec un fluorimètre équipé d'un iHR320 de chez Horiba, un FL-1000 Fluorolog de chez Horbia, un DeltabHub™ de chez Horiba, un contrôleur de diode NanoLED C2-Pulsed de chez Horiba et un illuminateur 450 Watt FL1039A/40A de chez Horiba. Les analyses FTIR ont été faites avec un Nicolet 6700 de chez Thermo Scientific. Les analyses AFM ont été faites avec un NanoWizard3 de chez JPK, avec une pointe Bruker en mode tapping. La pointe avait un rayon de courbure de 20 nm, une constante de raideur de 0,4 N/m et une fréquence naturelle d'oscillation de 70 kHz. Les analyses de taux de gonflement ont été faites à température ambiante avec du dichlorométhane.

2. Etirement de la surface et montage pour tests d'activité enzymatique

Pour étirer la surface, l'outil doit être monté. Le matériel nécessaire pour le montage de l'outil (Figure 31) et pour la fixation d'une surface sur l'outil (Figure 32) est composé d'un gant SHIELDskin® (Orange Nitrile 260 mm, Shield Scientific), un rotaflow modifié sur mesure par un verrier (abrévié par Rm pour la suite) (Figure 30), une seringue 1 mL (Fisherbrand), du Scotch PVC (Adance Adhesive tapes), des colliers plastiques (2,4 x 95 mm, Legrand®) et un tuyau souple de diamètre intérieur 8 mm et 10 cm de long.

Un morceau de parafilm (1,5 x 5 cm) est placé sur l'extrémité de la seringue puis la seringue est insérée dans le tuyau flexible. Un morceau de parafilm (1,5 x 5 cm) est placé sur l'extrémité 2 du Rm puis l'extrémité est insérée dans le tuyau flexible (Figure 31).

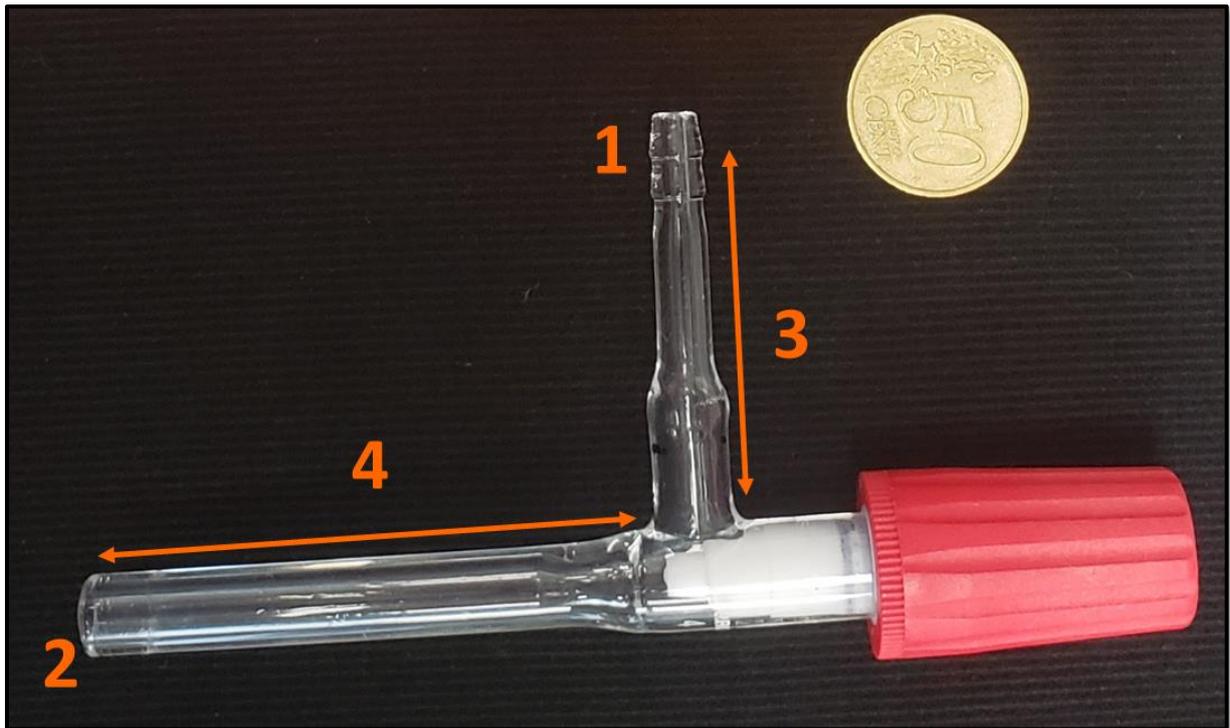


Figure 30 : Rotaflow modifié sur mesure par un verrier. Diamètre de la pièce : 24,25 mm. Extrémité 1 : diamètre intérieur/extérieur de 4/6 mm. Extrémité 2 : Diamètre intérieur/extérieur de 8/10 mm. Longueur portion 3 : 5 cm. Longueur portion 4 : 7,5 cm.

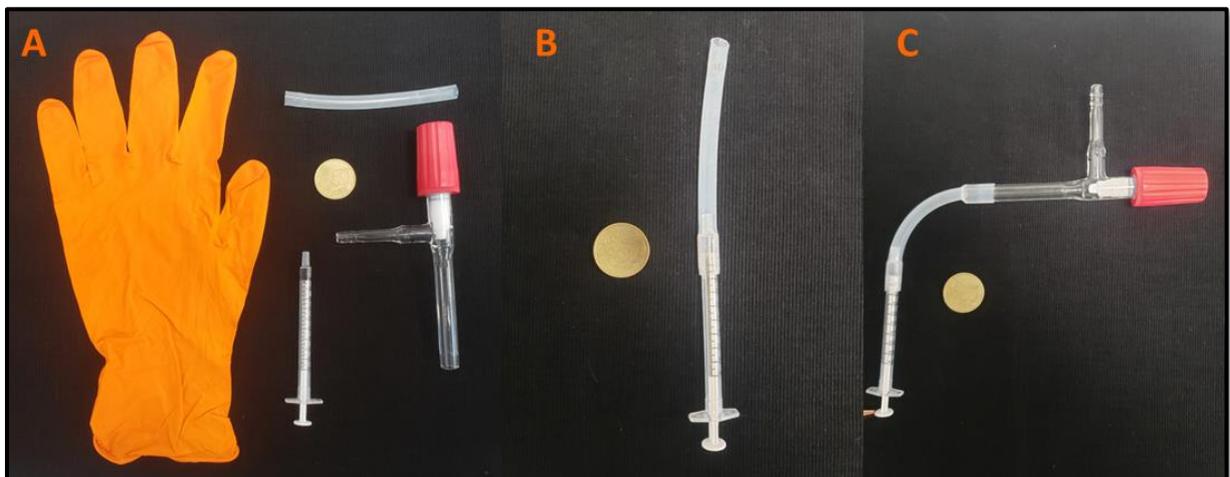


Figure 31 : Montage de l'outil d'étirement. Diamètre de la pièce : 24,25 mm.

La fixation d'une surface sur l'outil d'étirement puis l'étirement de la surface se fait en 6 étapes (Figure 32). Un morceau de parafilm (1,5 x 5 cm) est fixé sur l'extrémité 1 du Rm. Un morceau de gant (4 x 4 cm) est placé sur l'extrémité 1 du Rm, avec la face intérieure du gant au contact du Rm, puis est fixé avec un morceau de scotch PVC (1,5 x 5 cm). Un collier de serrage

plastique est placé par-dessus le scotch PVC à 1,2 cm de l'extrémité 1 du Rm. La surface à étirer (minimum 2,2 x 2,2 cm) est placée sur l'extrémité 1 du Rm. Un collier de serrage plastique est placé par-dessus la surface à 0,5 cm de l'extrémité 1 du Rm. Un morceau de scotch PVC (1,5 x 5 cm) est placé entre les deux colliers de serrage et recouvre la partie de la surface à étirer qui ne sera pas étirée.

Pour étirer la surface, le système est rempli d'eau par la seringue à l'extrémité 2 du Rm (Figure 31). La seringue est ensuite utilisée pour introduire le volume désiré en eau et atteindre le taux d'étirement voulu (Figure 32).

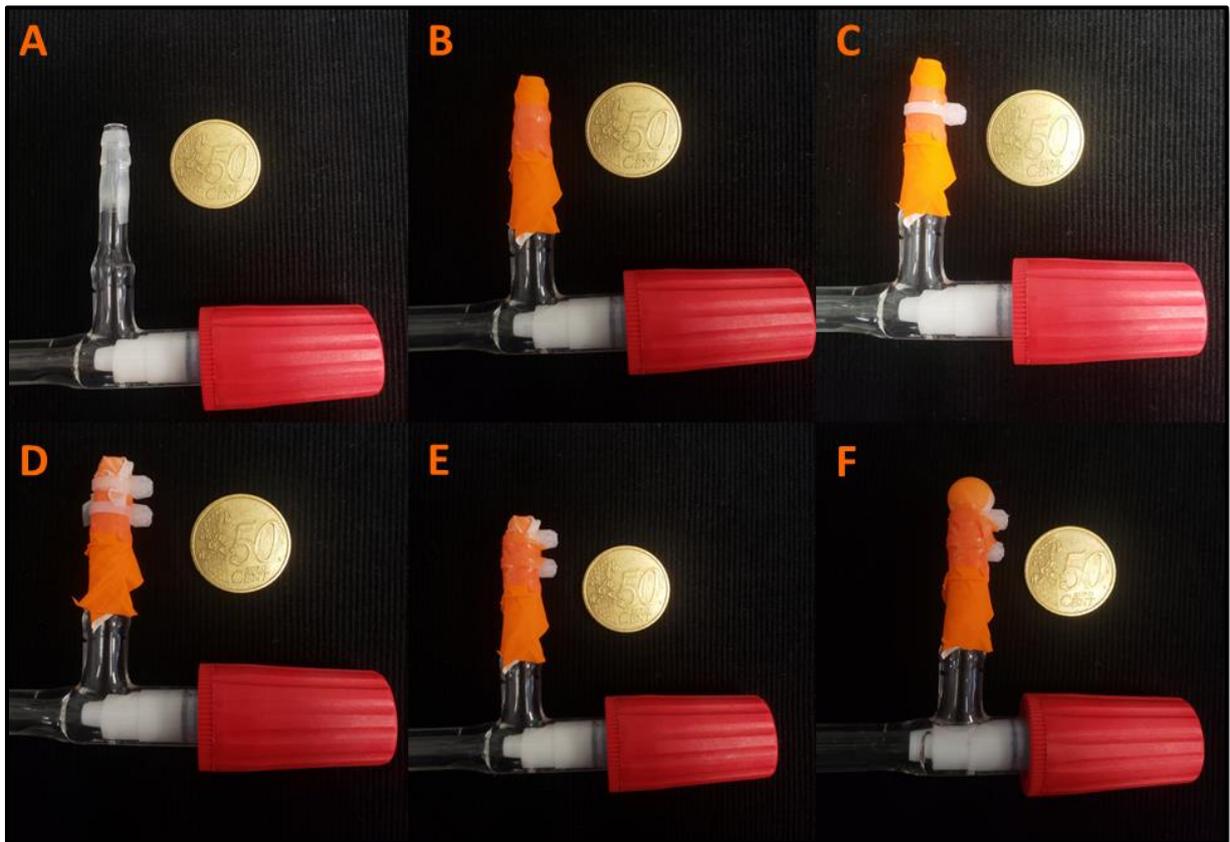


Figure 32 : Fixation de la surface sur l'outil d'étirement puis étirement de la surface. Diamètre de la pièce : 24,25 mm. Dans cet exemple, la surface étirée est un élastomère de polyisoprène.

Le montage pour mesure d'activité enzymatique sur des surfaces étirées se fait en plaçant l'extrémité 1 du Rm dans un réacteur (tube à hémolyse en polystyrène, fond rond, diamètre intérieur 14 mm) contenant un tampon d'activité enzymatique et un barreau magnétique (Figure 33 partie A). Le réacteur est placé dans un bécher contenant de l'eau et un barreau magnétique (partie B). Le bécher est placé sur une plaque agitatrice et chauffante avec une sonde de rétrocontrôle de la température (partie C).

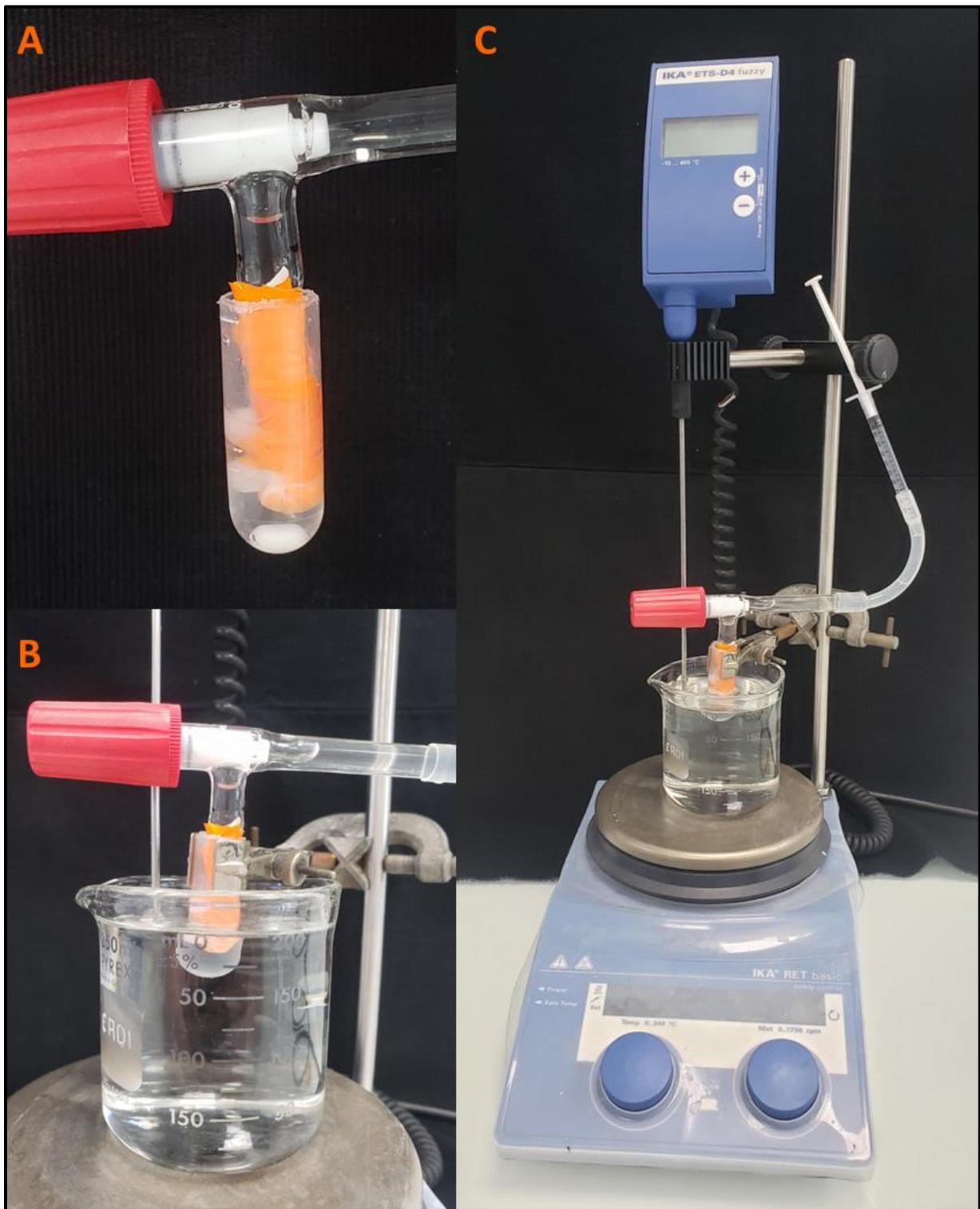


Figure 33 : Montage pour mesure d'activité enzymatique sur des surfaces étirées. A : La surface à étudier est fixée au bout de la canule et la canule est plongée dans un réacteur contenant un barreau magnétique. Le réacteur est rempli avec une solution contenant le substrat étudié. B : Le réacteur est plongé dans un bûcher d'eau servant à réguler la température. C : L'ensemble est placé sur une plaque agitatrice thermorégulée.

3. Activités enzymatique

a) Mesure chromogénique avec X₃pNP

I- Enzymes libres en solution

La solution de dilution est à 50 mmol.L⁻¹ en phosphate, 1 mg.mL⁻¹ de BSA et a un pH 7.2. La solution d'activité est à 50 mmol.L⁻¹ de phosphate, 5 mmol.L⁻¹ de X₃pNP, 1 mg.mL⁻¹ de BSA et avec un pH de 7.2. La solution enzymatique est obtenue en diluant les enzymes à l'aide de la solution de dilution. Cette solution est à 50 mmol.L⁻¹ en phosphate, 1 mg.mL⁻¹ de BSA, entre 1 et 20 nmol.L⁻¹ en enzymes et a un pH 7.2.

450 µL de solution d'activité sont inoculés dans une cuvette quartz de 500 µL. La cuvette est placée dans un lecteur UV-vis (Cary, UV-vis Multi-Cell Peltier de chez Agilent Crosslab) réglé à 37 °C. La cuvette est laissée 10 min avant de démarrer l'analyse. 50 µL de solution enzymatique sont ajoutés et l'absorbance à 401 nm est suivie pendant 20 minutes afin de suivre le relargage du paranitrophénol.

II- Quantification des enzymes greffées en surfaces

Sept réactions sont lancées en parallèle. Les six premiers échantillons correspondent à la gamme étalon (Figure 34) et le dernier correspond à la surface avec enzymes greffées. Les six premiers échantillons sont préparés en inoculant dans des tubes Eppendorf 198 µL de solution de réaction à 50 mmol.L⁻¹ en phosphate, 1 mg.mL⁻¹ en BSA, 5 mmol.L⁻¹ en X₃pNP et pH 7.2. 22 µL de solution enzymatique sont ajoutés. La solution enzymatique est à 50 mmol.L⁻¹ en phosphate, 1 mg.mL⁻¹ en BSA, pH 7.2 et a des concentrations variables en enzymes de 0, 10, 20, 50, 100 et 200 nmol.L⁻¹. Pour l'échantillon contenant la surface, 1 530 µL de solution de réaction sont inoculés auxquels sont ajoutés 170 µL de tampon à 50 mmol.L⁻¹ en phosphate, 1 mg.mL⁻¹ en BSA, pH 7.2. La surface est ensuite ajoutée dans le tube.

Les sept tubes sont agités à 37 °C et 900 rpm dans un thermomixer pendant 20 min. 200 µL sont prélevés dans chaque tube et sont inoculés dans une microplaque dans laquelle avaient au préalable été inoculés 100 µL de solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃, Sigma) à 1 mol.L⁻¹. L'absorbance est ensuite mesurée à 401 nm sur un lecteur microplaque Infinite 200 Pro de chez TECAN.

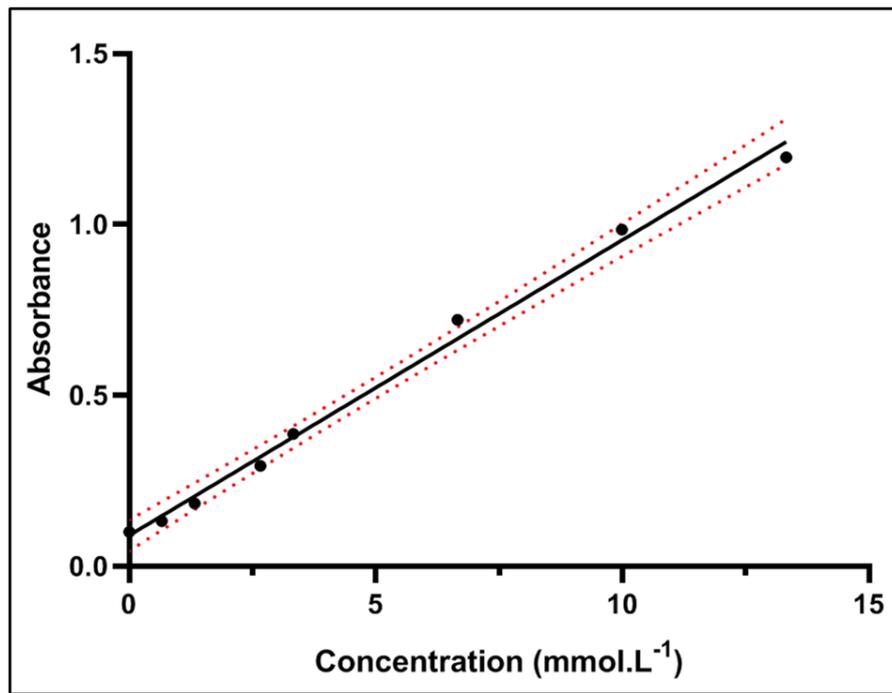


Figure 34 : Gamme étalon représentant l'absorbance à 401 nm d'une solution incubée 30 min avec différentes concentrations d'enzyme *In-NpXyn11A*. La variation d'absorbance est due à l'hydrolyse du $X_3.pNP$ par l'enzyme qui entraîne le relargage de para-nitrophénol en solution. La zone entre les pointillés rouges représente l'intervalle de confiance à 95 %.

L'absorbance mesurée sur le surnageant contenant la surface est reporté sur la droite étalon. Par régression linéaire, ce résultat permet de connaître la concentration équivalente en enzymes libres dans le tube en mmol.L^{-1} . Connaissant la concentration équivalente en enzymes libres dans le tube et les dimensions de la surface, il est possible d'obtenir la densité surfacique en enzymes en nmol.m^{-2} avec le calcul suivant :

$$D = (C / V) / S$$

Avec D : la densité (nmol/m^2), C : la concentration équivalente en enzymes libres (nmol.L^{-1}), V : le volume de solution dans le tube (L) et S : la surface de l'échantillon (m^2).

III- Enzymes greffées sur des surfaces

Un bain d'eau est agité à 37°C pendant plusieurs heures pour que sa température soit stable. Un « réacteur » d'une contenance de 8 mL est placé, avec un barreau aimanté, dans le bain d'eau (Figure 33). 1 530 μL de solution de réaction sont inoculés dans le réacteur (50 mmol.L^{-1} phosphate, 1 mg.mL^{-1} BSA, 5 mmol.L^{-1} X_3pNP et pH 7.2). La surface à étudier est fixée sur un outil d'étirement (Figure 33) puis est introduite dans le réacteur avec l'étirement voulu appliqué au préalable. La solution est agitée 45 min et 120 μL sont prélevés à 5, 10, 15, 20, 30 et 45 min.

Les échantillons prélevés sont inoculés dans une microplaque dans laquelle avaient au préalable été inoculés 60 μL de solution de carbonate de sodium à 1 mol.L^{-1} . L'absorbance est ensuite mesurée à 401 nm sur un lecteur microplaque Infinite 200 Pro de chez TECAN.

b) Essai colorimétrique sur WAX

I- Enzymes libres en solution

Tampon 1X : 50 mmol.L^{-1} en phosphate, 1 mg.mL^{-1} en BSA et un pH à 6. Tampon 10X : 500 mmol.L^{-1} en phosphate, 10 mg.mL^{-1} en BSA et un pH à 6. Solution S : WAX 2 w/w % dans de l'eau milliQ.

La solution de réaction (1 w/w % de WAX, 50 mmol.L^{-1} de phosphate, 1 mg.mL^{-1} de BSA et pH 6) est préparée avec 5 mL de solution S, 1 mL de tampon 10X et 4 mL d'eau milliQ. La solution enzymatique est préparée en diluant les enzymes avec le tampon 1X.

Une gamme étalon est faite en solubilisant du xylose (>99 %, Sigma Aldrich) à des concentrations allant de 0 à 2 mg.mL^{-1} dans le tampon 1X. La gamme étalon sera étudiée de la même manière que pour les échantillons.

1 950 μL de solution de réaction sont inoculés dans un tube Eppendorf de 2 mL et laissés dans un thermomixer à 37 °C et 1 400 rpm pendant 10 min. 50 μL de solution enzymatique (entre 1 et 10 nmol.L^{-1} en enzymes, 50 mmol.L^{-1} en phosphate, 1 mg.mL^{-1} en BSA et pH 6) sont inoculés dans le tube. Le tube est agité à 37 °C et 1 400 rpm pendant 15 min en faisant des prélèvements de 100 μL à 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 et 15 min. Chaque prélèvement est inoculé dans un tube contenant 100 μL de solution DNS.¹⁹³ Les tubes sont incubés 10 min à 95 °C puis 1 mL d'eau milliQ est ajouté. 300 μL de chaque échantillon sont inoculés dans une microplaque et l'absorbance à 540 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur microplaque (Infinite 200 Pro, TECAN). L'utilisation d'une longueur d'onde de 540 nm permet de suivre l'apparition de l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique en solution. Ce produit est issu de la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique par les extrémités réductrices du WAX (Figure 18).

II- Enzymes greffées sur des surfaces

Un bain d'eau est agité à 37°C pendant plusieurs heures pour que sa température soit stable. Un « réacteur » d'une contenance de 8 mL est placé, avec un barreau aimanté, dans le bain d'eau. 1 530 μL de solution de réaction sont inoculés dans le réacteur (50 mmol.L^{-1} phosphate, 1 mg.mL^{-1} BSA, WAX 1 w/w % et pH 6) puis 170 μL de tampon sont aussi inoculés dans le réacteur (50 mmol.L^{-1} phosphate, 1 mg.mL^{-1} BSA et pH 6). La surface à étudier est fixée sur

l'outil d'étirement (Figure 33) puis est introduite dans le réacteur avec l'étirement voulu appliqué au préalable. La solution est agitée 45 min et 50 μL sont prélevés à 5, 10, 15, 20, 30 et 45 min. Les échantillons prélevés sont inoculés dans des tubes contenant 50 μL de solution DNS.¹⁹³ Les tubes sont chauffés 10 min à 90 °C puis 90 μL sont inoculés dans une microplaque. L'absorbance est ensuite mesurée à 540 nm sur un lecteur microplaque Infinite 200 Pro de chez TECAN.

Chapitre III : Production et caractérisation de surfaces élastomères, de protéines et d'enzymes

Dans ce chapitre, nous discuterons les résultats obtenus lors de la caractérisation des différentes étapes de production du matériel nécessaire à ce projet. Il sera donc question des caractérisations des différentes étapes de synthèse de l'élastomère à base de polybutadiène, puis des caractérisations des surfaces élastomères utilisées dans ce projet pour finir avec les protéines et enzymes produites.

Différentes surfaces élastomères ont été sélectionnées dans ce projet. Il a été décidé d'utiliser une surface élastomère de polybutadiène (PB) synthétisée au LCPO où la méthode a été développée par Berto et al.²⁰ L'utilisation d'un polymère synthétique permet de contrôler la formulation de la surface obtenue. De plus, la synthèse de cet élastomère permet d'introduire dans la matrice un excès de maléimides qui auraient ensuite pu être utilisés pour greffer des protéines en surface. Il a aussi été décidé d'utiliser un film élastomère de polyisoprène (PI) commercial. Il s'agit d'un élastomère insaturé ce qui permet d'avoir une chimie de surface très comparable à celle du film synthétique de polybutadiène. Afin de montrer que la méthode de greffage est applicable à plusieurs types de surfaces, il a été décidé d'utiliser deux surfaces élastomères de polydiméthylsiloxane commerciales. La première est une surface élastomère étirable (PDMS) alors que la seconde est aussi un élastomère de polydiméthylsiloxane mais qui a une matrice renforcée avec des fibres de polyester (PDMSr), elle n'est donc pas étirable.

A. Formation de l'élastomère synthétique de polybutadiène (PB)

La production de l'élastomère à base de polybutadiène a nécessité sept étapes de synthèse (Figure 35) détaillées dans le chapitre II. Deux précurseurs ont dû être synthétisés (PB-Mal et Fur₄T-PB) puis être réticulés par une réaction de Diels Alder. La méthode de synthèse étant largement basée sur le protocole développé par Berto et al.²⁰ dans le laboratoire du LCPO, il n'y a pas eu d'étapes de développement pour les synthèses détaillées dans ce chapitre.

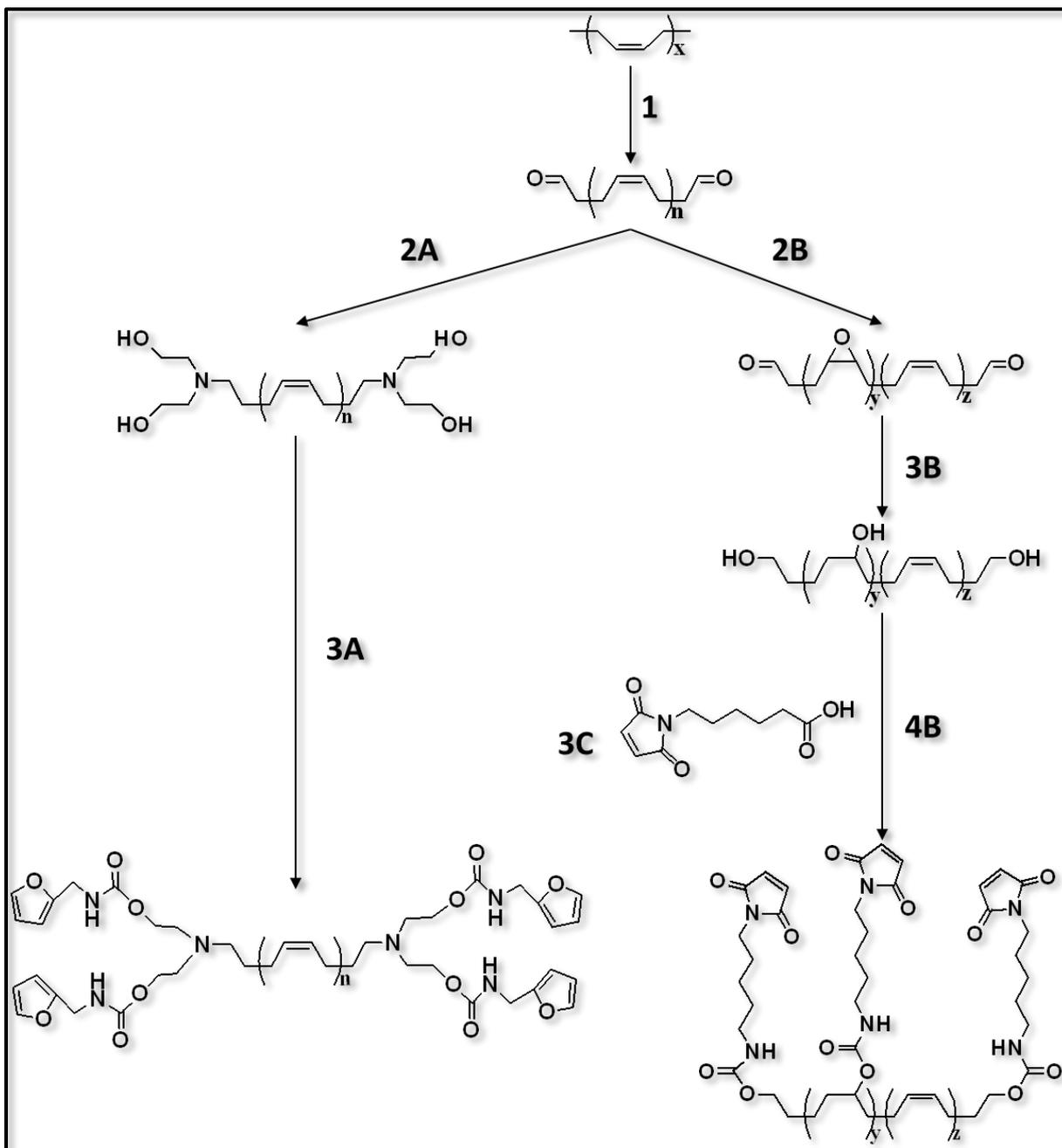


Figure 35 : Etapes de synthèses pour obtenir les deux précurseurs PPB-Mal et Fur₄T-PB qui pourront être réticulés afin d'obtenir un élastomère à base de polybutadiène.

1. Synthèse du précurseur polybutadiène fonctionnalisé furane en bout de chaîne (Fur₄T-PB)

Le polymère utilisé pour toutes les synthèses est du cis-1,4-polybutadiène, donné par la société EMAC au laboratoire du LCPO, où toutes les synthèses ont été faites. Afin d'avoir plus de certitudes sur la composition du polymère, celui-ci a été analysé par RMN ¹H et ¹³C, FTIR et

SEC. Les résultats de SEC ont montré que le polymère avait une masse molaire moyenne en nombre de 340 kg.mol^{-1} en masse vraie et une dispersité de 1.9. Par ailleurs, le spectre RMN ^{13}C a montré un pourcentage en forme cis de 98% (conformation cis observée à 27,41 ppm et conformation trans observée à 32,69 ppm).

La première étape de synthèse consiste à raccourcir le polymère initial à l'aide d'une coupure oxydante avec de l'acide 3-métachloroperbenzoïque. Après cette étape, les polymères obtenus ont des masses molaires beaucoup plus faibles, de l'ordre de 10 kg.mol^{-1} et des aldéhydes en bout de chaîne. L'AT-PB est donc un polymère réactif, grâce à ses fonctions aldéhydes, et beaucoup plus simple à manipuler grâce à son degré de polymérisation faible (Figure 36).

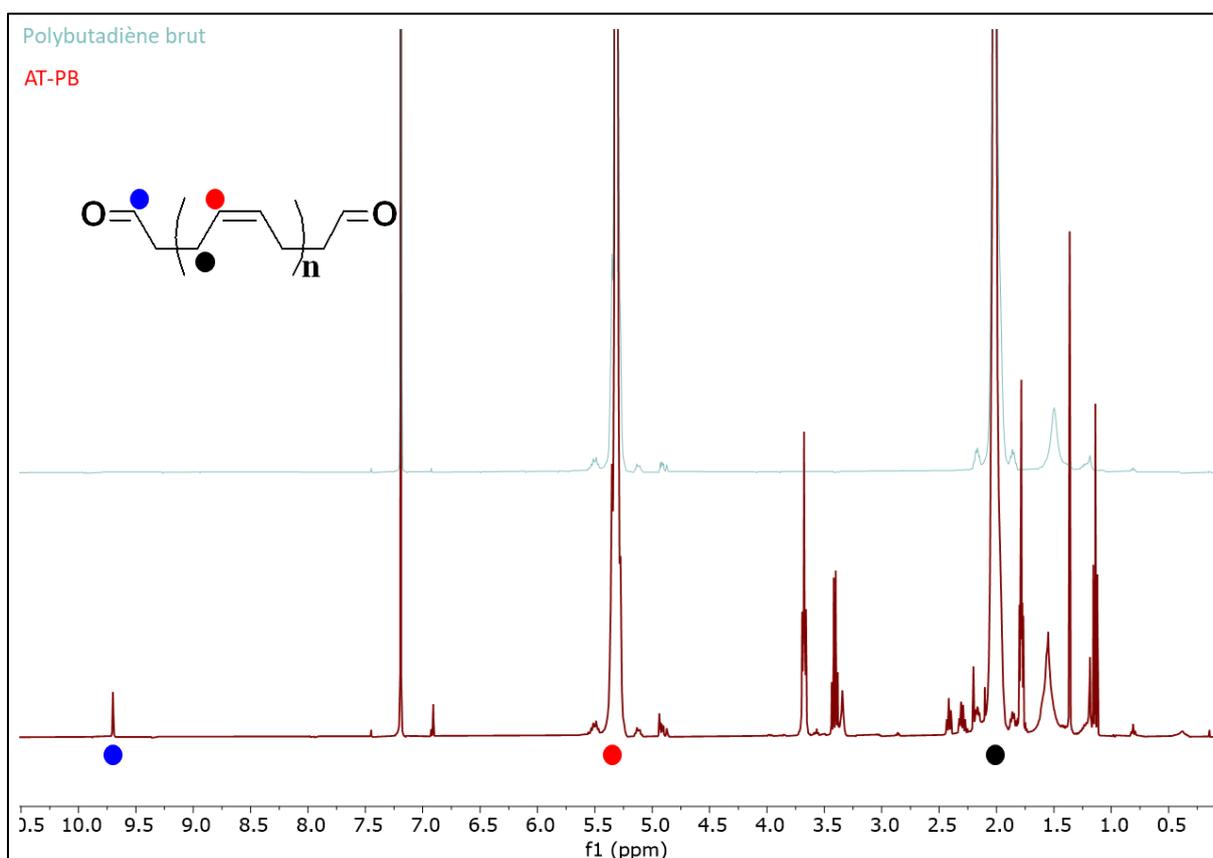


Figure 36 : Spectres RMN ^1H du polybutadiène brut (en rouge) et de l'AT-PB obtenu après coupure oxydante (en bleu). L'intensité du spectre AT-PB est exacerbée afin de pouvoir visualiser le proton associé à la fonction aldéhyde. L'analyse est faite dans du CDCl_3 à 400 MHz.

Les fonctions aldéhydes sont observables sur le spectre RMN ^1H à 9.7 ppm. La masse molaire a été calculée en utilisant le spectre RMN ^1H . Le pic des aldéhydes à 9.7 ppm est fixé à 2, puis les pics à 5.3 ppm et 2 ppm correspondant à la chaîne aliphatique du polymère sont intégrés ce qui permet de connaître le degré de polymérisation et donc la masse molaire en nombre.

Une fois l'AT-PB synthétisé, l'étape suivante consiste à faire réagir les aldéhydes présents en bout de chaîne avec la diéthanolamine pour générer deux fonctions alcools à chaque extrémité du polymère, par formation d'une imine suivie de sa réduction. Le résultat est un polymère à quatre fonctions alcools (H₄T-PB), ce qui permet une potentielle réticulation (Figure 37).

La disparition du signal à 9.7 ppm en RMN ¹H correspondant aux aldéhydes en bout de chaîne ainsi que l'apparition des signaux à 2.2 et 3.6 ppm correspondant respectivement aux protons en alpha et beta de l'azote montrent bien que la réaction a eu lieu.

La dernière étape de cette synthèse consiste à transformer les fonctions alcools de H₄T-PB en liaisons uréthane par la réaction avec un furane isocyanate. Le résultat obtenu est un polybutadiène fonctionnalisé avec quatre furanes en bout de chaîne (Figure 37).

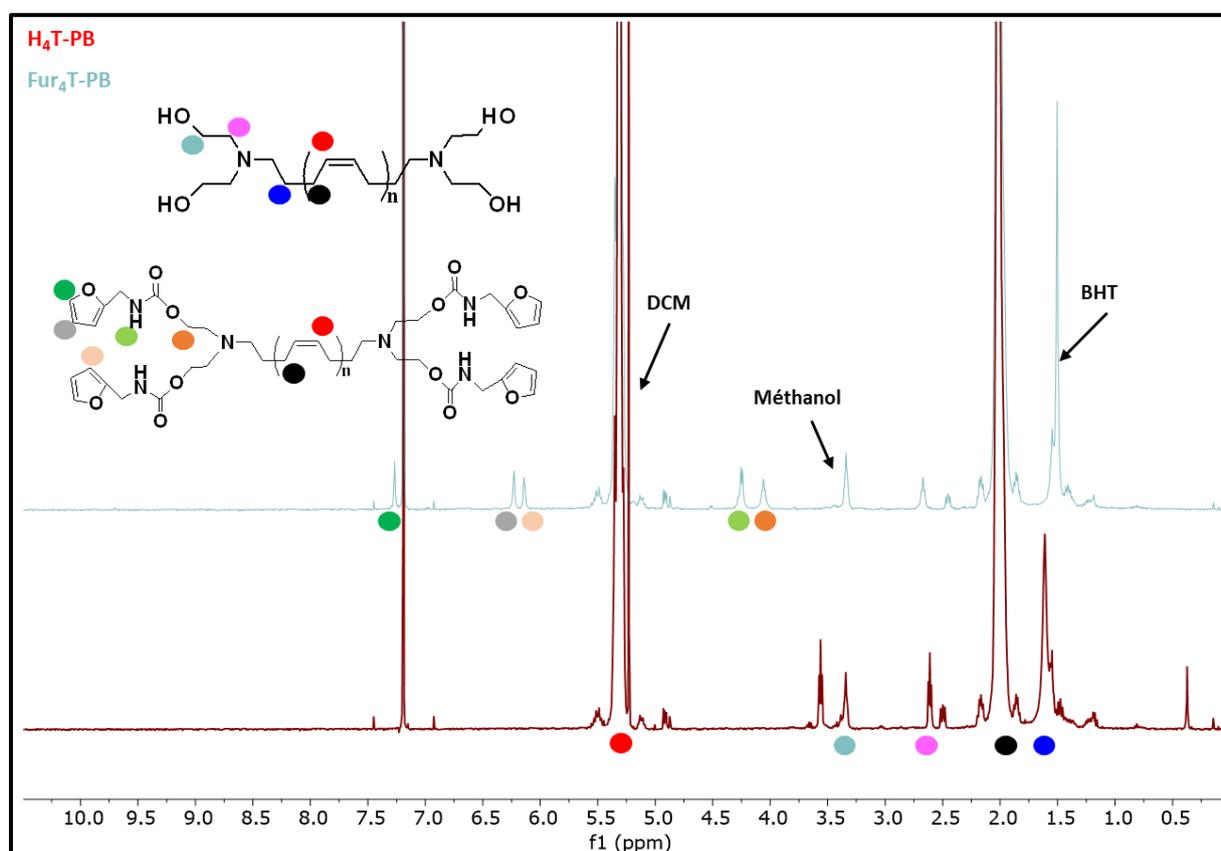


Figure 37 : Spectres RMN ¹H du H₄T-PB (en rouge) et du Fur₄T-PB (en bleu). L'analyse est faite dans du CDCl₃ à 400 MHz.

Le spectre RMN ¹H montre que les 3 signaux associés aux différents protons du furane apparaissent à 7.2 ppm pour celui qui est le plus déblindé puis à 6.1 et 6.2 ppm pour les deux autres. Il est aussi remarquable que le signal à 3.6 ppm du proton en beta de l'azote sur le H₄T-

PB a disparu. La liaison uréthane s'est donc bien formée et le polymère obtenu pourra être utilisé pour réticuler des films dans la dernière partie de la synthèse.

Suite à ces quelques étapes de synthèse, le premier précurseur Fur₄T-PB est prêt à être utilisé pour obtenir un élastomère de polybutadiène. L'étape suivante a consisté à synthétiser le second précurseur.

2. Synthèse du précurseur polybutadiène fonctionnalisé maléimide en long et en bout de chaîne (PB-Mal)

La première étape est exactement la même que pour le précurseur Fur₄T-PB et consiste à effectuer une coupure oxydante du polybutadiène brut pour obtenir l'AT-PB. Cette fois, l'AT-PB est utilisé pour être époxydé en long de chaîne pour obtenir l'AT-EPB. La synthèse est très similaire à la coupure oxydante faite en premier lieu à la différence que les fonctions époxydes générées en long de chaîne par le mCPBA ne sont pas hydrolysées avec l'acide périodique ce qui ne provoque donc pas le raccourcissement du polymère (Figure 38).

Le spectre RMN ¹H met en évidence l'apparition du signal associé aux protons en alpha de la liaison C-O de l'époxyde à 2.9 ppm. Les protons des fonctions aldéhydes en bout de chaîne sont toujours présents. Le taux de fonctionnalisation, 8,72 % des unités de répétitions dans cet exemple, est calculé en divisant l'intégration du pic à 2.9 ppm par la somme des pics à 2.9 ppm et 5.3 ppm.

L'AT-EPB est ensuite utilisé pour obtenir le OH-PB. Dans cette étape, les fonctions époxydes présentes en long de chaîne sur l'AT-EPB ainsi que les fonctions aldéhydes présentes en bout de chaîne sont réduites avec du Red-Al pour obtenir des fonctions alcools. Le taux de réduction doit être total afin d'avoir un maximum d'alcools mais surtout pour ne pas avoir de fonctions époxydes ou aldéhydes restantes qui pourraient être problématiques pour l'étape de synthèse suivante. Le résultat obtenu est un polybutadiène avec une fonction alcool à chaque extrémité ainsi que plusieurs alcools en long de chaîne. Dans cet exemple, la totalité des fonctions époxydes et aldéhydes ont réagi. 8,72 % des unités de répétitions sont donc fonctionnalisées alcool (Figure 38).

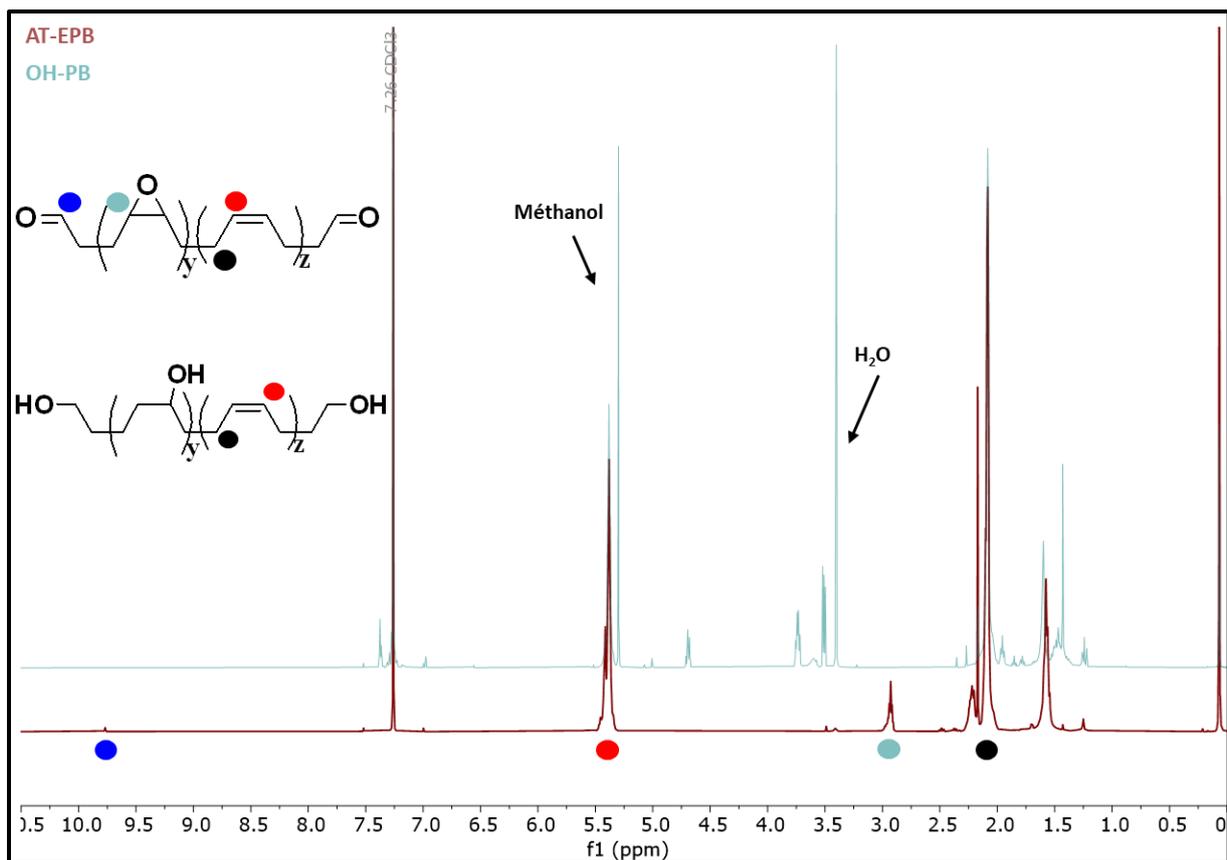


Figure 38 : Spectres RMN ^1H de l'AT-EPB (en rouge) et du OH-PB (en bleu). L'analyse est faite dans du CDCl_3 à 400 MHz.

La disparition des signaux associés aux fonctions aldéhydes (en bleu) ainsi qu'aux protons en alpha des liaisons époxydes vient bien confirmer la réaction de réduction.

Avant de procéder à la dernière étape de synthèse du précurseur PB-Mal, il est nécessaire de synthétiser un maléimide fonctionnalisé isocyanate. Ce produit n'étant pas disponible commercialement, il a été synthétisé par réaction entre l'acide 6-maleimidohexanoïque sous sa forme carboxylate et le chloroformiate d'éthyle. Une seconde substitution nucléophile est faite avec l'azoture d'acyle. La dernière étape consiste à chauffer le produit ce qui entraîne un réarrangement de Curtius qui entraîne la formation d'une fonction isocyanate (Figure 39).

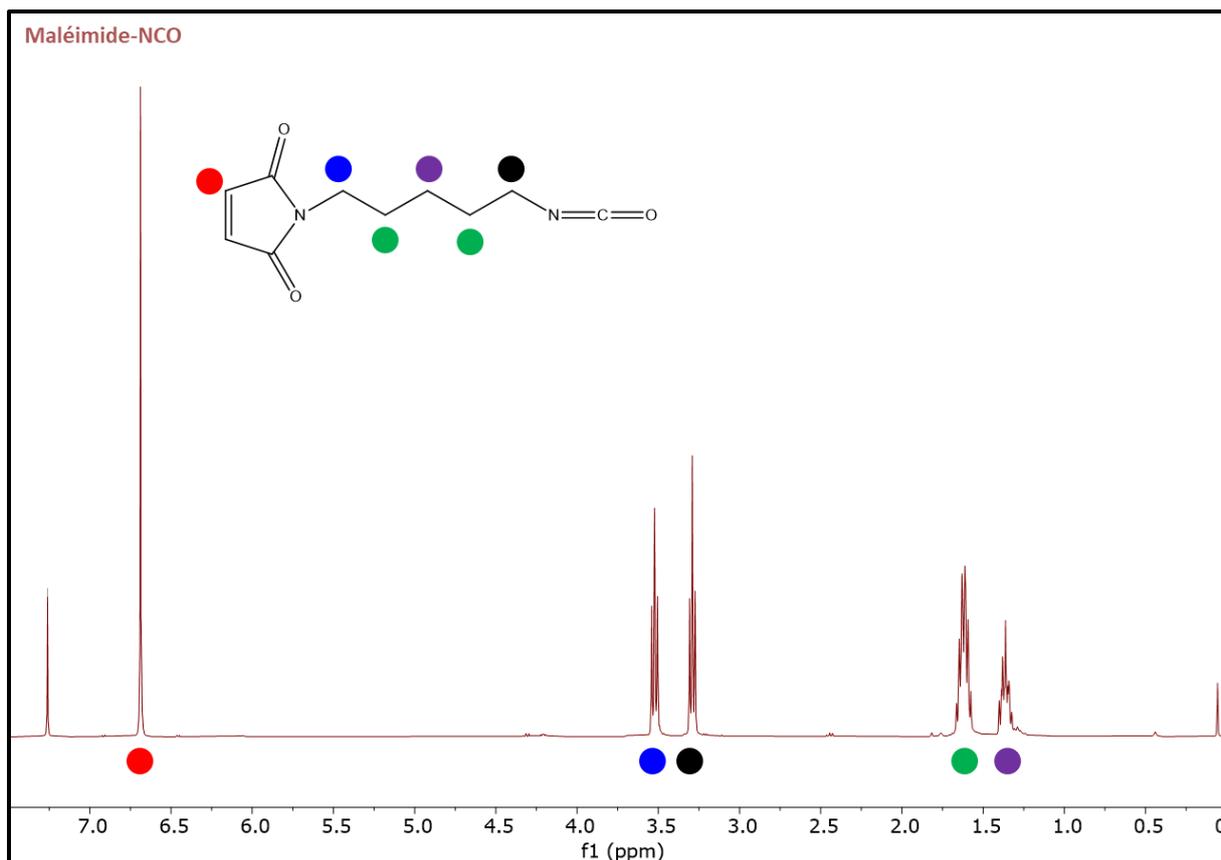


Figure 39 : Spectre RMN ^1H du Maléimide-NCO fait dans du CDCl_3 à 400 MHz.

L'intégration des différents pics sur le spectre RMN ^1H correspond bien au résultat attendu. Les deux protons de la fonction maléimide sont observables à 6,7 ppm. Les protons en alpha de la fonction maléimide et en alpha de la fonction isocyanate sont observables à 3,45 et 3,2 ppm respectivement.

La dernière étape de synthèse du précurseur PB-Mal est très similaire à ce qui a été mis en place pour produire le Fur₄T-PB à la différence que ce sont des fonctions maléimides qui sont introduites grâce aux liaisons uréthanes et que ces fonctions se trouvent en bout et en long de chaîne à la fois (Figure 40).

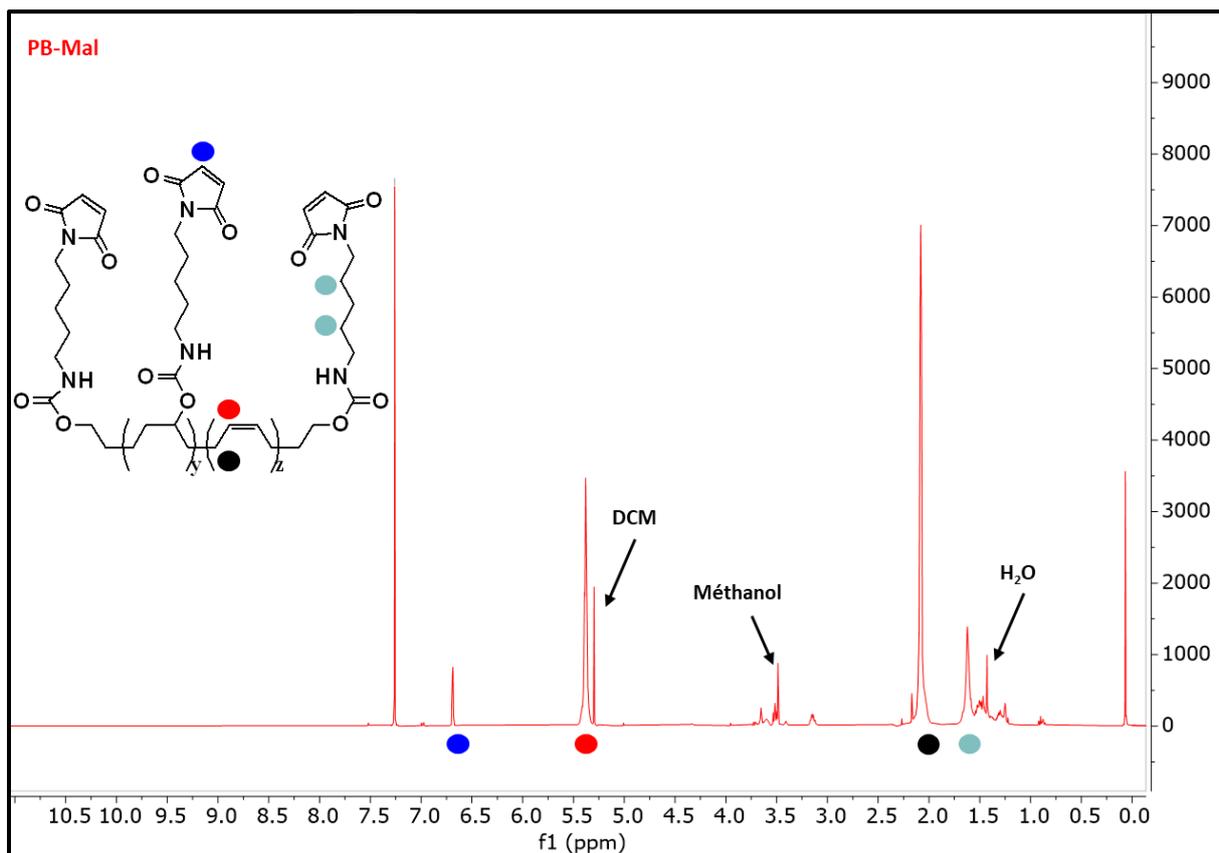


Figure 40 : Spectre RMN ^1H du précurseur PB-Mal. Spectre réalisé dans du CDCl_3 à 400 MHz.

Sur le spectre RMN ^1H , le pic associé aux protons du maléimide est bien visible à 6.7 ppm. Le pic à 1.6 ppm met aussi en évidence la présence des protons de la chaîne aliphatique entre la liaison uréthane et la fonction maléimide. La synthèse a donc été validée et le produit peut être utilisé pour réticuler des films polybutadiène.

3. Remise en forme de l'élastomère de polybutadiène pour obtenir une surface PB

Suite aux sept étapes de synthèse précédentes, deux précurseurs sont obtenus. Le premier est un polybutadiène avec deux fonctions furanes à chaque extrémité alors que le second est un polybutadiène avec des fonctions maléimides en long et en bout de chaîne. Il est donc possible de réticuler ces deux polymères en faisant une réaction de Diels Alder entre les fonctions furanes et maléimides. La réaction Diels Alder à 60 °C entraîne la formation d'adduits endo, favorisés cinétiquement et exo, favorisés thermiquement (Figure 41).¹⁹⁴

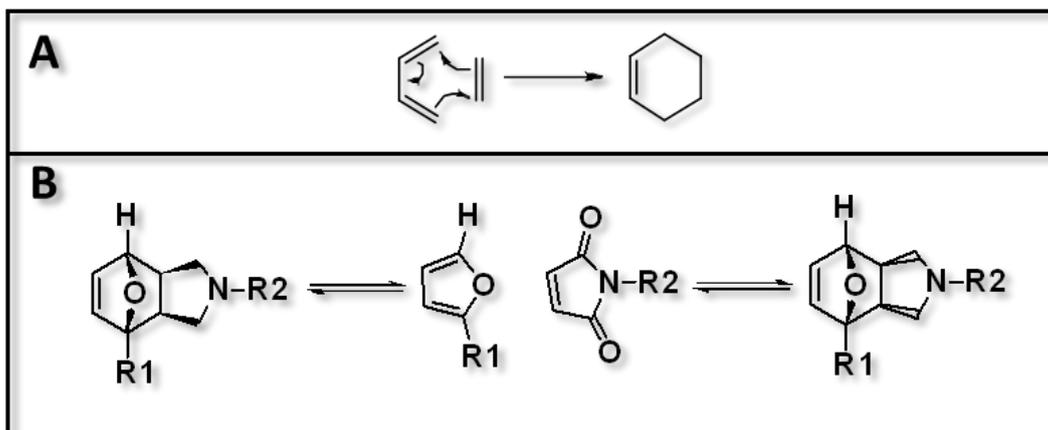


Figure 41 : A : Principe de la réaction de Diels Alder. B : Réaction de Diels Alder entre un furane et un maléimide pour former l'adduit exo (à gauche) ou endo (à droite).

Les polymères ont été réticulés en phase liquide concentrée puis ont été séchés pour obtenir un morceau d'élastomère insoluble. Le morceau d'élastomère a ensuite pu être remis en forme de film en utilisant un moule de précision à 100 °C auquel une pression a été appliquée. La température favorise la réaction de rétro Diels Alder tandis que la pression permet à l'élastomère de prendre la forme du moule. Les chaînes polymères alternent entre une forme libre et une forme réticulée tant que la réaction retro Diels Alder est possible ce qui facilite la réorganisation des polymères avec la pression. Une fois que la température baisse, seule la réaction Diels Alder est possible, les chaînes polymères perdent en mobilité et finissent de se réticuler. On obtient donc un élastomère sous forme de film en sortie du moule (Figure 28, page 73). La surface a ensuite pu être caractérisée comme toutes les autres surfaces utilisées dans ce projet.

4. Discussion

Les différentes étapes de synthèses décrites dans cette partie ont pu être faites avec succès les deux premières fois puis des soucis ont été rencontrés et il n'a plus été possible d'obtenir d'élastomères à base de polybutadiène. Les synthèses de l'AT-PB et de l'AT-EPB ont toujours pu être exécutées sans problème. Les problèmes ont été rencontrés à 2 étapes : OH-PB et réticulation du réseau final. Une tentative d'externalisation de la synthèse a été faite auprès de la société Specific Polymer® mais bien que le manipulateur et les lots de réactifs utilisés soient différents, les mêmes problèmes ont été rencontrés.

Une explication partielle provient de l'observation du comportement différent entre deux mélanges de précurseurs, PB-Mal et Fur₄T-PB, solubilisés dans du chloroforme (Figure 42). Le premier mélange n'a pas réticulé à 60 °C alors que le second a réticulé. Il est observable que le

premier mélange ne se solubilise pas. Il s'agit vraisemblablement de micro gels en suspension. Le second mélange a été fait avec des précurseurs synthétisés antérieurement et a bien réticulé. Les problèmes de réticulation du réseau final proviennent donc probablement du précurseur Fur₄T-PB qui s'est auto réticulé en formant des micro gels avant même son utilisation. Cette explication est d'ailleurs en ligne avec les autres problèmes qui ont été rencontrés et qui sont décrits plus bas.



Figure 42 : Précurseurs solubilisés dans du chloroforme. En haut : Précurseurs qui ne réticulent pas. En bas : Précurseurs capables de réticuler.

Le second problème a été rencontré au moment de la synthèse du PB-OH, précurseur du PB-Mal. C'est au moment du séchage du produit sous rampe sur la nuit que le produit a réticulé devenant inutilisable.

Six équivalents de réducteur aluminique sont utilisés à 110 °C ce qui fait un très large excès à une température élevée. Ce couple excès/température a été choisi car il permet de réaliser la réaction en 16 h. Il existe plusieurs références dans la littérature présentant des réactions avec ce réducteur utilisé dans des quantités et températures beaucoup plus faibles.^{195,196} Il est possible que l'utilisation d'une trop grande quantité de réducteur aluminique entraîne des réactions non contrôlées dans la solution. Le réducteur étant très réactif, sa neutralisation est nécessaire et est rendue très compliquée du fait de la quantité utilisée. Il est cependant nécessaire d'utiliser une quantité importante car il s'agit ici de réduire un polymère en long de chaîne et non une petite molécule libre en solution.

Il pourrait être intéressant de faire une étude pour trouver la quantité optimale de réducteur aluminique à utiliser ainsi que la température à appliquer afin de limiter les potentiels effets indésirables.

Le cœur de ce projet n'étant pas la synthèse de polymères, il a été décidé de recourir à des surfaces commerciales de façon plus appuyée que prévu initialement.

B. Caractérisation des élastomères

Les détails des caractérisations faites sur les différentes surfaces utilisées dans ce projet avant fonctionnalisation se trouvent dans cette partie. Toutes ces données ont d'une part servi à vérifier l'état de surface des échantillons, et elles seront aussi utilisées par la suite comme référence pour comparaison avec les surfaces fonctionnalisées. Comme expliqué en début de chapitre, quatre types d'élastomères ont été sélectionnés à base de trois polymères différents : du polybutadiène synthétique (PB), du polyisoprène (PI), et du polydiméthysiloxane (PDMS). L'élastomère à base de PDMS a été utilisé sous deux formes commerciales, un film simple et mince (PDMS) et un film plus épais avec une matrice renforcée avec des fibres de polyester en structure croisée (PDMSr). Les caractérisations ont été, dans la mesure du possible, identiques sur toutes les surfaces.

Afin d'avoir la certitude que les différentes surfaces soient utilisables dans le cadre de ce projet, il est nécessaire de les caractériser pour avoir des certitudes sur leur nature chimique ainsi que sur leur état de surface

1. Caractérisation de la nature chimique des surfaces élastomères

a) Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Après lavage et séchage, toutes les surfaces ont été analysées par spectroscopie FTIR. Cette méthode permet d'avoir plus de certitudes sur la composition des différentes surfaces, en particulier pour les surfaces commerciales (Figure 43).

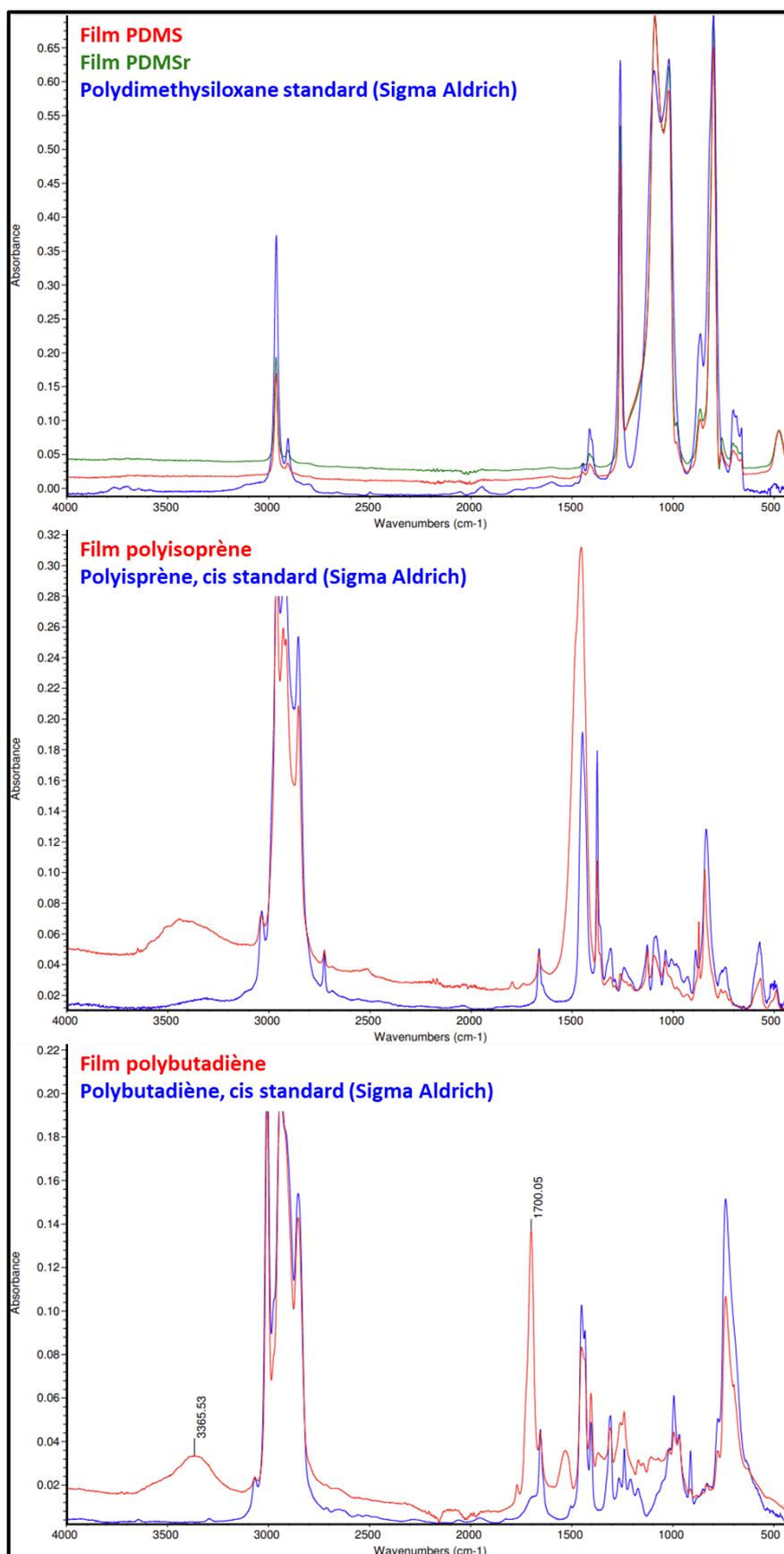


Figure 43 : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier des différentes surfaces utilisées dans le projet. En ordonnée : Absorbance. En abscisse : Longueur d'onde en cm^{-1}

Suite à cette analyse, il est possible de conclure que les surfaces commerciales ont bien les compositions attendues et qu'il n'y a pas eu de modifications de la formulation. Pour la surface PB, la formulation est beaucoup plus complexe et le spectre ne peut donc pas être superposé à un standard, mais les signaux les plus importants ont bien pu être attirés (Tableau 12).

Signal (cm ⁻¹)	Liaison chimique	Fonction associée
3 327	O-H	OH en long de chaîne
1 700	C=O	Maléimide
2 853	C-H _ Alcane	Chaîne aliphatique du PB
2 936	C-H _ Alcène	
3 005		

Tableau 12 : Principaux signaux attirés dans le spectre FTIR de la surface PB

Après avoir pu attirer ces pics, il est possible de dire qu'il s'agit bien d'une surface à base depolybutadiène qui contient des fonctions maléimides disponibles.

Les pics principaux ont aussi pu être attribués pour la surface PI (Tableau 13) et pour les surfaces PDMS et PDMSr (Tableau 14).

Signal (cm ⁻¹)	Liaison chimique	Fonction associée
2 962	O-H	OH en long de chaîne
1 260	Si-CH ₃	Méthyle
1 010	Si-O-Si	Chaîne du polymère
790	Si-C	Méthyle

Tableau 13 : Principaux signaux attirés dans les spectres FTIR des surfaces PDMS et PDMSr

Signal (cm ⁻¹)	Liaison chimique	Fonction associée
2 960	C-H	CH en long de chaîne
1 444	C-H	Méthyle
1 374		
839	C=C	Alcène

Tableau 14 : Principaux signaux attirés dans le spectre FTIR du de la surface PI.

En conclusion, les spectres FTIR ont bien permis d'identifier tous les signaux principaux pour les différentes surfaces et sont bien en ligne avec ce qui était attendu.

b) XPS (PB)

La surface PB a été la seule analysée par XPS car c'est la seule sur laquelle nous avons ultérieurement essayé de détecter la présence de protéines en surface par cette méthode (Figure 44). Sur le spectre présenté ci-dessous, on peut observer les signaux attendus des carbones, mais un certain nombre d'autres pics sont aussi présents, indiquant vraisemblablement des impuretés en surface de l'échantillon.

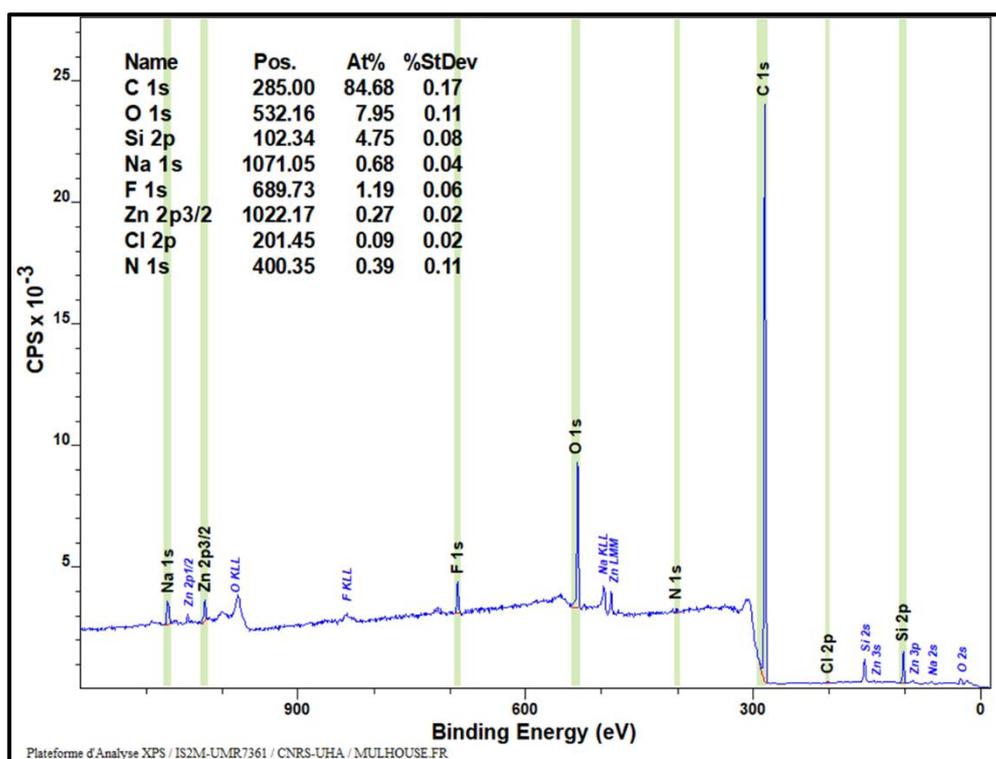


Figure 44 : Analyse XPS de la surface PB performée par Dr. P. FIOUX à l'Institut de Science des Matériaux de Mulhouse

La présence de silicium peut s'expliquer par l'utilisation de Célite®545 pour plusieurs filtrations dans la synthèse des précurseurs. La présence de sodium et de chlore peut aussi être expliquées par l'utilisation de NaCl dans la synthèse. La présence de fluor peut s'expliquer par l'utilisation de feuilles de Téflon® dans le moule de précision au moment de la remise en forme du film.

c) Taux de gonflement (PB)

Afin de s'assurer de la réticulation de la surface PB obtenue par synthèse, un test de gonflement a été mis en place (Tableau 15). Il s'agit d'un test assez classique permettant d'obtenir des informations sur le taux de gonflement du matériau ainsi que sur la fraction du matériau qui est toujours soluble.

Echantillon	A	B	C	Moyenne	Ecart type
Taux de gonflement	828 %	917 %	876 %	874 %	45 %
Fraction soluble	33 %	41 %	38 %	37 %	4 %

Tableau 15 : Résultats de l'analyse du taux de gonflement du PB.

Le matériau est bien un élastomère au vu de l'absence de dissolution complète et du taux de gonflement très élevé dans le chloroforme. Le taux de réticulation du matériau n'est cependant pas de 100% car 37 % de la matrice s'est solubilisée en présence de DCM. La fraction soluble est très importante en comparaison des mesures faites par Berto et al.¹⁹⁷ où les fractions solubles étaient inférieures à 10 %. Ceci met en évidence que le taux de réticulation des surfaces élastomères PB utilisées dans ce projet est faible. Il est possible que ce faible taux de réticulation ait un impact sur les propriétés de la surface, en particulier si celle-ci est exposée à un solvant organique.

2. Caractérisation de l'état de surface des surfaces élastomères

Suites aux premières analyses, nous avons plus d'informations sur la nature chimique des élastomères utilisés dans ce projet. Une seconde série d'analyses doit être mise en place afin de mieux connaître l'état de surface des différents matériaux. Cette information est cruciale car une grande partie de ce projet se base sur la chimie de surface mise en place sur les différents élastomères.

a) Microscopie optique

Cette étape de caractérisation avait pour objectif d'observer la présence, très probable sur les surfaces commerciales, de charges ou d'impuretés en surface. Les surfaces ont été observées avant et après lavage pour identifier des modifications. Les surfaces ont été analysées avec un grossissement X20 (Figure 45).

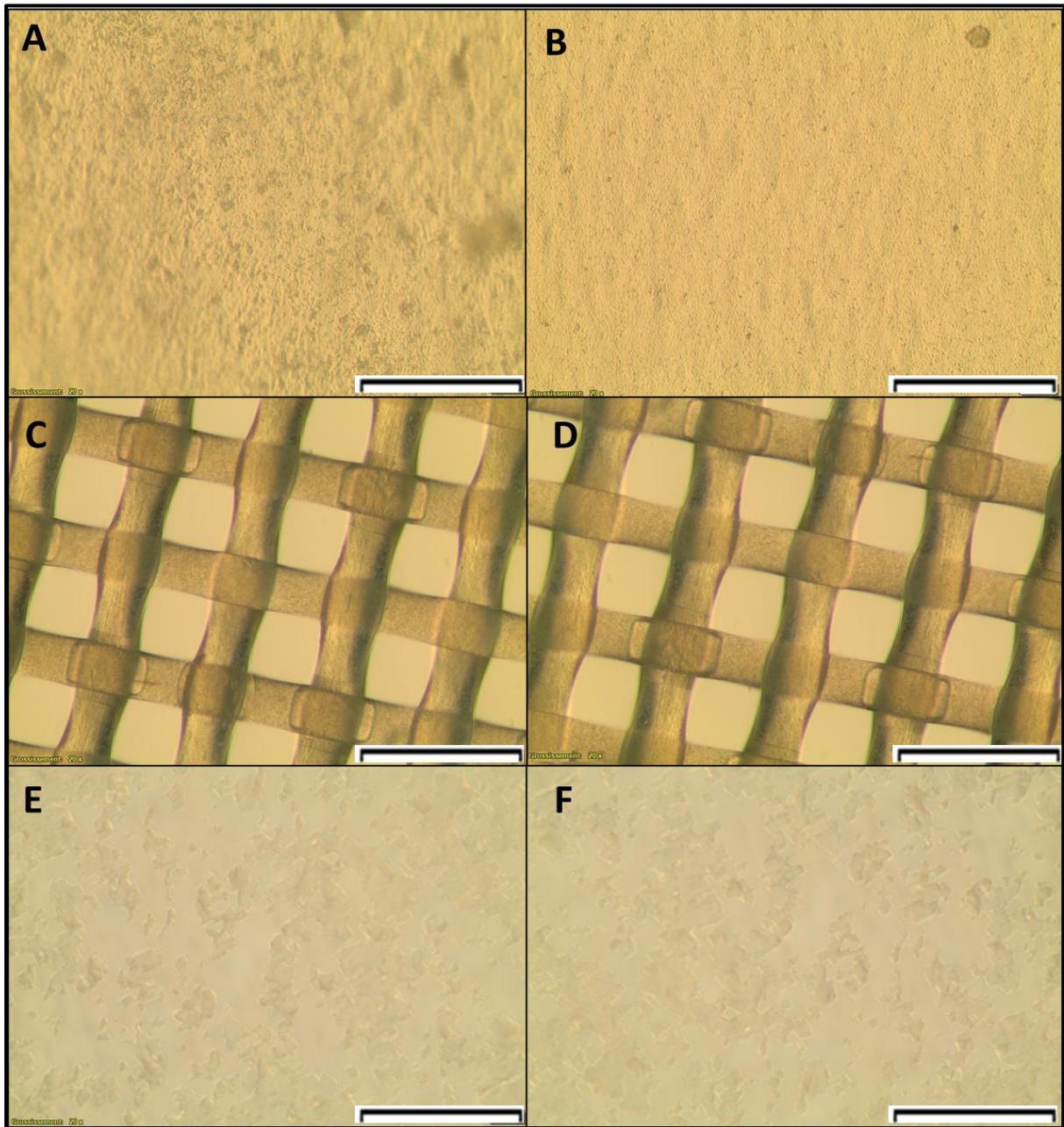


Figure 45 : Observation au microscope optique des différentes surfaces avec grossissement X20. Les barres représentent 100 μm . A / B : PI avant / après lavage. C / D : PDMSr avant / après lavage. E / F : PDMS avant / après lavage.

La surface PB n'a pas pu être analysée avec cette méthode car au moment où elle a été mise en place il n'y avait plus de surfaces PB disponibles.

Après analyse des résultats, il est observable que des charges et/ou des impuretés sont présentes sur les surfaces commerciales. Le lavage a permis d'en éliminer une grande partie même si certaines restent observables. Il se pourrait que les charges restantes soient très proches de la

surface mais sous une fine épaisseur de polymère ce qui fait qu'elles sont toujours visibles mais ne peuvent pas être lavées.

Les surfaces PDMS ne contenaient aucune charge visible par microscopie optique. Le lavage, bien qu'appliqué par soucis d'homogénéité entre les différentes manipulations, ne semble pas être utile pour éliminer des charges en surface. Sur la surface PDMSr, le maillage en fibres de polyester est observable. Le maillage est très régulier et les mailles sont très fines (moins de 50 μm) ce qui met en évidence qu'il ne sera pas possible d'étirer cette surface de manière réversible.

b) Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les surfaces ont été imagées à l'aide d'un MEB afin de s'assurer de leur qualité et observer en particulier la présence de potentielles charges en surface. L'intérêt de l'imagerie MEB a aussi été de mettre en évidence l'importance du protocole de lavage (I.A.2, page 74) L'effet de l'étirement de la surface sur la morphologie de la surface a aussi été mis en évidence dans le cas du PI (Figure 46).

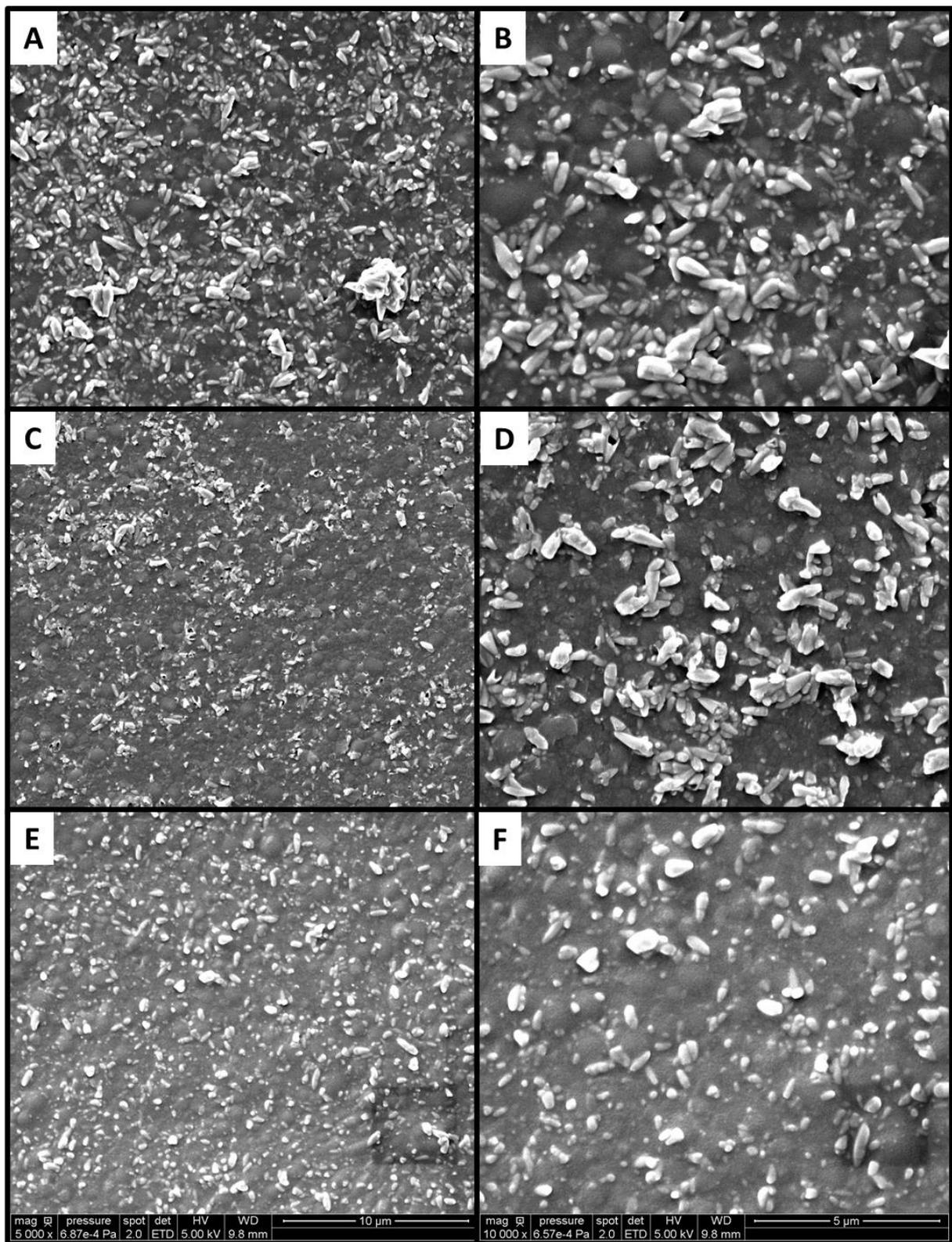


Figure 46 : Images MEB de la surface polyisoprène. A/B : Surface rincée à l'eau. C/D : Surface lavée suivant le protocole indiqué plus haut (I.A.2, page 74). E/F : Surface lavée puis étirée cinq fois puis imagée sous sa forme relâchée. Les images A, C et E ont un grossissement X5 000. Les surfaces B, D et F ont un grossissement X10 000.

Une très grande quantité d'impuretés sont observables sur la surface PI. Une analyse en spectroscopie X à dispersion d'énergie (EDX) a permis d'avoir plus d'informations sur la composition des impuretés en surface (Figure 47).

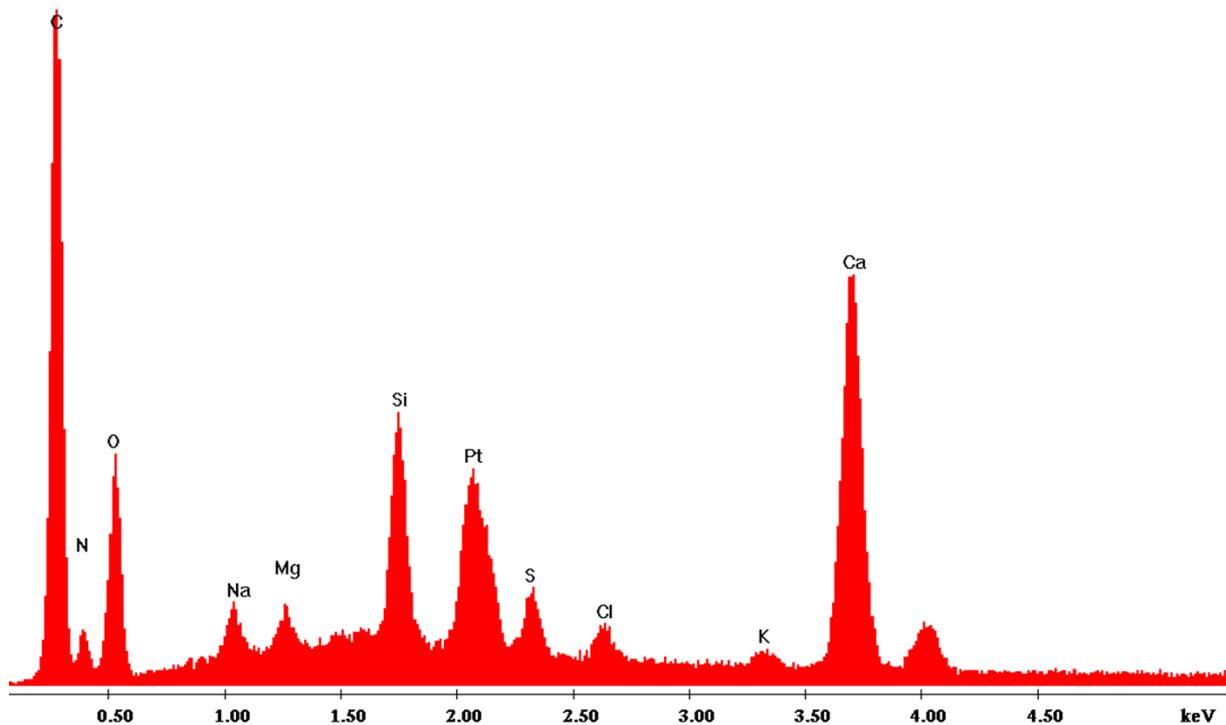


Figure 47 : Spectre obtenu après analyse EDX des impuretés observées sur la surface PI

L'analyse EDX permet d'avoir une bonne idée de la composition de la surface. La présence de platine provient de la métallisation de la surface. La forte présence d'oxygène et d'alcalino-terreux comme le magnésium et le calcium semble indiquer la présence de carbonates en surface (MgCO_3 et CaCO_3). La forte présence de silicium pourrait aussi indiquer la présence de talc ($\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$). L'utilisation de ces charges est une pratique courante dans la remise en forme de polymères¹⁹⁸ afin de diminuer le prix des matériaux, modifier leurs propriétés mécaniques et, dans le cas des élastomères de polyisoprène, éviter qu'ils ne soient collants.

Après traitement des images (Figure 48 et Tableau 16) à l'aide du logiciel ImageJ, il a été possible de conclure que 30,4 % de la surface est occupée par des charges dans le cas de la surface PI lavée. L'étape d'étirement de la surface diminue la quantité de charges en surface (12,5 % de la surface). Le taux d'occupation de la surface par les charges ainsi que la taille et la dispersité de celles-ci ont été indiquées dans le Tableau 16. La distribution de taille des charges a été indiquée (Figure 48).

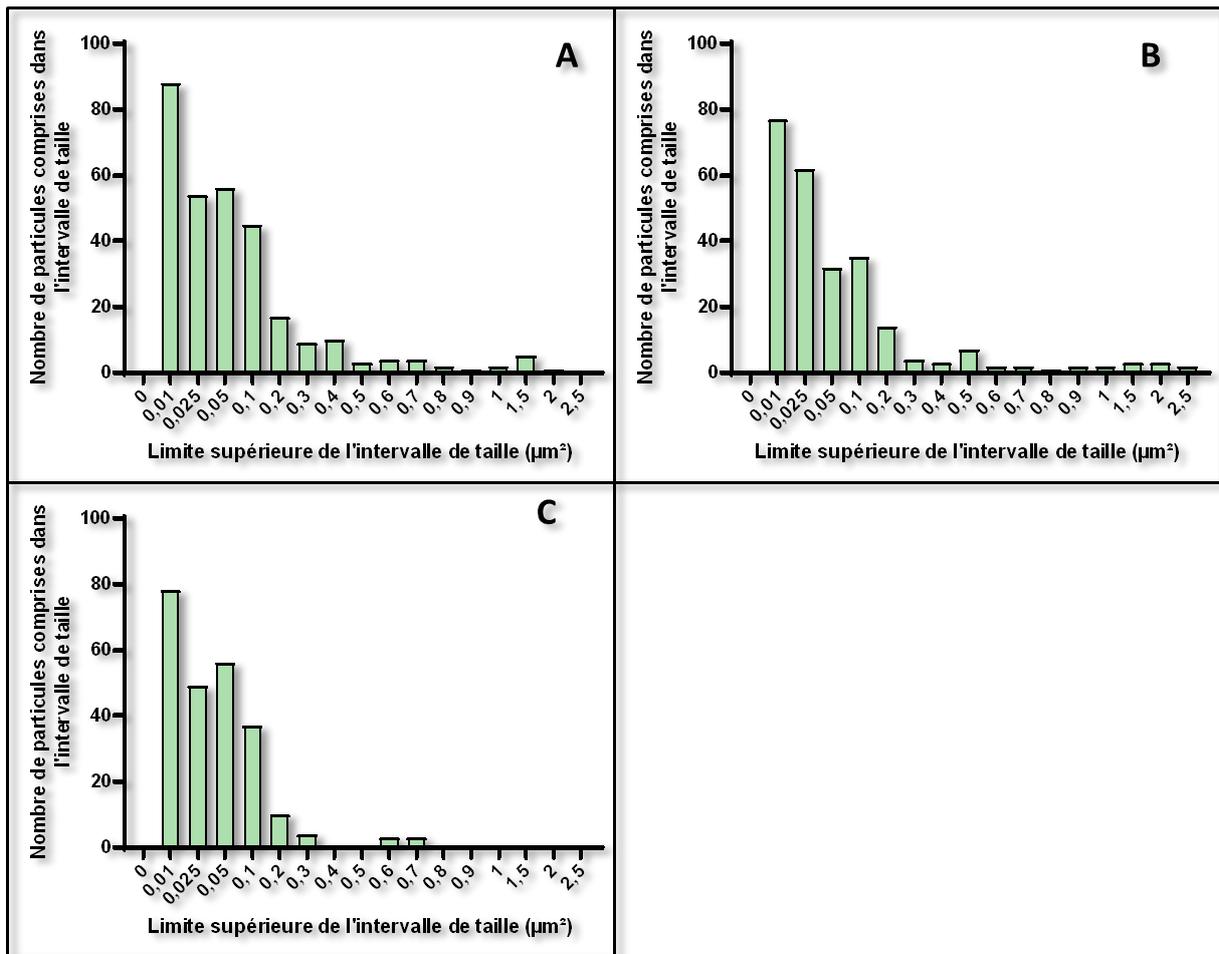


Figure 48 : Distribution des tailles de particules observées sur les surfaces PI imagées par MEB. A : Surface PI rincée à l'eau (298 charges). B : Surface lavée (I.A.2, page 74) (235 charges). C : Surface lavée puis étirée et relaxée 5 fois (251 charges). L'image C a été prise sur la surface après relaxation.

La figure ci-dessus montre que l'étape de lavage permet de diminuer le nombre de charges en surface en passant de 298 à 235. La partie C montre que l'étirement permet d'éliminer les plus grosses particules de la surface. Plus aucune charge de dimension supérieure à $0,7 \mu\text{m}^2$ n'est visible sur la surface ayant subi plusieurs étirements. Pour une meilleure lecture, les résultats ont été présentés dans le Tableau 16.

Surface	Occupation de la surface (%)	Taille moyenne des charges (μm^2)	Ecart type (μm^2)
PI rincé à l'eau	33,8	$15,6 \cdot 10^{-2}$	$\pm 37,2 \cdot 10^{-2}$
PI lavé	30,4	$16,1 \cdot 10^{-2}$	$\pm 33,1 \cdot 10^{-2}$
PI lavé, étiré et relaxé	12,5	$7,3 \cdot 10^{-2}$	$\pm 8,7 \cdot 10^{-2}$

Tableau 16 : Occupation de la surface par les charges minérales avant et après étirement de la surface PI. L'écart type correspond à la racine carrée de la variance.

Ce tableau montre qu'avec les différentes étapes la proportion de la surface occupée par des charges diminue fortement. Il est visible dans la colonne la plus à droite qu'il n'est pas possible de déterminer la taille moyenne des particules parce que l'écart type est supérieur à la valeur calculée.

Bien que la surface PI ne soit pas idéale, elle aura été largement utilisée dans ce projet du fait de la détection tardive des charges.

Les surfaces PDMS ont aussi été imagées en MEB et ont donné des résultats différents (Figure 49).

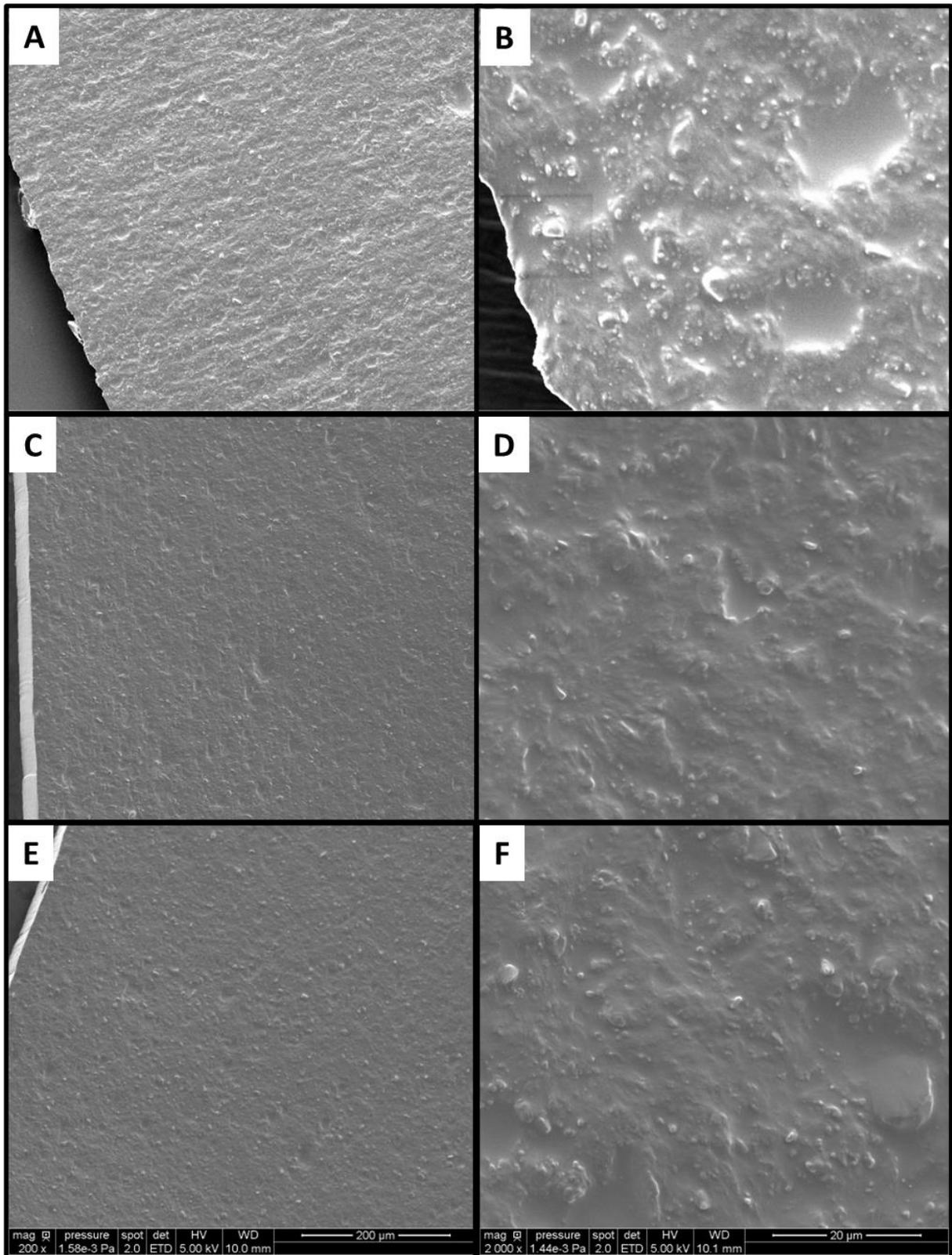


Figure 49 : Images MEB des surfaces PDMS. A/B : Surface PDMS rincée à l'eau. C/D : Surface PDMS lavée suivant le protocole indiqué plus haut (I.A.2, page 74). E/F : Surface PDMS lavée, étirée cinq fois puis imagée sous sa forme relaxée. Les images A,C et E ont un grossissement X200. Les images B,D et F ont un grossissement X2 000.

Il est observable sur cette figure qu'il y a aussi des charges présentes sur la surface PDMS. Il semblerait que la quantité de charges en surface soit tout de même beaucoup plus faible que pour la surface PI. Pour avoir plus d'informations sur ce point, les images ont été étudiées sur ImageJ afin d'extraire le nombre de charges en surface et leur distribution (Figure 50 et Tableau 17). Dans la mesure où la surface rincée à l'eau ne sera jamais utilisée, elle n'a pas été présentée dans ces figures afin de faciliter la lecture.

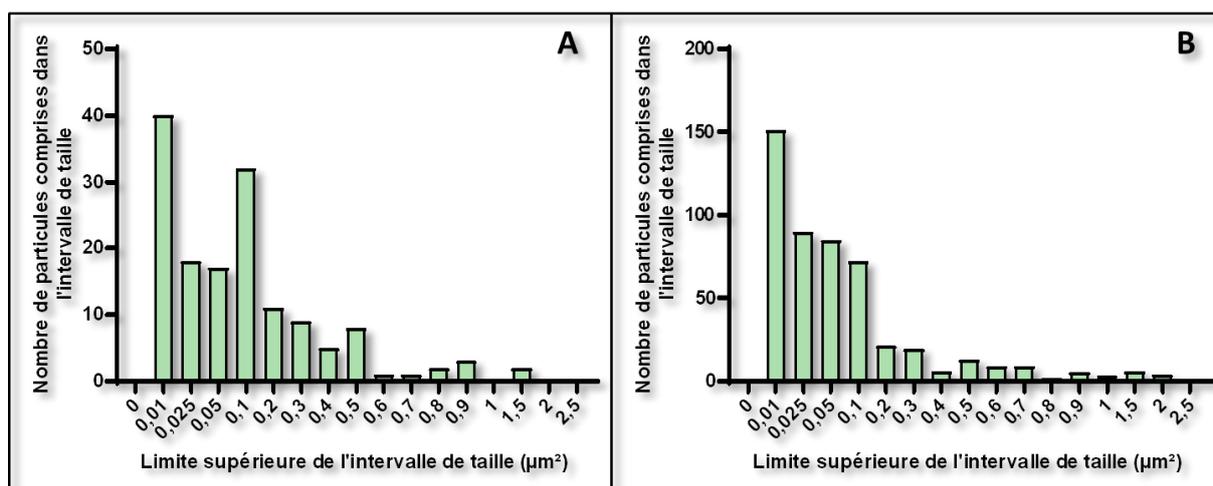


Figure 50 : Distribution des tailles de particules observées sur les surfaces PDMS imagées par MEB. A : Surface lavée (I.A.2, page 74) (235 charges). B : Surface lavée puis étirée et relaxée 5 fois (490 charges). L'image C a été prise sur la surface après relaxation.

Surface	Occupation de la surface (%)	Taille moyenne des charges (μm^2)	Ecart type (μm^2)
PI lavé	0,93	$21,4 \cdot 10^{-2}$	$\pm 39,1 \cdot 10^{-2}$
PI lavé puis étiré	1,25	$17,2 \cdot 10^{-2}$	$\pm 36,3 \cdot 10^{-2}$

Tableau 17 : Occupation de la surface par les charges minérales avant et après étirement de la surface PDMS. L'écart type correspond à la racine carrée de la variance.

Après analyse de la taille des charges en surface, il semble que les charges présentes à la suite de l'étirement soient plus petites en moyenne ($17,2 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2$) que celles présentes avant étirement ($21,1 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2$) mais cet écart est très faible. Il serait possible que les charges les plus grosses aient été relarguées en solution. Ici encore, dans la mesure où les écarts types sont supérieurs aux tailles de charges moyennes il n'est pas possible d'extraire une tendance avec certitude.

Les surfaces PB et PDMSr ont ensuite pu être imagées en MEB. Dans la mesure où ces surfaces ne présentaient pas de charges en surface, les images MEB des deux surfaces sont présentées ensemble dans la Figure 51 et aucun diagramme de répartition des charges n'a été fait.

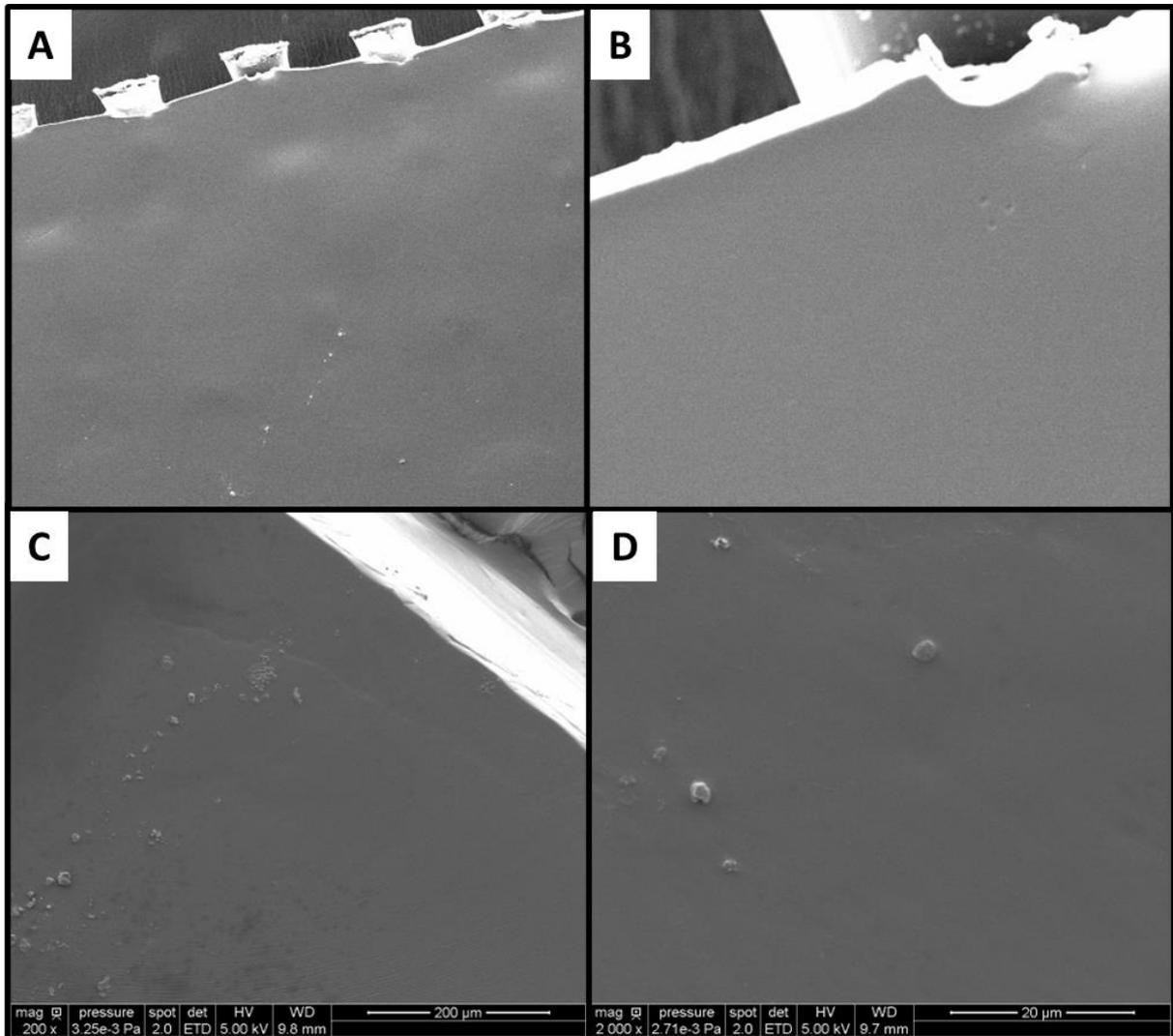


Figure 51 : Images MEB des surfaces PDMSr et PB. A/B : Surface PDMSr lavée suivant le protocole indiqué plus haut (I.A.2, page 74). C/D : Surface PB lavée suivant le même protocole. Les images A et C ont un grossissement X200. Les images B et D ont un grossissement X2 000.

Quelques charges sont observables sur les deux surfaces. Il est à noter que ces charges étaient très exceptionnelles et ont éventuellement été déposées au moment de la préparation des échantillons. Ces charges ont été utilisées pour faire la mise au point sur les échantillons ce qui était impossible dans les zones ne comportant aucune charge. Il est à noter pour la partie A de la figure, que dans le cas du PDMSr les fibres polyester qui renforcent la matrice sont bien visibles sur le haut de l'image.

En conclusion, l'imagerie MEB a permis de mettre en évidence la très forte présence de charges à la surface de l'échantillon PI et dans une moindre mesure pour l'échantillon PDMS. Il a aussi été mis en évidence que l'étirement de la surface a un impact significatif sur la présence et la distribution de taille des charges en surface, plus particulièrement pour l'échantillon PI. Il est aussi intéressant de noter que nous disposons de deux surfaces, PDMSr et PB, qui ne comportent pas de charges en surface, ou du moins pas dans des quantités significatives.

c) AFM

L'analyse AFM est utile afin de déterminer si la surface réelle et la surface projetée sont similaires. En cas de forte rugosité de surface à l'échelle du micron, la surface réelle peut devenir beaucoup plus importante que la surface projetée. Il est donc intéressant d'avoir des surfaces les moins rugueuses possibles. Un autre point important à vérifier est que la rugosité de surface permette de greffer les enzymes de façon homogène. Il serait problématique pour l'homogénéité du greffage que la surface utilisée comporte des creux ou des cavités qui soient du même ordre de grandeur que les protéines et les enzymes à greffer.

Des problèmes techniques ont été rencontrés au niveau de l'AFM ce qui n'a pas permis de faire des mesures complètes. Seules les surfaces PI et PB ont pu être imagées. Les images des deux surfaces sont représentées dans la Figure 52 mais il est à noter que les échelles utilisées ne sont pas identiques.

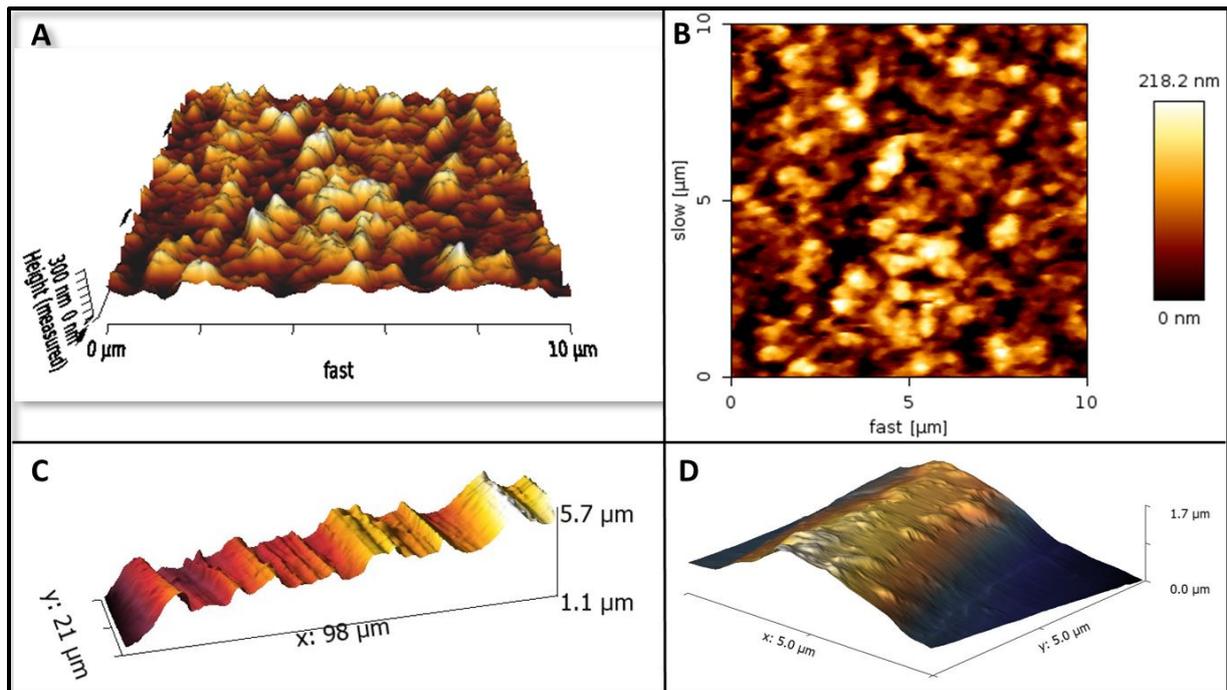


Figure 52 : Images AFM obtenues sur des surfaces PI et PB. A et B : représentations 3D et 2D d'une image faite sur une surface PI dans une zone de $10 \times 10 \mu\text{m}$. C et D : représentations 3D d'images faite sur une surface PB dans des zones de $98 \times 21 \mu\text{m}$ et $5 \times 5 \mu\text{m}$.

Sur la surface PI (parties A et B de la figure), il est observable que la rugosité de surface est importante car l'écart entre les points hauts et bas est de 218 nm. Suite aux résultats obtenus en imagerie MEB (Figure 46), il est probable que cette forte rugosité de surface soit due à la présence de charges en surface. Il est à noter que l'image AFM a été faite sur une surface PI n'ayant pas été étirée, ce qui implique une quantité de charges plus importante.

Sur la surface PB (parties C et D), une forte rugosité est observable à l'échelle la plus large (image C). Il est très probable que cette rugosité provienne de la rugosité des feuilles de Téflon® utilisées pour la remise en forme de l'élastomère (VIII-, page 73). Pour valider ce point, il pourrait être intéressant d'analyser les feuilles de Téflon® utilisées en AFM. Comme indiqué plus haut, des problèmes techniques ont été rencontrés au niveau de l'appareil et il n'a donc pas été possible de réaliser cette expérience. Nous pouvons noter sur la partie D de l'image que la rugosité à plus faible échelle est beaucoup plus faible, bien que toujours présente. Il semblerait qu'en l'absence de charges les surfaces présentent une rugosité faible.

Au vu du peu de manipulations qui ont été mises en place en AFM, il est impossible de tirer des conclusions sur l'état de surface des matériaux. Afin d'avoir plus de certitudes, il aurait été

nécessaire de faire plusieurs répétitions pour chaque échantillon, et surtout d'analyser chaque échantillon à des échelles différentes.

Nous noterons tout de même que pour la surface PB, selon les images prises ici, l'écart entre la surface projetée (21 x 98 μm) et la surface réelle est de seulement 2,7 %.

d) Angle de contact

Les analyses d'angle de contact étant utilisées ultérieurement pour analyser la spécificité de la fonctionnalisation ainsi que du greffage de protéines en surface, il est important de vérifier que la tension de surface du matériau brut ne soit pas similaire à la tension de surface attendue après fonctionnalisation et greffage, auquel cas, les analyses d'angle de contact n'auraient aucune utilité. Les mesures d'angle de contact sont faites avec de l'eau milliQ et répétées dix fois par échantillon.

Surface	Angle de contact ($^{\circ}$)	Ecart type
PB	98	7.4
PI	80	2.5
PDMS	112	1.8
PDMSr	102	3.6

Tableau 18 : Angles de contacts des différentes surfaces utilisées dans ce projet. L'écart type correspond à la racine carrée de la variance.

L'angle obtenu pour le PI est le plus faible, proche de 80° . Ceci est comparable aux mesures de la littérature.¹⁹⁹ Les autres surfaces sont plus hydrophobes, avec des angles de contact proches de 100 et 110° mais toujours en ligne avec les résultats de la littérature que ce soit pour les surfaces PDMS²⁰⁰ ou les surfaces PB.²⁰¹ Suite à ces mesures d'angles de contact, il est clair que, comme attendu, toutes les surfaces sont hydrophobes. Il devrait donc être possible de détecter la fonctionnalisation de la surface et le greffage de protéines qui devraient tous deux rendre la surface plus hydrophile.

e) Fluorimètre

Des expériences de greffage de protéines fluorescentes sur les surfaces PB et PI ont été mises en place dans ce projet. Il est donc nécessaire d'étudier ces deux surfaces au fluorimètre afin de vérifier si elles présentent de l'auto-fluorescence. Pour cette caractérisation, la surface étudiée est excitée à différentes longueurs d'ondes puis un capteur détecte les signaux émis. Dans

l'exemple ci-dessous, on observe que quand la surface PB est excitée à 400 nm elle émet un signal à 500 nm.

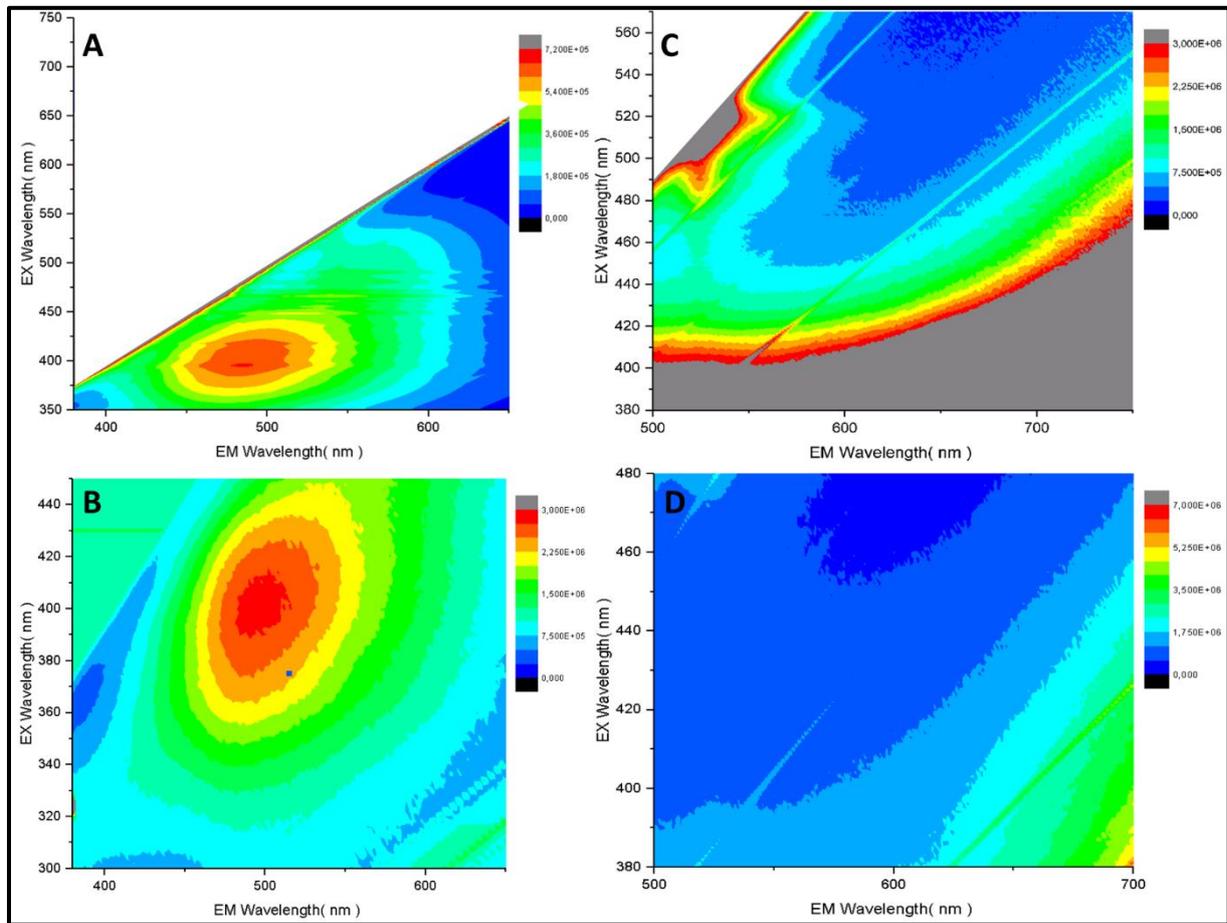


Figure 53 : Spectres de fluorimétrie : A / B : Surface PB, Scan large / zoomé sur la zone d'auto fluorescence. C / D : Surface PI, Scan large / zoomé sur la potentielle zone d'intérêt. En ordonnée : Longueur d'onde d'excitation de la surface en nm. En abscisse : Longueur d'onde d'émission en nm. L'échelle en couleur représente l'intensité di signal émis.

Suite à cette caractérisation, nous observons un domaine d'auto fluorescence pour la surface PB pour une zone d'excitation allant de 360 à 440 nm qui entraîne une émission allant de 460 à 560 nm. Pour la surface PI, aucune zone d'auto fluorescence n'a pu être observée ce qui est un bon point.

3. Conclusions sur la caractérisation des surfaces élastomères

Suite à cette série d'analyses, nous avons accumulé beaucoup d'informations sur les différentes surfaces utilisées dans ce projet. Il est important de souligner la forte quantité de charges observées sur la surface PI et, dans une moindre mesure, sur la surface PDMS. Un autre facteur à souligner est l'auto-fluorescence de la surface PB qui permettra d'expliquer des

problématiques observées plus loin dans ce manuscrit. Les potentielles problématiques rencontrées proviendront donc de l'état de surface des matériaux plutôt que de leur formulation qui semble elle bien en ligne avec ce qui était attendu.

Les problèmes de synthèse des surfaces PB seront aussi limitants dans la suite de ce projet car toutes les expériences ne pourront pas être faites de manière homogène par manque d'échantillons.

La dernière étape avant de procéder aux greffages en surface consiste désormais à caractériser les protéines et enzymes utilisées dans ce projet.

C. Caractérisation des protéines et enzymes

Les protéines utilisées dans ce projet sont bien caractérisées par l'équipe SysCarb qui m'a accueilli à TBI durant ma thèse. Le système Jo-In permettant le greffage de notre enzyme sur les surfaces élastomères est bien maîtrisé mais il a fallu apporter quelques modifications afin d'adapter les protocoles. Il a été nécessaire d'optimiser le protocole de production des variants Jo_c et In_c. Il a ensuite été nécessaire de caractériser tous les éléments produits afin de s'assurer de leur qualité. Dans un dernier temps, des analyses de réactivité des différentes protéines et enzymes ont été mises en place pour s'assurer que ces éléments pourraient être utilisés dans le cadre de ce projet. Naturellement, la protéine Jo ne contient ni tryptophane, ni cystéine. C'est assez remarquable pour le souligner, même si statiquement le faible poids moléculaire de Jo pourrait expliquer cette absence, au regard de la fréquence plutôt basse de la présence de ces deux résidus dans les protéines.

Afin d'effectuer le greffage de Jo à la surface de nos élastomères *via* une réaction thiol-maléimide, une cystéine a été introduite à la place d'une sérine dans le site multiple de clonage du plasmide permettant l'expression de Jo. Ce choix a été fait avant mon arrivée dans l'équipe SysCarb. Cette cystéine est alors introduite non pas dans la région codante du gène de Jo, limitant les effets délétères sur la reconnaissance et l'association avec In, mais du côté *N*-terminal de la protéine, dans la région codante pour l'étiquette d'affinité His₆. Comme toute introduction de mutation peut entraîner une diminution du niveau d'expression d'une protéine, et que mes expérimentations ont nécessité une quantité importante de Jo, il a été nécessaire de passer par une étape d'optimisation de l'expression du variant Jo_c. Nous avons fait de même avec le variant In_c (construit de manière similaire au mutant Jo_c), au cas où notre protocole d'immobilisation aurait nécessité de passer par le greffage de In plutôt que Jo comme prérequis.

Pour ce faire, un criblage de plusieurs paramètres (souche bactérienne, milieu de culture, concentration d'inducteur d'expression et température d'expression) a été mis en place (Tableau 19).

Paramètres	Conditions criblées		
	Jo _c	In _c	
Protéine			
Souche bactérienne	BL21(DE)3	Turner	
Température d'incubation (°C)	16	37	25
Temps d'incubation	4 h	16 h	
Concentration en inducteur (mmol.L ⁻¹)	1	0.5	
Milieu de culture	LB	TB	Auto inductible

Tableau 19 : Paramètres utilisés pour optimiser les conditions de production des protéines Jo_c et In_c. Pour chaque protéine, 18 productions avec des conditions différentes ont été étudiées.

Les niveaux d'expressions des protéines Jo_c et In_c ont été évalués sur gel SDS-PAGE. Les conditions retenues sont celles décrites dans le paragraphe I.A.3.b), page 78.

Quant à NpXyn11A, les conditions d'expressions étaient très bien définies dans l'équipe. Au final, les protéines Jo_c, In_c et NpXyn11A ont été produites et purifiées selon les protocoles décrits (I.A.3.b), page 78) et leur concentration finale mesuré par spectrométrie UV. La Figure 54 présente un gel SDS-PAGE résumant les niveaux de pureté des protéines utilisées dans cette thèse (Jo_c, NpXyn11A, In-NpXyn11A) et illustre l'association covalente du système Jo-In

1. Caractérisation des protéines

Une fois les protéines produites, leur concentration est déterminée par mesure d'absorbance UV-vis. La mesure se fait à 280 nm. L'absence de tryptophane, qui absorbe fortement dans l'ultraviolet, dans la séquence des protéines Jo_c et In_c a été soupçonnée d'impacter fortement la quantification des protéines en solution par absorbance à 280 nm. Après avoir calculé le coefficient d'extinction molaire théorique à 280 nm de Jo_c à l'aide du site <https://web.expasy.org/protparam/>, l'absorbance d'une solution contenant Jo_c a été mesurée à 280 nm et a permis d'obtenir une concentration théorique et expérimentale de Jo_c en solution. La concentration expérimentale était inférieure à la concentration théorique de 1,8 % ce qui n'est pas significatif. L'utilisation de la mesure d'absorbance à 280 nm a donc été utilisée pour quantifier les protéines Jo_c en solution. Il a en revanche été nécessaire d'utiliser la valeur

théorique du coefficient d'extinction molaire de In_c pour quantifier celle-ci à l'aide des valeurs d'absorbance mesurées à 280 nm. Les protéines et enzymes ont été caractérisées dans un second temps par migration électrophorétique sur gel SDS-Page afin de vérifier qu'elles aient bien la taille attendue et qu'elles soient toujours capables de s'auto assembler (Figure 54).

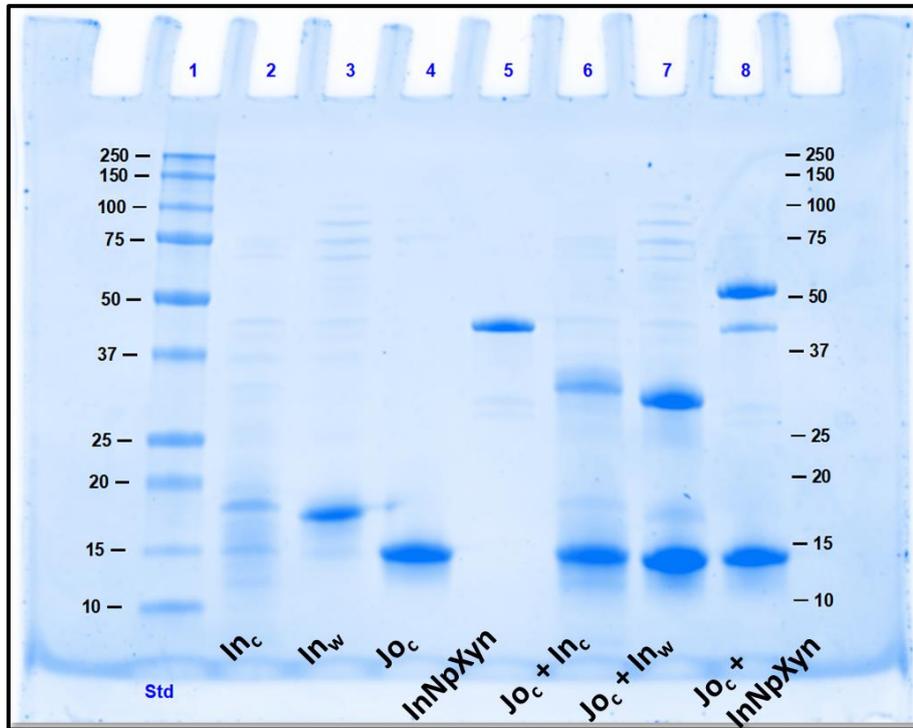


Figure 54 : Migration électrophorétique sur gel SDS-Page des protéines In_c (puit 2), In_w (puit 3), Jo_c puit 4) et $In-NpXyn11A$ (puit 5) en association les unes avec les autres ou non. Les associations Jo_c/In_c et Jo_c/In_w sont observables dans les puits 6 et 8 respectivement grâce aux bandes ayant migré à des masses molaires proches de 35 kg/mol. L'association $Jo_c/InNpXyn11A$ est observable dans le puit 8 grâce à la bande ayant migré à une masse molaire proche de 50 kg/mol. La masse est estimée grâce au marqueur de poids moléculaire inoculé dans le puit 1.

Les gels SDS-PAGE réalisés durant la thèse l'ont été en condition dénaturante, permettant ainsi de mettre en évidence l'association covalente entre Jo et In. La protéine Jo_c s'est bien associée avec son partenaire In, aussi bien sauvage que muté, mais aussi avec In exprimée en fusion avec $NpXyn11A$. La Figure 54 montre que l'ajout d'une cystéine dans la séquence de In (In_c) à la place d'un tryptophane (In_w) ne compromet pas son association avec Jo_c . Nous voyons aussi que l'enzyme chimérique $In-NpXyn11A$ s'assemble aussi sans problème avec Jo_c .

a) Cinétique d'assemblage Jo/In

Le premier test mis en place a servi à déterminer la cinétique d'assemblage des protéines. Cette étape est importante car elle peut avoir un impact sur les temps d'incubation au moment du greffage. Une autre question à laquelle il était important de répondre était de savoir si la modification des protéines aurait un impact sur les cinétiques d'assemblages. Des assemblages Jo_w/In_w , Jo_c/In_w et $Jo_c/In-NpXyn11a$ ont été mis en place avec un suivi cinétique. Les différentes fractions ont été déposées sur gel SDS-PAGE et l'analyse de ces gels a permis de déterminer le taux d'assemblage des protéines au cours du temps (Figure 55).

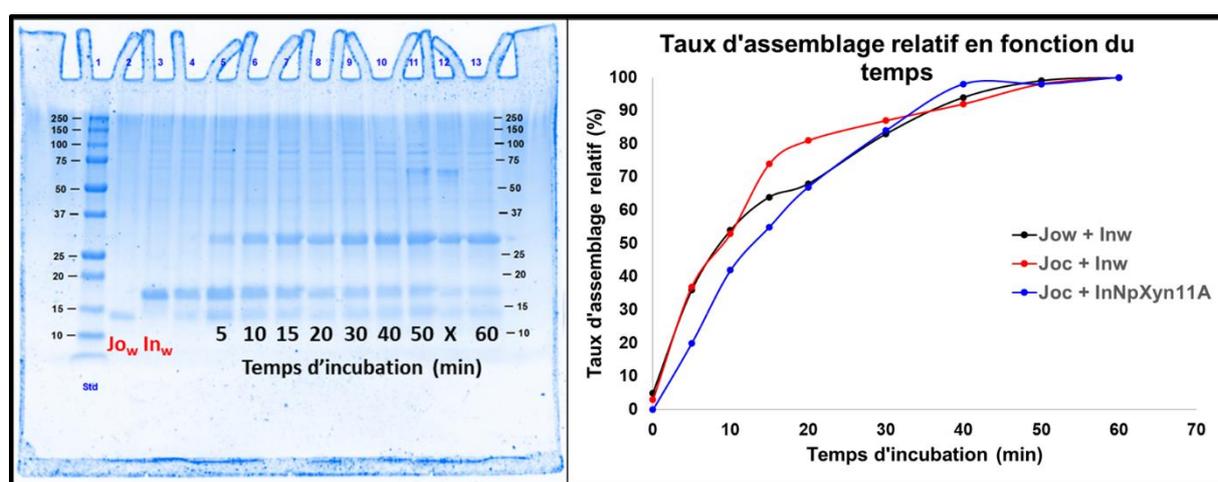


Figure 55 : Cinétique d'assemblage Jo/In dans différentes conditions analysé par migration sur gel SDS-Page. A : Gel SDS-PAGE sur lequel ont été déposées les différentes fractions de la cinétique d'assemblage Jo_w/In_w . B : Résultats issus des différentes cinétiques d'assemblage. Les trois cinétiques ont été compilées sur le même graphique.

Suite à cette analyse il a été mis en évidence que les cinétiques d'assemblages des protéines modifiées sont complètes au bout d'une heure à 20 °C et pH 7. La substitution du tryptophane par une cystéine et la fusion de In en N-terminal de *NpXyn11A* sur la protéine In n'ont pas eu d'impact significatif sur la cinétique d'assemblage.

b) Réactivité des cystéines

La présence de cystéine dans une protéine n'est pas anodine. En effet, sous certaines conditions, des cystéines peuvent être impliquées dans la formation de ponts disulfures qui jouent un rôle important de stabilisation de la structure 3D des protéines et donc sur leur activité biologique. Ces ponts disulfures peuvent aussi conduire à des associations inter-protéines et à des agrégations. La xylanase présente une cystéine dans sa séquence. Toutefois, cette cystéine est unique et ne peut donc pas former de pont disulfure intramoléculaire. De plus, cette cystéine

est enfouie dans la structure de la xylanase et ne peut donc pas non plus former de pont disulfure inter-chaîne. Par contre, la cystéine que nous avons introduite dans Jo est accessible au solvant et dans une partie de la structure de Jo qui n'est pas très encombrée. Il est alors possible que cette cystéine forme un pont disulfure inter-chaîne avec une autre protéine Jo_c. Il sera nécessaire de montrer, dans un second temps, que la cystéine introduite dans la séquence de Jo_c est disponible pour réagir avec des maléimides.

(1) *Formation de ponts disulfures inter-chaîne*

La possible formation de pont disulfure a été étudiée sur gel SDS-PAGE en condition réductrice ou non (XIII-, page 81). La présence d'un agent réducteur, comme le β-mercaptoéthanol, prévient la formation de ponts disulfure. Mais même en condition dénaturante, la formation de ponts disulfures peut être mise en évidence par l'absence d'agent réducteur. Il est alors possible d'observer des bandes de protéines migrant à des poids moléculaires compatibles à un dimère (Figure 56).

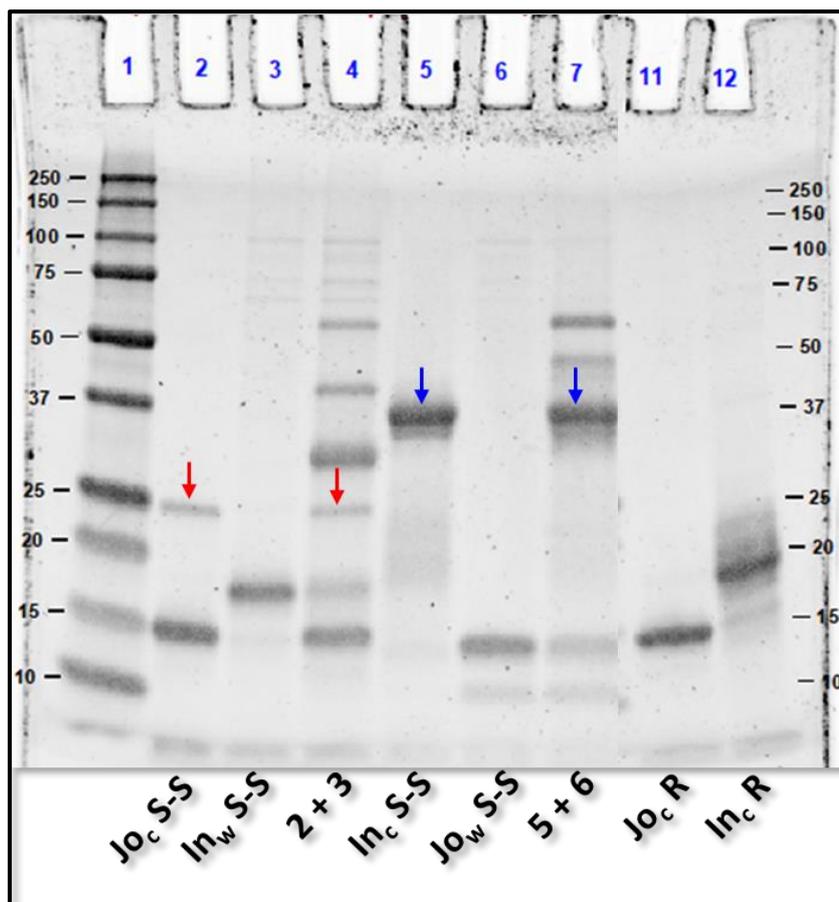


Figure 56 : Mise en évidence de la formation de ponts disulfures entre les protéines par migration sur gel SDS-Page en présence de réducteur (R) ou sans réducteur (S-S). Les dimères Jo-Jo sont indiqués par des flèches rouges. Les dimères In-In sont indiqués par des flèches bleues.

La Figure 56 montre qu'en l'absence de réducteur, il est possible d'observer, dans le puits 2, une bande de protéines ayant migré à un poids moléculaire apparent de 24 kDa, ce qui correspond au double du poids moléculaire de Jo_c. Il est donc très probable que des dimères Jo-Jo se forment en solution en l'absence de réducteur. Le même phénomène est observable dans le puits 5 avec la probable formation de dimères In-In. En revanche, quand les fractions sont chargées sur le gel en présence de réducteur, puits 11 pour Jo_c et 12 pour In_c, les bandes correspondant à de potentiels dimères ne sont pas visibles.

Les puits 6 et 3 correspondent à des protéines Jo_w et In_w respectivement, chargées sur le gel en l'absence de réducteur. Dans ces deux cas, les bandes correspondant à de potentiels dimères Jo-Jo et In-In ne sont pas présentes. Ceci met en évidence que les bandes correspondant à des dimères n'apparaissent qu'en l'absence de réducteur et avec des protéines contenant une cystéine.

Le dernier point intéressant est montré dans les puits 4 et 7. Ces échantillons mettent en évidence la possibilité de former des assemblages plus complexes que de simples couples Jo/In. De haut en bas, il est possible d'observer dans le puits 4 des bandes dont le poids moléculaire apparent correspond à : In/Jo-Jo/In ; In/Jo-Jo ; Jo/In ; Jo-Jo ; In ; Jo. Le même raisonnement peut être fait avec le puits 7 où on observe de haut en bas : Jo/In-In/Jo ; Jo/In-In ; In-In ; Jo. Il est possible que des structures encore plus complexes soient observables en mélangeant les puits 2 et 5.

Nous pouvons donc affirmer que les protéines modifiées Jo_c et In_c ont tendance à former des ponts disulfures entre elles en l'absence de réducteur. Ce point pourrait être problématique car, dans ces conditions, il n'est pas possible de connaître la quantité de protéines Jo_c réactives introduite en solution au moment du greffage de celles-ci sur la surface. Si, comme dans le cas du puits 5, la totalité des protéines en solution sont sous forme de dimères du fait de la formation de ponts disulfures, aucun greffage de protéines en surface ne sera possible. Il sera donc crucial de trouver une solution à ce problème.

(2) Réduction des ponts disulfures entre protéines Jo-Jo et In-In.

Dans le cadre de ce projet, il est important que les protéines ne soient pas sous forme de dimères afin que leurs cystéines soient bien disponibles pour réagir avec des maléimides ce qui permettra le greffage covalent des protéines.

Les protéines ont été incubées avec du TCEP²⁰² (Figure 57) afin de réduire les ponts disulfures. Cette solution a été sélectionnée car elle est largement référencée dans la littérature et que des billes d'agarose avec TCEP immobilisé en surface sont commercialement disponibles. Ces billes sont très intéressantes car elles permettent de réduire les ponts disulfures avant d'être éliminées par centrifugation ce qui évite de polluer les greffages des protéines en surface avec la présence de réactifs supplémentaires en solution.

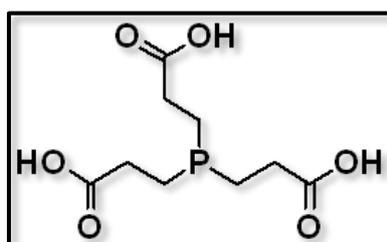


Figure 57 : Structure chimique du TCEP.

Les protéines étudiées sont incubées en présence de TCEP à différentes concentrations (allant de 10 à 100 équivalents). Elles ont ensuite été séparées sur gel SDS-PAGE en conditions dénaturantes afin de déterminer la quantité de TCEP nécessaire à une réduction complète des ponts disulfures (Figure 58).

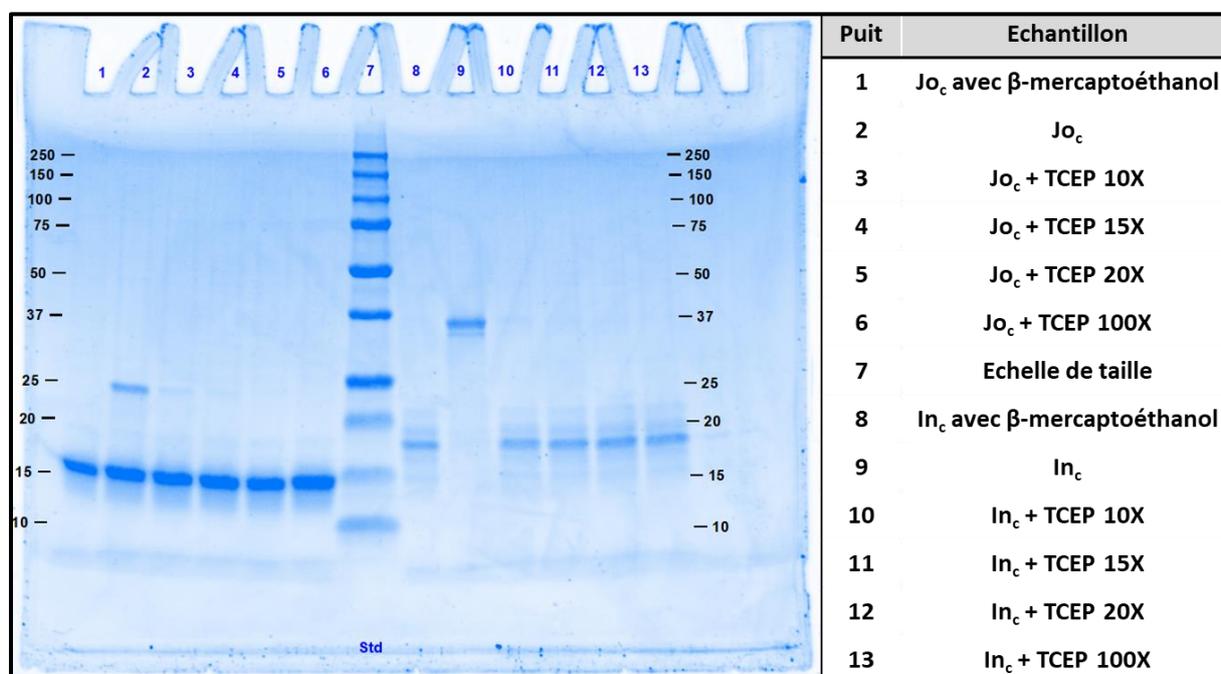


Figure 58 : Gel SDS-Page des différents essais de réduction des ponts disulfures formés par les cystéines. 10X signifie 10 équivalents molaires. Le tableau de droite indique les échantillons inoculés dans les différents puits du gel.

Une manipulation préliminaire a été mise en place et a mis en évidence que l'utilisation de 3 équivalents molaires de TCEP ne suffit pas à éliminer tous les ponts disulfures. C'est pourquoi la quantité minimale de TCEP utilisée ici est de 10 équivalents molaires. Il est observable dans les puits 3 et 10 que l'utilisation de 10 équivalents molaires de TCEP n'a pas suffi à éliminer la totalité des ponts disulfures. Cependant, la quantité de dimères restant en solution dans ces puits est très faible et n'aura pas d'impact significatif sur l'étape de greffage des protéines en surface. C'est pourquoi, dans un souci d'économie de produit, 10 équivalents de TCEP seront utilisés pour réduire les ponts disulfures entre les protéines.

Suite à cette manipulation nous avons démontré que la réduction des ponts disulfures entre les dimères à l'aide du TCEP est bien efficace mais qu'il faut utiliser une grande quantité de réducteur (20 équivalents pour Jo_c et 15 équivalents pour In_c). C'est donc ce réducteur qui sera utilisé pour préparer les protéines en amont du greffage.

(3) Réactivité Cystéine-maléimide

Le dernier test à mener pour s'assurer de la possibilité d'utiliser Jo_c pour l'immobilisation de la protéine à la surface de nos élastomères consiste à s'assurer de la spécificité de la réaction entre la cystéine de Jo_c et un maléimide. Pour ce faire, nous avons incubé une sonde maléimide, le maléimide N-(5-fluoresceinyl) (Figure 59), en présence des différentes protéines utilisées dans ce projet avant de faire migrer les solutions sur gel SDS-PAGE (Figure 60).

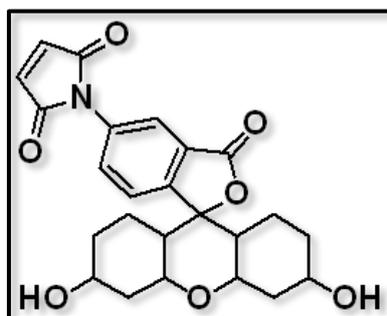


Figure 59 : Structure chimique de la sonde fluorescente maléimide N-(5-fluoresceinyl).

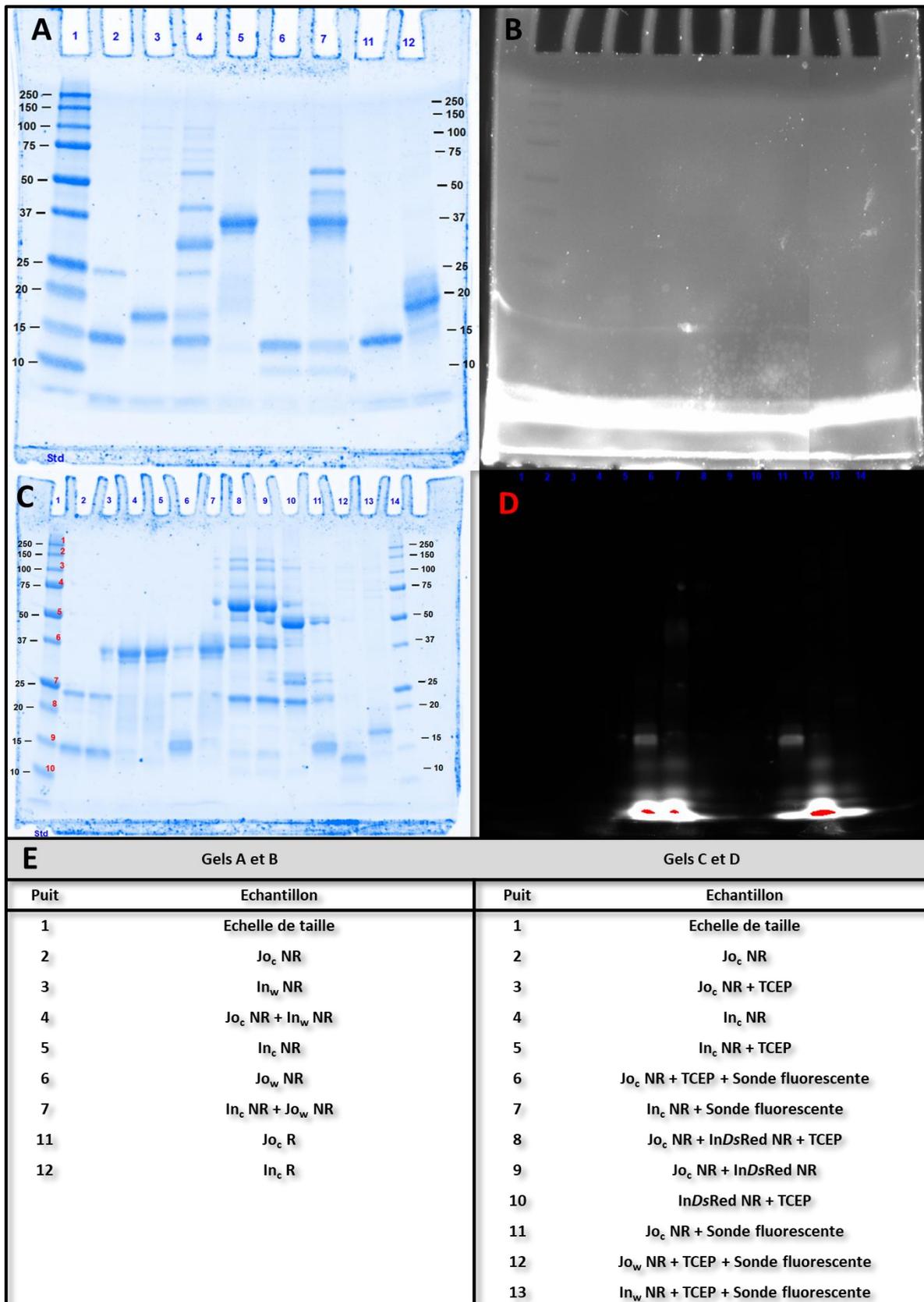


Figure 60 : A/C : Gels SDS-Page imagés dans le visible. B : Gels SDS-Page imagés en fluorescence. D : Gels SDS-Page imagés en UV et en fluorescence puis superposés. E : Tableau indiquant les échantillons inoculés dans chaque puits. R : fraction déposée avec du réducteur. NR : fraction déposée sans réducteur.

Les parties A et B correspondent au même gel révélé la première fois dans le visible et la seconde fois en fluorescence, respectivement. Sur le gel A, il est possible d'observer les bandes correspondant aux différentes protéines déposées sur le gel, alors que sur le gel B aucun signal n'est mesuré. Aucune des fractions déposées n'incluait de sonde fluorescente. Ceci met en évidence que la fluorescence qui sera observée sur le reste de la figure provient uniquement de la sonde maléimide N-(5-fluoresceinyl).

Les parties C et D correspondent à un autre gel révélé la première fois dans le visible et la seconde fois en fluorescence et en UV et superposés. Dans ce gel, les fractions déposées dans les puits 6, 7, 11, 12 et 13 contiennent la sonde fluorescente. Toutes les fractions ont été déposées sur gel en utilisant un tampon de charge ne contenant pas d'agent réducteur afin de pouvoir révéler la formation éventuelle de dimères.

Certains des échantillons (puits 3, 5, 8 et 10) ont été réduits en amont avec du TCEP afin d'éliminer les ponts disulfures. Malheureusement, cette réduction a été faite avant d'avoir optimisé le protocole (Figure 58). On observe donc dans les puits 3 et 5 que la réduction en amont à l'aide du TCEP a été inutile car les bandes associées aux dimères Jo-Jo et In-In respectivement sont toujours présentes.

Il est possible de voir dans les puits 6 et 11 que les protéines Jo_c non dimérisées avaient bien réagi avec la sonde maléimide car des bandes sont visibles en fluorescence à un poids moléculaire correspondant à Jo_c. Il est aussi possible de voir une légère fluorescence dans les puits 7 et 13. Ceci n'est pas un signal mais plutôt un reliquat de la migration de la sonde maléimide. En effet, aucune protéine n'est présente à ces distances de migration.

En conclusion, nous avons mis en évidence que le thiol présent dans Jo_c est bien réactif avec une sonde maléimide fluorescente. Il devrait donc aussi être réactif avec les maléimides présents sur la surface à greffer. Il sera donc possible d'utiliser la protéine Jo_c pour procéder à la première étape du greffage sur les surfaces.

c) *Activité enzymatique de la xylanase NpXyn11A*

Une dernière étape importante avant de procéder aux premiers greffages consiste à étudier l'activité spécifique des enzymes quand elles sont libres en solution.

Une des hypothèses sur laquelle repose cette thèse est que l'immobilisation de la xylanase sur une surface élastomère n'est pas délétère pour l'activité enzymatique. En d'autres termes, l'enzyme immobilisée ne doit pas interagir de manière non spécifique avec la surface

d'immobilisation, afin que seule la contrainte d'étirement de cette surface puisse permettre de faire varier la distance entre les molécules d'enzyme. C'est ce que le travail de Montanier et al.⁷ avait permis de faire sur une surface de silice. Il est donc important de vérifier que l'activité de InNpXyn11A soit comparable dans nos conditions expérimentales à NpXyn11A. Nous avons donc étudié et comparé l'activité de nos deux enzymes sur du X₃.pNP et du WAX (I.B.3, page 90).

Enzyme	Substrat	Activité enzymatique spécifique en masse (IU.mg ⁻¹)	Activité enzymatique spécifique en moles (IU.μmol ⁻¹)
InNpXyn11A	X ₃ .pNP	4,3 ± 0,3	175 ± 12
	WAX	3 917 ± 431	158 500 ± 17 400
NpXyn11A	X ₃ .pNP	7,3 ± 0,3	191 ± 8
	WAX	6 187 ± 495	160 500 ± 12 850

Tableau 20 : Récapitulatif des activités enzymatiques spécifiques des différentes enzymes utilisées en fonction des substrats. Les résultats sont présentés en masse et en moles. Chaque mesure a été faite en tripliqua. IU = μmol.min⁻¹

L'activité enzymatique spécifique correspond à l'activité, exprimée en μmol de produit libéré par minute, rapportée à la quantité d'enzymes en masse (mg⁻¹), ou en moles (μmol⁻¹). Il est observable dans ce tableau que les enzymes chimériques In-NpXyn11A ont la même activité spécifique que les enzymes NpXyn11A sur le WAX dans la cas où l'activité spécifique est rapportée en nombre. Ce n'est pas le cas quand l'activité est affichée en masse car les enzymes chimériques ont une masse molaire (41 544 g.mol⁻¹) beaucoup plus élevée que les enzymes (25 981 g.mol⁻¹). Il est donc important d'afficher l'activité spécifique en moles même si ce n'est pas l'unité usuelle. Il est aussi important de noter que les résultats obtenus ici sont bien en ligne avec la littérature.^{7,187} Il est aussi possible d'ajouter que les témoins négatifs indiquent qu'il n'y a aucune activité enzymatique observable en l'absence d'enzymes en solution. La présence de BSA n'a donc aucun impact sur le résultat observé. La présence de BSA dans les solutions réactives a donc été maintenue car celle-ci est importante dans les tests mis en place sur les surfaces avec enzymes greffées (I.A page 176).

L'enzyme chimérique présente une activité spécifique plus faible que l'enzyme sur le X₃.pNP. Ce résultat est en ligne avec l'étude de Enjalbert et al.²⁰³ qui montre qu'il est possible que la

présence de In du côté *N*-terminal de l'enzyme impacte la mobilité de la boucle de celle-ci et modifie la reconnaissance du substrat. Il est aussi notable que l'activité spécifique des enzymes est beaucoup plus faible sur le X₃.pNP que sur le WAX, ce qui est cohérent. En effet, la poche catalytique de *NpXyn11A* a six sites de reconnaissance dans lesquels peuvent se loger six unités saccharidiques. Cette enzyme est donc très adaptée pour s'associer avec un xylane. En revanche, le X₃.pNP est composé de trois unités saccharidiques et d'un cycle phénol. Le X₃.pNP interagit donc avec moins de résidus de la poche catalytique et son affinité avec celle-ci est moins importante. C'est cette étape d'association qui vient expliquer la différence d'activité spécifique vis-à-vis des deux substrats (Figure 17 page 61).

2. Conclusions sur la caractérisation des protéines et enzymes utilisées dans ce projet

Suite à ces différentes caractérisations il est possible de conclure que les protéines et enzymes nécessaires à l'avancement de ce projet ont bien été produites et caractérisées. Les enzymes et les protéines présentent bien les réactivités attendues. La formation de dimères pour les protéines contenant une cystéine pourrait être problématique mais il a été montré qu'il est possible de réduire les ponts disulfures à l'aide du TCEP. Afin de ne pas introduire de TCEP au sein du système, ce qui pourrait avoir un impact sur la réaction thiol-maléimide entre la protéine et la surface, la réduction des dimères a été mise en place à l'aide de TCEP immobilisé sur des billes d'agarose. Il est donc possible d'éliminer le TCEP par simple centrifugation avant de greffer les protéines sur la surface.

Il a aussi été démontré à l'aide d'une sonde maléimide que la cystéine ajoutée dans la séquence de Jo_c et In_c est bien réactive avec les maléimides. Il devrait donc être possible de procéder au greffage des protéines en surface à l'aide de la réaction thiol-maléimide.

Chapitre IV : Fonctionnalisation de surface

A ce stade, la totalité du matériel utilisé dans le projet a été produit et caractérisé. Il devient donc possible de s'attaquer au cœur du sujet. Afin de greffer les enzymes il est primordial de fonctionnaliser les surfaces. De par leurs formulations les surfaces utilisées sont très peu réactives. Pour simplifier les démarches, il est intéressant d'utiliser une méthode de fonctionnalisation identique pour toutes les surfaces. Il a donc été décidé d'utiliser un traitement plasma.

A. Traitement plasma des surfaces élastomères

Le traitement plasma a été réalisé avec les mêmes paramètres sur toutes les surfaces (I-, page 83). D'une façon générale, les surfaces lavées sont traitées par un plasma argon sous vide.

Le traitement plasma génère des radicaux en surface. Ces radicaux augmentent la tension de surface du polymère ce qui diminue l'angle de contact observé lorsqu'une goutte d'eau est déposée sur la surface.²⁰⁴ La présence des radicaux en surface est de très courte durée car ceux-ci réagissent très rapidement avec les molécules environnantes. Il a été montré que sur des supports polymères exposés à l'atmosphère, le temps de vie des radicaux libres est inférieur à une minute.²⁰⁵ Il a été mis en évidence dans la même étude que le traitement sous vide permet d'optimiser la génération des radicaux libres au contraire des espèces libres à faible masse molaire qui viennent l'inhiber, d'où l'importance de bien sécher les surfaces avant de les mettre sous vide.

Une étude de Takamatsu et al.²⁰⁶ a permis de mettre en évidence que l'utilisation d'argon dans une chambre plasma permet de générer des ions argon ainsi que des électrons. Ces deux espèces interagissent avec l'élément introduit dans la chambre et forment des radicaux sur celui-ci. Dans le cas où la surface subit un plasma argon puis est exposée à l'air, les radicaux générés forment des fonctions contenant des oxygènes et de l'azote car ce sont les éléments les plus disponibles dans les molécules environnantes.²⁰⁷ Dans le cadre de cette étude, la surface est directement plongée dans l'eau milliQ suite au plasma argon afin que les molécules environnantes soient très majoritairement de l'eau. Grâce à cet environnement, les radicaux en surface vont générer un maximum de fonctions alcools en surface. En étant exposés à l'eau, les radicaux peuvent aussi former des fonctions peroxydes²⁰⁸ mais ces fonctions vont être très minoritaires par rapport aux fonctions alcools.

La quantification des espèces secondaires générées par les radicaux est théoriquement possible⁵⁸ à l'aide du 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Figure 61) mais nous ne disposons pas de suffisamment d'espèces à doser dans le cadre de cette étude. Les espèces étant générées sur des surfaces, leur quantité en moles est très faible et il devient donc très compliqué de les quantifier. Après de multiples étapes de développement, il a cependant été possible de quantifier les espèces générées en surface. La méthode de quantification repose sur la mesure d'absorbance du DPPH en solution à 520 nm. En présence d'alcools et de peroxydes, le DPPH est réduit et son absorbance à 520 nm diminue très fortement. En utilisant une très grande surface de 10 cm² et une faible concentration en DPPH de 0.1 mmol.L⁻¹, il a été possible d'observer une variation d'absorbance entre le témoin négatif, contenant une surface non traitée, et la solution contenant l'échantillon traité au plasma (Figure 61).

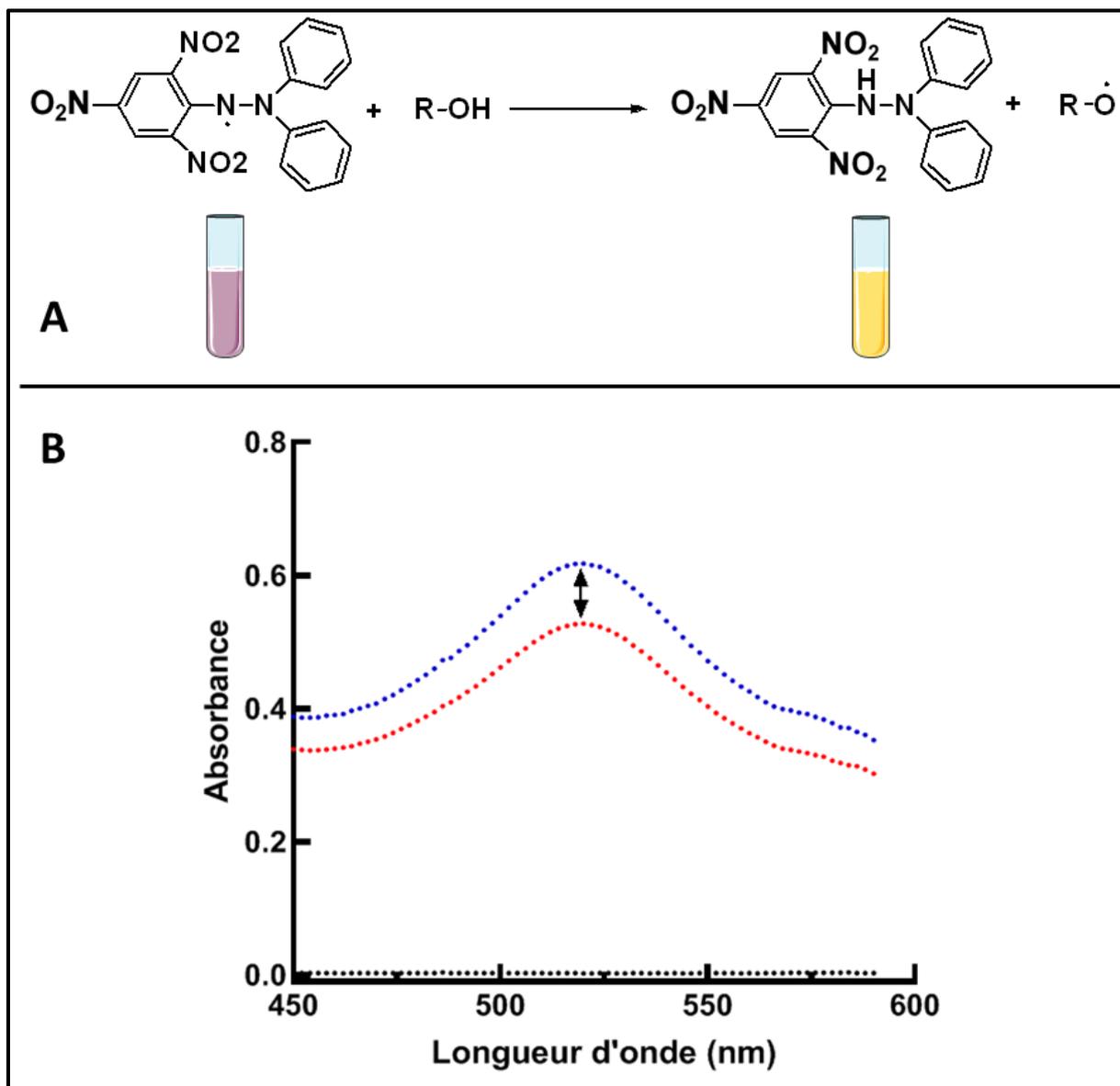


Figure 61 : A : Réaction entre une fonction alcool en surface et le DPPH entraînant la diminution de l'absorbance à 540 nm. B : Variations d'absorbance à 540 nm due à la réaction entre les fonctions hydroxyles et le DPPH

Connaissant la variation d'absorbance observée et le coefficient d'absorption molaire du DPPH, il est possible de conclure que des radicaux ont été générés en surface avec une densité de $9 \mu\text{mol}/\text{m}^2$. Les études référencées dans la littérature n'étaient que qualitative, il n'a donc pas été possible de trouver une référence indiquant de valeur chiffrée pour prouver que le résultat que nous avons obtenu est en ligne avec les attentes. Bien que s'agissant d'une densité élevée (100 fois supérieure à la densité de greffage des protéines visée dans notre projet), il s'agit surtout d'une approximation car la quantité mesurée est très faible et les différentes manipulations peuvent induire des erreurs. En considérant que l'erreur de manipulation entraîne

des variations énormes de 50 %, nous obtiendrions un résultat minimal de 4,5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, ce qui reste 50 fois plus que la densité de greffage visée pour les protéines qui est, elle, de 90 nmol/m^2 (I.A.2, page 151).

Il est important de noter que les fonctions alcools générées en surface, suite au bain d'eau, ont une durée de vie en surface beaucoup plus longue que celle des radicaux générés par le traitement plasma car il s'agit de fonctions stables chimiquement. Les radicaux libres ont une durée de vie variable en fonction du radical généré et de son environnement. Il est donc possible de rencontrer des radicaux ayant des durées de vies allant de la milliseconde à quelques secondes.²⁰⁹

Cependant, il a été montré que la mobilité locale des polymères dans les matrices élastomères peut entraîner des modifications significatives de la topologie de surface.²¹⁰ Une étude de Lawson et al.²¹¹ a mis en évidence que la mobilité locale des polymères peut aussi modifier la fonctionnalisation de surface. L'étude a été menée sur des surfaces polymères qui ont subi un traitement corona générant des fonctions réactives en surface. L'évolution de l'angle de contact au cours du temps des surfaces traitées a permis de mettre en évidence que la mobilité locale des polymères faisait disparaître les fonctions réactives de la surface ce qui a fait augmenter l'angle de contact.

Les élastomères utilisés étant au-dessus de leurs T_g , les chaînes polymères ont une mobilité locale. Plus l'écart entre la température et la T_g du matériau est important, plus la mobilité des chaînes polymères est élevée. Dans le cadre de ce projet, les surfaces élastomères sont utilisées à 20 et 37 °C alors que leurs T_g sont de - 70, - 105 et - 120 °C pour le polyisoprène, le polybutadiène et polydiméthylsiloxane respectivement.²¹² Les écarts entre température d'utilisation et T_g des matériaux oscillent donc entre 80 et 160 °C ce qui va induire une forte mobilité locale des chaînes polymères au sein des surfaces élastomères. La mobilité des chaînes polymères peut provoquer l'internalisation dans la matrice de fonctions initialement en surface. Les fonctions alcools étant beaucoup plus petites que la taille des mailles de l'élastomère, elles peuvent être déplacées au sein de la matrice élastomère et être internalisées avec le temps. Les fonctions alcools internalisées seront toujours très proches de la surface mais ne seront plus accessibles pour être utilisées dans les différentes étapes de greffage.

Les fonctions alcools sont beaucoup plus hydrophiles que la matrice polymère brute, la disponibilité des fonctions alcools en surface a donc pu être étudiée par évolution de l'angle de contact au cours du temps (Figure 62).

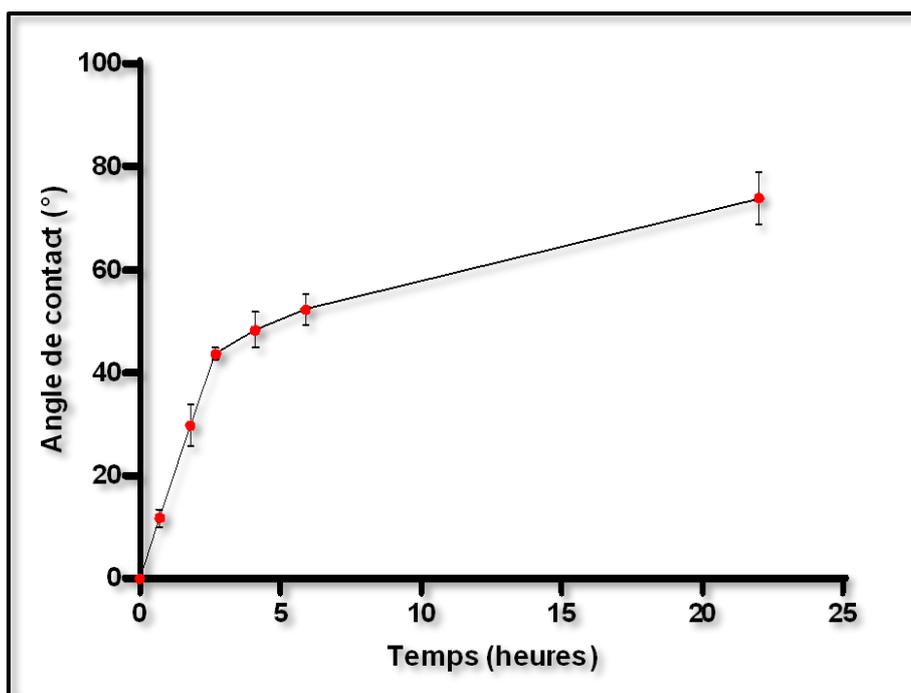


Figure 62 : Evolution de l'angle de contact pour une surface polyisoprène traitée avec un plasma argon et plongée dans l'eau 10 minutes.

Dans cette étude, l'angle de contact à t_0 est trop faible pour être mesuré correctement et a donc été fixé à zéro arbitrairement. L'angle de contact augmente ensuite très rapidement du fait de l'internalisation des fonctions hydrophiles dans la matrice. Au bout de 6 h d'exposition à l'air, le point d'équilibre est presque atteint. Après 24 h d'exposition à l'air à l'abri de potentielles poussières, l'angle de contact est presque revenu à son niveau d'origine de 80° . Il est donc nécessaire d'utiliser la surface très rapidement après fonctionnalisation pour éviter que les fonctions alcools soient internalisées dans la matrice et ne soient plus disponibles pour des réactions ultérieures.

B. Fonctionnalisation maléimide

1. Principe

Les fonctions alcools générées à la surface de nos élastomères nous permettent par la suite de greffer des fonctions maléimides, elles-mêmes impliquées dans la formation de liaisons thiol-maléimide avec la cystéine introduite dans la séquence protéique de Jo. Pour obtenir ce résultat, une « solution réactive » est préparée en parallèle du traitement plasma de la surface. Cette solution contient de l'éthoxy,(5-maléimido pentyl) anhydride généré à partir de l'acide maléimide hexanoïque (Figure 63). Cette synthèse a été choisie car c'est la même, à une étape

près, que celle qui est utilisée pour générer les maléimides fonctionnalisés isocyanates utilisés dans la synthèse de l'élastomère à base de polybutadiène. Les produits sont donc disponibles et la méthode est maîtrisée.

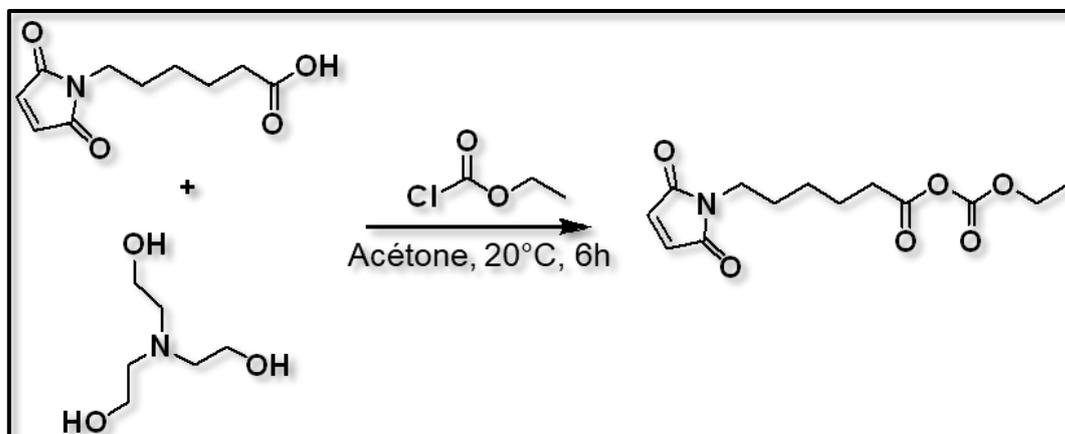


Figure 63 : Synthèse de l'éthoxy,(5-maleimido pentyl) anhydride

Une fois que la surface a subi le traitement plasma + eau (I.A, page 134), elle est plongée dans la solution réactive. La durée d'incubation a été fixée à 6 h parce que c'est la durée de disponibilité optimale des fonctions alcools en surface avant leur internalisation au vu de l'étude précédente. Les fonctions alcools en surface de l'élastomère vont estérifier l'éthoxy,(5-maleimido pentyl) anhydride ce qui va permettre d'obtenir des fonctions maléimides pendantes à la surface de l'élastomère (Figure 64).

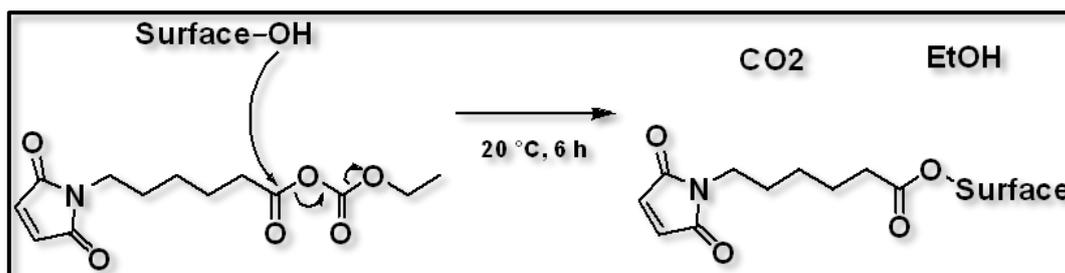


Figure 64 : Estérification entre l'éthoxy,(5-maleimido pentyl) anhydride et les fonctions alcools disponibles sur les surfaces traitées.

Suite aux 6 h d'incubation, les surfaces ont été retirées de la solution et plongées dans des bains d'acétone afin d'éliminer toutes les molécules n'ayant pas réagi, comme du chloroformiate d'éthyle et de la triéthanolamine résiduels, pour éviter que des phénomènes non-contrôlés ne se produisent en surface.

Nous pouvons noter que des variations significatives pourraient être possibles pour les surfaces PDMS. En effet, le traitement plasma peut générer des radicaux sur les méthyles mais il est aussi possible que des radicaux soient aussi formés sur le silicium ce qui, par réaction avec l'eau, génèrerait des fonctions silanols. Les fonctions silanols pourraient aussi faire une estérification avec l'éthoxy,(5-maleimido pentyl) anhydride. Ceci pourrait former des liaisons facilement hydrolysables et ne permettrait donc pas un greffage covalent stable dans le temps. Aucune référence n'a pu être trouvée dans la littérature pour appuyer ces propos mais il semble que les liaisons impliquant le silicium sont facilement hydrolysables.²¹³

Il est donc possible, mais non prouvé, que la fonctionnalisation maléimide des surfaces PDMS entraîne, pour partie, la formation de liaisons hydrolysables. Ceci pourrait provoquer ultérieurement le relargage en solution de protéines greffées en surface par hydrolyse de la liaison ester en alpha du silicium. Il reste très probable qu'une grande partie des maléimides ajoutés sur la surface le soient sur des méthyle, ce qui dans ce cas ne posera pas de problèmes d'hydrolyse dans les conditions d'utilisation des surfaces dans ce projet.²¹⁴

2. Démonstration de la fonctionnalisation des surfaces élastomères avec des fonctions maléimides

Les fonctions maléimides, bien que moins hydrophiles que des fonctions alcools, restent beaucoup plus hydrophiles que les surfaces brutes utilisées. La fonctionnalisation de la surface peut être étudiée par mesure d'angle de contact. Toutes les surfaces ont donc été analysées avec cette méthode (Figure 65). Ainsi, la Figure 65 permet de comparer la valeur de l'angle de contact sur des surfaces traitées ou non au plasma puis plongées en contact ou non avec une solution réactive de maléimide.

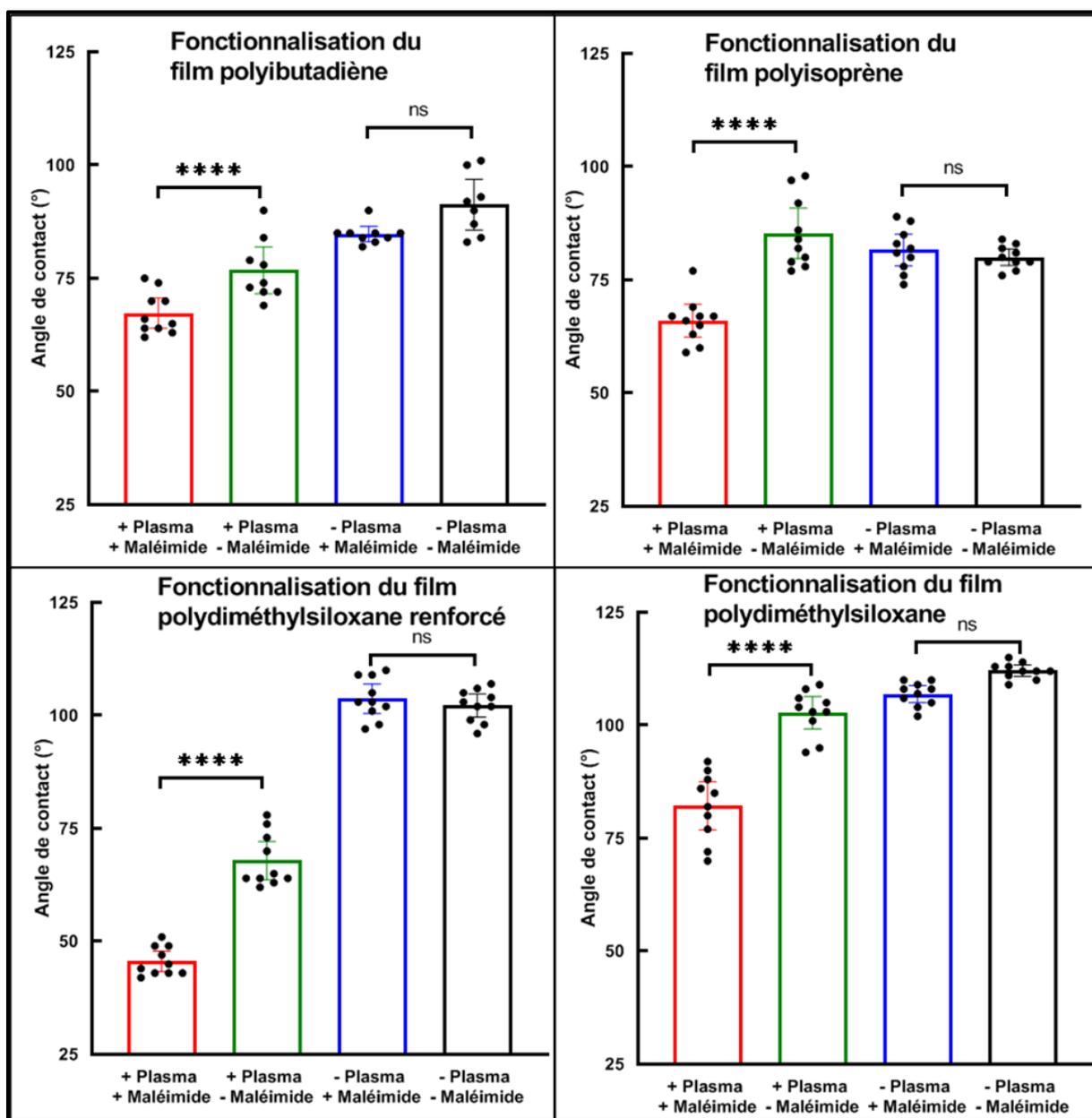


Figure 65 : Mesure d'angle de contact faites 10 minutes après le traitement pour mettre en évidence la fonctionnalisation des différentes surfaces. Tests statistique One-way ANOVA à comparaisons multiples. **** ($p < 0,0001$).

Pour chaque surface, par comparaison entre les échantillons 3 (en bleu, surfaces sans traitement plasma et avec traitement maléimide) et 4 (en noir, sans traitement plasma et sans traitement maléimide), l'incubation en présence d'éthoxy,(5-maléimido pentyl) anhydride ne modifie pas significativement la surface quand elle n'est pas précédée d'un traitement plasma.

Par comparaison des échantillons 1 (en rouge, avec traitement plasma et maléimide) et 2 (en vert, avec traitement plasma et sans traitement maléimide), l'incubation en présence

d'éthoxy,(5-maléimido pentyl) anhydride de surfaces ayant des fonctions alcools disponibles modifie significativement la surface. Il est donc probable que la réaction indiquée précédemment (Figure 64) ait bien eu lieu. Cette hypothèse sera validée plus tard pas une étude complémentaire (I.B.3.b) page 146).

Les surfaces avec fonctions alcools mais non exposées à l'éthoxy,(5-maléimido pentyl) anhydride (en vert) présentent une valeur d'angle de contact proche de l'angle de contact des surfaces brutes initiales (en noir) à la suite de l'incubation qui a duré 6 h. La plupart des fonctions alcools ont donc été internalisées dans la matrice ce qui est bien en ligne avec le résultat observé précédemment (Figure 62).

Les échantillons ayant subi la réaction complète (en rouge) présentent une valeur d'angle de contact largement diminué suite aux 6 h d'incubation. Les fonctions maléimides pendantes sont beaucoup plus grosses que les fonctions alcools initiales mais restent très probablement plus petites que la taille des mailles des différents élastomères. Il est donc probable que les fonctions maléimides greffées ralentissent l'internalisation du fait de leur taille, mais il est important de vérifier que ces fonctions restent bien disponibles en surface dans le temps. L'évolution de la valeur de l'angle de contact en fonction du temps a donc été faite sur une surface polyisoprène (Figure 66).

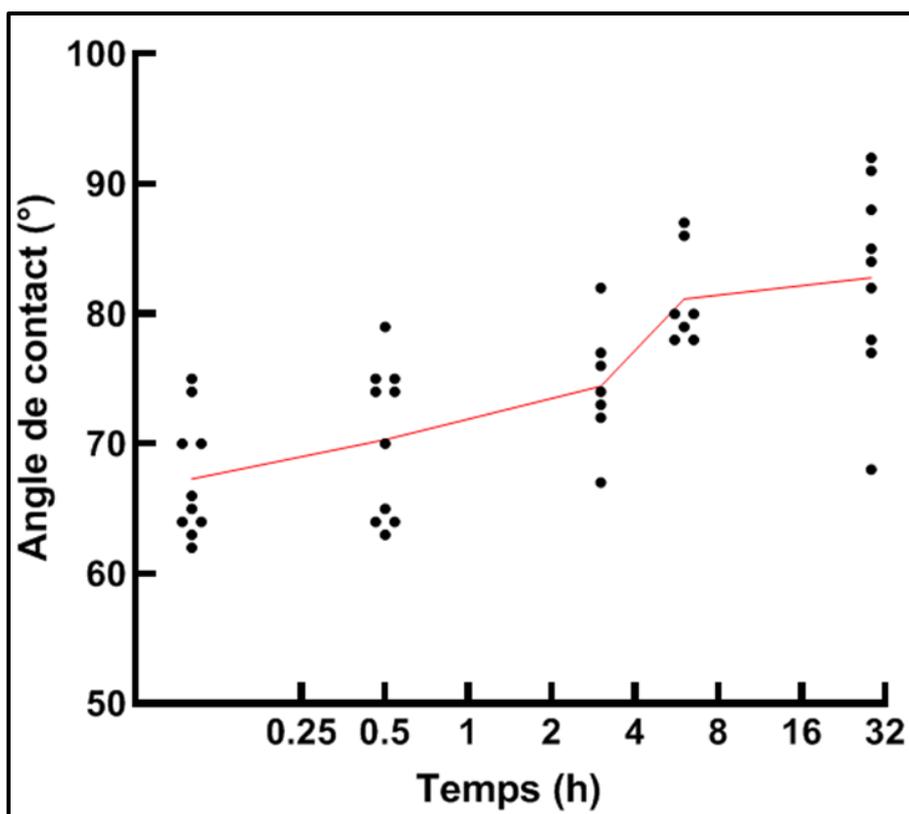


Figure 66 : Evolution de l'angle de contact en fonction du temps pour une surface polyisoprène fonctionnalisée avec des maléimides.

Dans cette expérimentation, il est observable que la valeur de l'angle de contact augmente avec le temps. La tendance est moins flagrante que ce qui avait été observé précédemment car les maléimides sont moins hydrophiles que les hydroxyles ce qui fait que l'angle de contact initial n'est pas à zéro. Il est à noter que l'échelle sur la Figure 66 n'est pas linéaire, ce qui rend la variation de la valeur d'angle de contact entre les deux dernières mesures négligeable. Il semble que la taille des maléimides n'empêche pas l'internalisation des fonctions de surface. Il est donc nécessaire d'utiliser les surfaces fonctionnalisées en moins de 6 h afin qu'un maximum de maléimides soient disponibles pour procéder au greffage des protéines en surface. De ce fait, pour la totalité des manipulations de ce projet les surfaces ont été utilisées moins de 20 minutes après leur fonctionnalisation

3. Quantification des maléimides

a) Quantification des maléimides sur l'élastomère de polybutadiène avant traitement plasma et fonctionnalisation

L'idée initiale dans ce projet était de réticuler des films polybutadiène avec les deux précurseurs PB-Mal et Fur₄T-PB. Le précurseur PB-Mal a été synthétisé avec pour objectif final un large excès, 12 maléimides pour 4 furanes, de fonctions maléimides. Le film réticulé obtenu devait donc avoir des fonctions maléimides disponibles en surface qui auraient pu être utilisées pour greffer des protéines *via* la réaction thiol-maléimide.

Afin de s'assurer de la présence des maléimides en surface, un kit commercial (Amplite™ Colorimetric Maleimide Quantitation Kit) a été utilisé pour les quantifier. Dans ce kit, les maléimides réagissent avec la cystéamine présente en excès. Un dosage secondaire des cystéamines n'ayant pas réagi avec les maléimides est réalisé à l'aide de la 4,4'-dithiodipyridine (DTDP). Par mesure en spectroscopie UV-vis, il est possible de déterminer la quantité de DTDP ayant réagi avec la cystéamine et donc de déterminer aussi la quantité de cystéamine ayant réagi avec les maléimides (Figure 67).

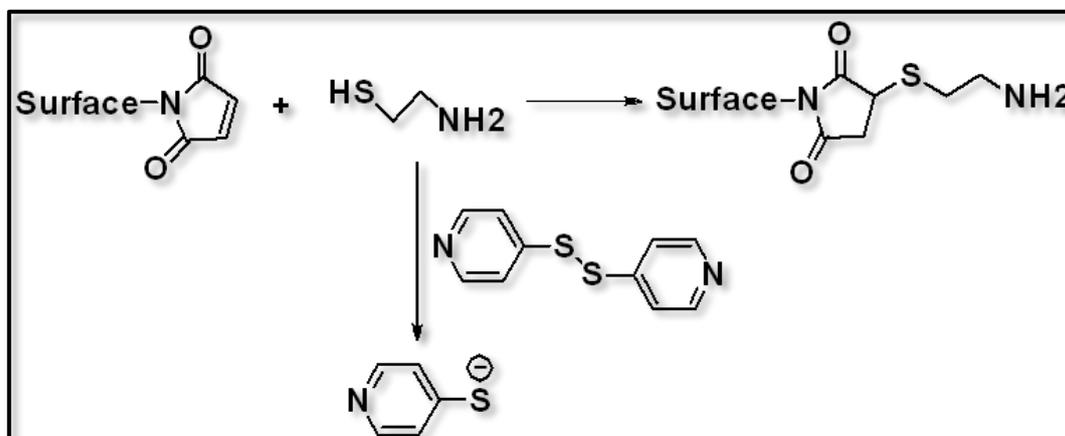


Figure 67 : Dosage secondaire des maléimides en surface à l'aide de la cystéamine et du 4,4'-dithiodipyridine.

Le kit commercial était initialement prévu pour quantifier les maléimides sur des surfaces poreuses. La surface PB n'étant pas poreuse, la quantité de maléimides accessibles était beaucoup plus faible. Le kit commercial n'était donc pas assez sensible et aucun résultat n'a pu en être tiré. Il a donc été décidé d'acheter les produits pour préparer les solutions du kit au

laboratoire en ajustant précisément les concentrations des différents réactifs le rendant beaucoup plus sensible.

Une fois le protocole mis au point, celui-ci a été utilisé pour quantifier les maléimides sur une surface PB. Dans ce but, la différence d'absorbance à 324 nm mesurée entre une solution ayant été au contact d'une surface sans maléimides et une solution ayant été au contact de la surface avec maléimides sont comparées (Figure 68).

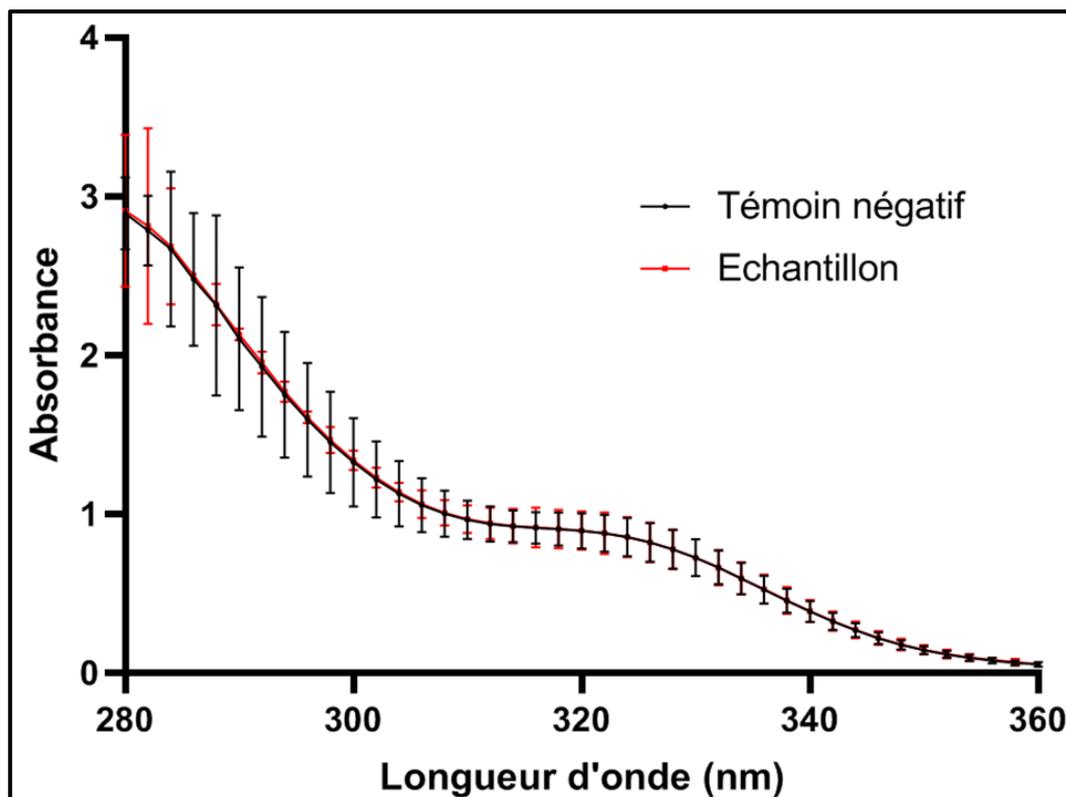


Figure 68 : Mesure d'absorbance en tripliqua d'une solution contenant de la cystéamine de et du 4,4'-dithiodipyridine mise au contact : (en noir) d'une surface PB non traitée ; (en rouge) d'une surface PB fonctionnalisée avec des maléimides. Les barres d'erreur verticales représentent l'intervalle de confiance 95 %.

Suite à cette analyse, aucun maléimide n'a pu être quantifié car aucune différence d'absorbance significative n'a pu être observée. Afin de s'assurer que la non-détection des maléimides ne provienne pas d'un problème dans la mise en œuvre de notre protocole, une estimation de la densité surfacique des maléimides suite à la réticulation du film a été faite par une approche calculatoire.

Connaissant la densité du PB (1.01 g/cm^3), il est possible de connaître le volume correspondant à 1 g d'élastomère réticulé ainsi que le nombre de chaînes polymères dans l'échantillon (la masse molaire des chaînes étant en moyenne de $10\,000 \text{ g/mol}$).

Pour 1 g de polymère, nous avons environ 1 cm^3 et 6.10^{19} chaînes polymères. Une chaîne polymère occupe donc environ $16,6 \text{ nm}^3$.

Les polymères utilisés pour réticuler le matériau sont composés de 184 unités de répétition. En associant chaque chaîne polymère à un cube de $16,6 \text{ nm}^3$, nous obtenons un volume de $9,06.10^2 \text{ nm}^3/\text{unité de répétition}$.

Nous avons pu observer, par calcul et par expérimentation, qu'après réticulation des deux précurseurs polybutadiènes utilisés pour cet échantillon (Fur₄T-PB et PB-Mal), il y a un excès de maléimides disponibles correspondant à 2,1 % des unités de répétitions totales.

En estimant que le gramme d'élastomère PB (1 cm^3) est remis en forme pour obtenir un parallélépipède rectangle de $5,77 \times 5,77 \times 0,03 \text{ cm}$, nous pouvons calculer qu'une des grandes faces a une surface de $33,3.10^{14} \text{ nm}^2$. Cette surface correspond à la présence en surface de $1,67.10^{15}$ unités monomères. Si, comme décrit plus haut, 2,1 % des unités monomères sont fonctionnalisées maléimides, nous obtenons $3,51.10^{13}$ maléimides en surface pour une densité surfacique en maléimides de 1 maléimide pour 100 nm^2 ou 17 nmol/m^2 . Cette valeur est trop faible pour être détectée par des variations d'absorbance.

En conclusion, l'excès de maléimides prévu pour le greffage de protéines sur les surfaces PB ne sera pas suffisant pour obtenir la densité surfacique voulue (I.A.2, page 151). Les surfaces PB ont donc dû être fonctionnalisées de la même manière que les surfaces commerciales.

b) Quantification des maléimides sur une surface élastomère PI après traitement plasma et fonctionnalisation

Pour la mise en place de cette expérience, les surfaces élastomères PB n'étaient plus disponibles en quantités suffisantes, il a été décidé de les préserver pour la suite des manipulations.

Le protocole décrit ci-dessus a donc été utilisé pour quantifier les maléimides sur les surfaces élastomères PI fonctionnalisées. La quantification a été faite sur une surface PI avant/après fonctionnalisation (Figure 69).

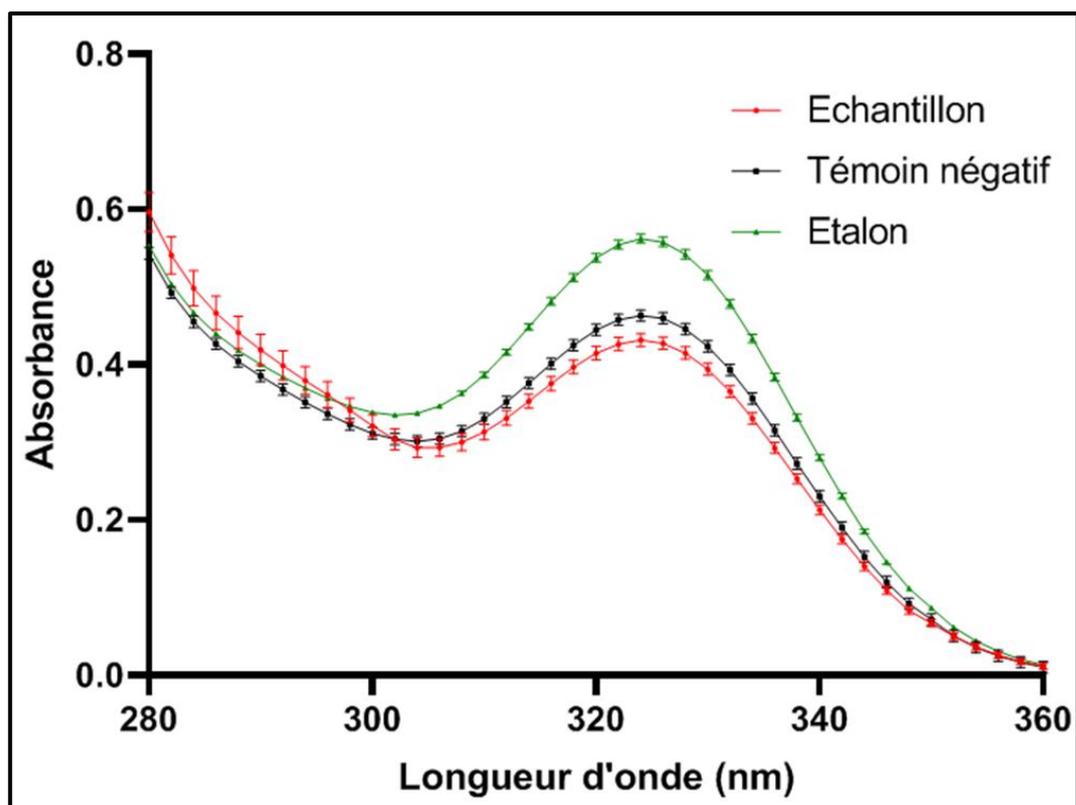


Figure 69 : Quantification des maléimides en surface par mesure des variations d'absorbance à 324 nm. Les mesures sont faites en tripliqua sur 3 solutions différentes et les intervalles de confiance à 95 % sont indiqués sur le graphique. En vert : solution étalon contenant tous les réactifs mais n'ayant été exposée à aucune surface. En noir : Solution Témoin négatif contenant tous les réactifs et ayant été exposé à une surface non-fonctionnalisée. En rouge : solution échantillon contenant tous les réactifs et ayant été exposée à une surface fonctionnalisée avec des maléimides.

Sur la Figure 69, nous observons l'évolution de la valeur d'absorbance en fonction de la longueur d'onde. Suite à cette expérimentation plusieurs points sont observables. En comparant l'absorbance de l'étalon à celles du témoin et de l'échantillon, on observe une forte diminution. Cette diminution de l'absorbance met en évidence le fait qu'une partie du DTDP est perdu ou a réagi au contact de la surface. En effet, même quand la solution contenant du DTDP n'a été en contact qu'avec la surface témoin, donc n'ayant pas de maléimides, elle perd environ 0,1 d'absorbance.

Le second point important à noter est qu'il y a une différence d'absorbance significative entre la solution mise au contact de la surface témoin et celle mise au contact de la surface fonctionnalisée. Cette différence significative entre les absorbances permet de calculer que 2,7 nmol de maléimides ont réagi avec la cystéamine. L'échantillon fonctionnalisé faisait 1 cm². La densité surfacique en maléimide obtenue est donc de 16 maléimides/nm² ou 27 μmol/m². La

densité surfacique obtenue est très élevée. En reprenant les caractérisations MEB et AFM faites plus tôt ((I.B.1.b), page 107 et I.B.2.c), page 118), il est observable que la surface du polyisoprène est rugueuse et comporte de nombreuses charges. La surface réelle analysée est donc certainement plus élevée que la surface projetée qui est, elle, de 1 cm².

La quantification des maléimides se fait à l'aide de la cystéamine (77,15 g.mol⁻¹) et donne une densité surfacique de 27 μmol/m² alors que la quantification des fonctions alcools en sortie de plasma se fait avec le DPPH (394,32 g.mol⁻¹) et donne une densité surfacique de 9 μmol/m². Il est possible que les maléimides quantifiés avec la cystéamine ne proviennent pas tous de l'extrême surface et que la cystéamine, par sa très petite taille, accède à des maléimides en proche surface ou ayant réagi dans de très petites aspérités de la surface. Il est aussi possible que la cystéamine réagisse très facilement avec toutes les fonctions maléimides disponibles, car il s'agit d'une réaction de chimie click. Ce qui n'est pas le cas du DPPH avec les fonctions alcools, qui nécessite, lui, d'être chauffé à 60 °C pendant 2 h pour compléter la réaction.

La quantification des maléimides en surface suite à la fonctionnalisation donne un résultat très élevé qui est surtout une approximation. Cette approximation permet de valider que les variations d'angles de contact mesurés plus tôt (Figure 65) sont bien dues au greffage de maléimides en surface et que ces maléimides sont en suffisamment grande quantité (supérieur à 100 nmol/m²) pour pouvoir saturer la surface en protéines avec les greffages ultérieurs.

En conclusion, il a été mis en évidence dans ce chapitre que le traitement plasma mis en place permet bien de générer des radicaux puis des fonctions alcools sur les surfaces élastomères. Du fait de la mobilité locale des chaînes polymères au sein des élastomères, les fonctions alcools peuvent être internalisées dans la matrice et ne plus être disponibles en surface. Il est donc nécessaire d'utiliser les surfaces rapidement à la suite du traitement plasma. Nous avons aussi démontré que la méthode appliquée pour générer des fonctions maléimides sur les surfaces élastomères à l'aide des fonctions alcools déjà disponibles est bien efficace et spécifique. Des méthodes de quantification des fonctions alcools et maléimides générées ont été développées à l'aide de la littérature et ont permis d'obtenir des estimations du nombre de fonctions générées en surface à chaque étape. Toutes les surfaces utilisées dans ce projet peuvent donc être fonctionnalisées dans des proportions suffisantes pour procéder au greffage des protéines sur celles-ci.

Chapitre V : Greffage

A. Greffage de protéines

L'objectif est ici de greffer une protéine de manière covalente, spécifique et orientée afin qu'elle serve de point d'ancrage au greffage ultérieur de l'enzyme à étudier. Deux systèmes ont donc été envisagés :

-Greffage de Jo_c en surface par réaction thiol-maléimide avec la surface suivi par l'assemblage covalent de l'enzyme chimérique In-NpXyn11A.

- Greffage de In_c en surface par réaction thiol-maléimide avec la surface suivi par l'assemblage covalent de l'enzyme chimérique Jo-NpXyn11A.

1. Principe

Suite à la fonctionnalisation des surfaces il devient possible d'y greffer des protéines et donc des enzymes. Dans cet objectif, la protéine Jo servant à immobiliser la xylanase présente une cystéine introduite par génie génétique du côté N-terminal de la séquence d'acides aminés. La fonction thiol présente dans la cystéine pourra donc réagir avec les maléimides en surface *via* une addition de Michael (Figure 70).

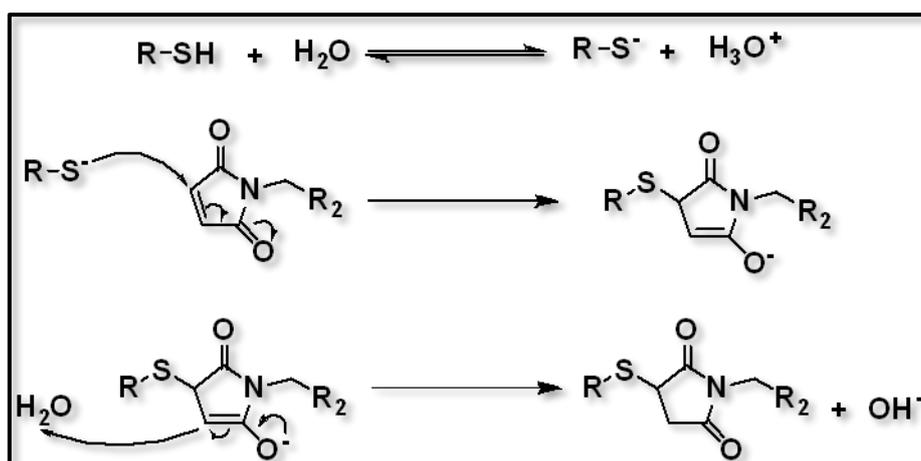


Figure 70 : Mécanisme d'addition de Michael entre un thiol et un maléimide

Cette réaction nécessite la présence d'un thiolate pour être initiée. La fonction thiol de la cystéine a un pKa d'environ 8,5 d'après Poole et al.²¹⁵ ce qui met en évidence que, bien que minoritaires, il y aura des thiolates à pH biologique. Les protéines utilisées dans notre étude

sont en solution dans un tampon phosphate à pH 7,2. A cette valeur de pH, toujours d'après Poole et al., il devrait y avoir entre 3 et 9 % de cystéines sous forme de thiolates. La Figure 71 représente l'évolution du pourcentage de fonctions thiolates en fonction du pKa du thiol associé et du pH de la solution.

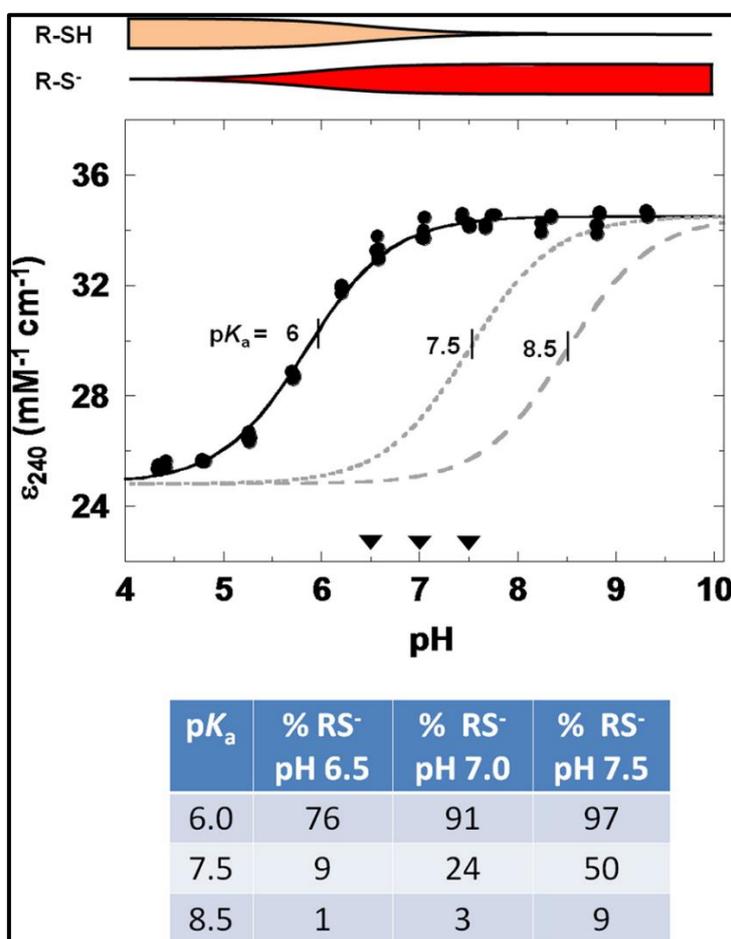


Figure 71 : Figure extraite de Poole et al.²¹⁵ permettant d'estimer le pourcentage de cystéines sous forme thiolate à pH 7,2.

L'addition de Michael entre un thiol et un maléimide est une réaction click.²¹⁶ Dans une étude de Martinez-Jothar et al.²¹⁷ il a été démontré que la réaction n'atteint qu'un rendement proche de 80 %, variable en fonction des réactifs utilisés. Ce point n'est pas problématique dans notre étude car l'objectif n'est que de saturer la surface avec des protéines et, dans ce projet, les maléimides et les protéines sont disponibles en large excès. Dans la même étude de Martinez-Jothar et al., il a été mis en évidence qu'un excès de maléimide permet d'augmenter le rendement de la réaction. Au vu des quantifications faites précédemment ((I.B.3.b), page 146), nous sommes bien en excès de maléimides au moment du greffage des protéines. Le dernier point mis en évidence dans l'étude Martinez-Jothar et al., entre autres,^{216,218} est que la réaction

atteint son rendement maximum en moins de 2 h à 20 °C. Dans la réaction thiol-maléimide envisagée dans notre projet, il s'agit de greffer de gros objets hydrophiles, des protéines, sur des surfaces relativement hydrophobes (angle de contact aux alentours de 60°) *via* un point d'ancrage unique. Ces deux points risquent de fortement diminuer la cinétique de la réaction. Les protéines étant stables à 20 °C et à pH 7,2, il a été décidé de prolonger fortement la durée de réaction afin de maximiser la couverture de la surface avec les protéines.

C'est pour répondre à tous ces points que le greffage des protéines en surface a été réalisé à 20 °C, pH 7,2 sur la nuit avec un large excès de protéines par rapport à ce qui peut être immobilisé en surface. Une étude de Zhang et al.²¹⁹ a mis en évidence que la liaison thiol-maléimide est réversible par deux mécanismes. Une réaction de rétro-Michael peut avoir lieu à un pH 9,5 ce qui entraîne la rupture de la liaison et au retour des deux liaisons indépendantes, thiol et maléimide. Un second mécanisme peut consister au remplacement du thiol par un autre disponible en solution. Ces phénomènes de réversibilité de la réaction de Michael entre thiol et maléimide ne devraient pas être rencontrés dans notre projet. En effet, à la suite du greffage des protéines Jo_c en surface, les échantillons ne seront plus exposés à des thiols en solution ce qui permet d'éviter tout phénomène d'échange de thiol. De plus, la surface n'est exposée à un pH 9 que pendant 30 s (III-, page 84) à la suite du greffage. La cinétique de la réaction retro-Michael étant inférieure à celle de la réaction Michael d'un facteur de 10 environ,¹²² il est très peu probable que les quelques secondes d'exposition de la surface à un pH 9 aient un impact significatif sur les adduits thiol-maléimide en place. Dans le cas où cette réaction retro-Michael serait toujours possible, une étude de Fontaine et al.¹²⁴ propose d'hydrolyser la fonction thio succinimide pour obtenir un thioester acide de succinimide qui ne peut pas donner lieu à la réaction de retro-Michael. Cette méthode n'a pas été mise en place dans le cadre de notre étude mais pourrait faire l'objet de développements dans le cas où la retro-Michael serait observée. De plus, en reprenant les données de Fontaine et al., il est possible que l'hydrolyse de liaison thio succinimide se fasse naturellement et en moins de 24 h dans les conditions où les surfaces sont stockées.

2. Détection du greffage

Afin de valider le greffage des protéines Jo_c en surface, il est nécessaire de trouver une méthode de caractérisation adaptée.

a) Microscopie à épifluorescence

La première voie envisagée a été de greffer des protéines Jo avec cystéine en bout de chaîne (Jo_c) puis de procéder à l'assemblage de la protéine chimérique In-*DsRed* ou In-sfGFP, toutes deux produites au TBI ((I.A.3.b), page 78). Il est à noter que la sfGFP est un mutant de la GFP provenant de l'étude de Bonnet et al.¹⁶⁹

La protéine *DsRed* est fluorescente avec une longueur d'onde d'excitation à 558 nm et une longueur d'onde d'émission à 583 nm.²²⁰ La protéine GFP est fluorescente et présente une longueur d'onde d'excitation à 395 nm et une longueur d'onde d'émission à 509 nm.²²¹ L'objectif était donc ici de faire une détection secondaire des protéines Jo_c en surface par mesure de la fluorescence de In-*DsRed* ou In-GFP. Les premières expériences ont été faites avec In-GFP et aucun résultat n'a pu en être extrait car toutes les images étaient saturées en fluorescence, même sur les surfaces n'ayant pas été exposées à la protéine fluorescente. Ce résultat est évident a posteriori car comme indiqué plus haut ((I.B.2.e), page 120) les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la GFP sont comprises dans la zone d'auto-fluorescence de la surface PB.

Il a donc été décidé d'effectuer la détection secondaire avec la protéine In-*DsRed*. Afin de s'assurer que la protéine serait bien détectable, une manipulation préalable a consisté à faire sécher une goutte de In-*DsRed* sur une surface PB puis à imager le résultat à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Figure 72).

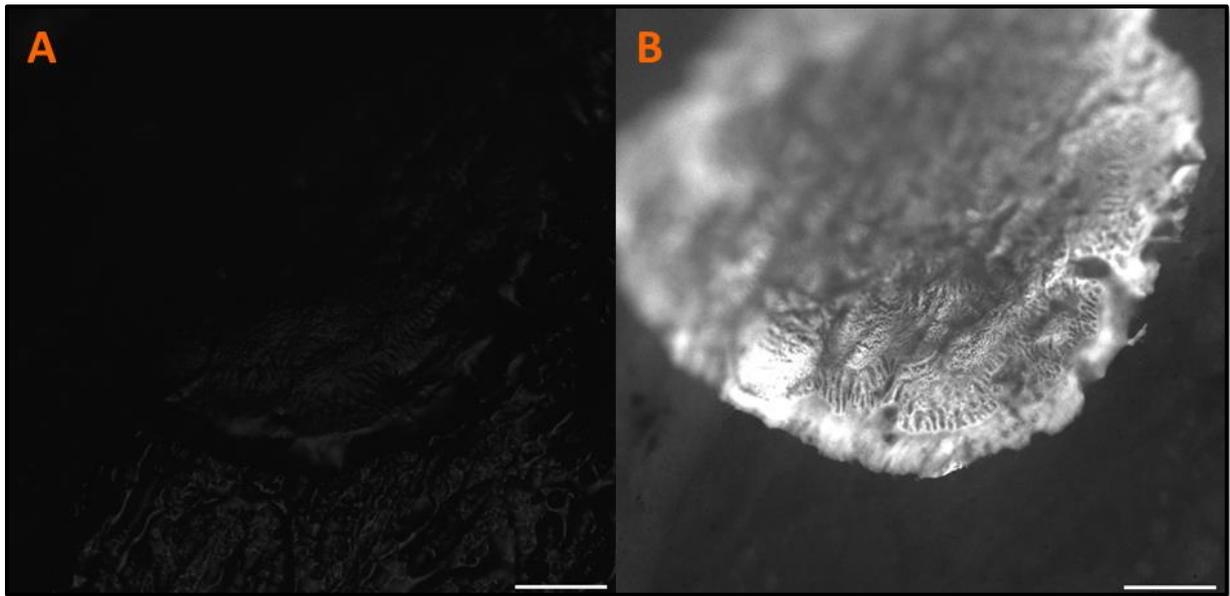


Figure 72 : Images d'une goutte de 3 μL de InDsRed séchée sur une surface PB. L'échelle en bas à droite représente 400 μm . A : Surface excitée et observée à la longueur d'onde d'émission de DsRed. B : Surface excitée à la longueur d'onde d'excitation de DsRed et observée à sa longueur d'onde d'émission.

La fluorescence des protéines In-DsRed est clairement observable sur la surface. En faisant la supposition que le greffage des protéines Jo_c indiqué plus haut (III-, page 84) a bien fonctionné, les protéines In-DsRed ont été assemblées avec les protéines Jo_c greffées par incubation à 20 °C pendant 6 h. Les surfaces ont été imagées en épifluorescence et cette fois aucune fluorescence n'a pu être observée. La manipulation a été répétée de nombreuses fois en modifiant les durées d'incubation et les concentrations mais jamais aucune fluorescence n'a été observée.

Il est probable que l'absence de signal détecté soit du fait des limites de détection du microscope à épifluorescence au regard du peu de protéine In-DsRed immobilisée. Dans le cadre de cette thèse, le résultat analysé est une surface sur laquelle, dans le meilleur des cas, une monocouche de protéines fluorescentes est greffée. Il est possible que cette monocouche de protéines fluorescentes ne représente pas une quantité suffisante pour être détectée. Après calcul, et sur la base des travaux de Montanier et al.,⁷ nous pouvons estimer que la densité de greffage maximale des protéines fluorescentes est proche de 24 nmol/m². Les trois protéines In-NpXyn11A, In-DsRed et In-sfGFP ont des masses molaires très similaires avec respectivement 41 544, 45 228 et 45 374 g.mol⁻¹. Il est donc très probable que les dimensions des différentes protéines, dans le cas où elles seraient associées à des sphères, soient très similaires. Dans l'étude de Montanier et al., la densité surfacique théorique et expérimentale maximale de In-

NpXyn11A est de 24 nmol/m². Il est donc très probable que la densité surfacique maximale pour les protéines fluorescentes étudiées ici soit très proche de ce résultat.

Il est intéressant de se pencher sur la littérature dans un second temps afin de vérifier que nous ne sommes pas en dessous des limites de détection du microscope à épifluorescence. La littérature sur la GFP étant beaucoup plus fournie que celle de la *DsRed*, il est possible de collecter des informations sur la première et de les extrapoler à la seconde. Les protéines ont une luminosité, « brightness », qui leur est propre. La luminosité est le produit du coefficient d'extinction molaire et du rendement quantique. D'après les données de l'Université de Boston (<https://www.bu.edu/flow-cytometry/resources/>), la GFP a une luminosité de 33 000 M⁻¹.cm⁻¹ alors que la *DsRed* a une luminosité de 59 250 M⁻¹.cm⁻¹ soit 80 % de plus.

Dans une étude de Sathish et al.,²²² une surface de polyméthyl méthacrylate a subi un traitement avec plasma argon suivi d'une fonctionnalisation N-hydroxysuccinimide (NHS) puis le greffage de GFP en surface avant d'être imagée en fluorescence. Suite à cette étude, il a été mis en évidence que la surface uniquement traitée plasma, donc très hydrophile, réduisait l'adsorption de la GFP en comparaison de la surface brute qui avait, elle, une valeur d'angle de contact de 65°. Les protéines s'adsorbent donc mieux sur des surfaces hydrophobes. Dans notre cas, la surface est théoriquement saturée en protéines J_{oc} a donc un angle de contact aux alentours de 50°, ce qui correspond à une surface hydrophile. Dans le cas où les protéines GFP ont été greffées sur les fonctions NHS,²²² la densité surfacique de GFP était de 450 nmol/m² donc très largement supérieure à la saturation de surface. Dans le cas où la GFP était simplement adsorbée sur la surface traitée plasma, donc hydrophile, la densité surfacique est directement passée sous la limite de détection en fluorescence.

N'ayant pas trouvé de références indiquant clairement les limites de détection d'une protéine immobilisée sur une surface en monocouche, nous ne pouvons qu'extrapoler les informations accumulées ci-dessus pour émettre des hypothèses.

Au vu de sa brillance, la *DsRed* a une limite de détection, en mol.L⁻¹, plus faible que la GFP. Dans l'étude de Sathish et al., une densité surfacique en GFP de 450 nmol/m² a pu être observée mais, dès que la densité surfacique a diminué, le signal est passé sous la limite de détection. En faisant l'hypothèse que le signal qu'ils ont observé était deux fois supérieur à leur limite de détection, et en faisant une seconde hypothèse raisonnable que la limite de détection de *DsRed* serait deux fois inférieure à celle de GFP, ils auraient pu détecter une densité surfacique de

112,5 nmol/m². Cette densité limite reste 4,7 fois supérieure à la densité maximale que nous estimons pouvoir obtenir dans le cadre de ce projet.

Il est donc possible de faire l'hypothèse, sans preuves, que la détection secondaire du greffage de Jo_c sur la surface par mesure de l'assemblage avec In-DsRed n'a pas pu être faite du fait d'une densité surfacique des protéines fluorescentes en dessous de la limite de détection.

b) Quantification des protéines dans le surnageant

Une autre méthode pour quantifier les protéines Jo_c greffées en surface consiste à quantifier la différence de protéines présentes dans le surnageant avant et après incubation en présence de la surface à greffer.

Encore une fois, en s'appuyant sur les travaux de Montanier et al.,⁷ nous pouvons estimer que la densité de greffage maximale de Jo_c en surface est de 90 nmol/m².

En utilisant une surface de 4 cm², un volume de 1,7 mL de surnageant est suffisant pour pouvoir immerger la totalité de la surface dans un tube de 2 mL. En admettant que la surface soit saturée en protéines Jo_c à la suite du greffage, 3,6.10⁻² nmol de protéines auront été greffées. Ce greffage maximal correspond à une variation de concentration en protéines dans le tube de 21,2 nM. Il faudrait donc une méthode de quantification des protéines en solution capable de détecter des variations de concentration de 21,2 nM. A titre indicatif, le test de Bradford a une limite de détection de 0,006 mg/mL²²³ soit, dans notre cas, 566 nM ce qui est 26 fois supérieur à l'objectif.

Il n'a donc pas été possible de mettre en évidence le greffage des protéines Jo_c par des méthodes de quantification de protéines libres en solution.

c) Mesure de la valeur de l'angle de contact

A défaut de pouvoir mettre en évidence le greffage des protéines par des méthodes quantitatives, il a été décidé de s'orienter vers une méthode qualitative.

Comme observé plus haut (I.B.2, page 140), l'angle de contact des surfaces à la suite de la fonctionnalisation avec des maléimides varie entre 45° pour le PDMSr et 80° pour le PDMS. Comme vu dans ce même chapitre, l'angle de contact des surfaces fonctionnalisées avec maléimides tend à revenir proche de l'angle de contact des surfaces brutes après 6 h.

Pour le greffage des protéines Jo_c, l'incubation se fait sur la nuit, donc environ 16 h. Dans le cas où le greffage des protéines en surface ne serait pas valide, on peut supposer que la valeur

de l'angle de contact observé sur les différentes surfaces serait élevée du fait de l'internalisation des fonctions maléimides. Dans le cas où le greffage serait valide, l'angle de contact serait faible car les protéines sont très hydrophiles et vraisemblablement moins susceptibles d'être internalisées dans la matrice polymère du fait de leur taille importante.

Le protocole de greffage des protéines Jo_c sur les surfaces PB, PI et PDMS a donc été mis en place avant de mesurer les variations d'angle de contact dans chacun des échantillons (Figure 73). La surface PDMSr ayant été beaucoup moins utilisée que les autres, il y a eu moins de données dessus. La preuve du greffage de Jo_c sur la surface PDMSr n'est donc pas disponible ici. Les témoins négatifs utilisés sont des surfaces sans maléimides exposées à Jo_c ou à Jo_w (donc sans cystéine), et des surfaces fonctionnalisées avec des maléimides mais exposées à Jo_w .

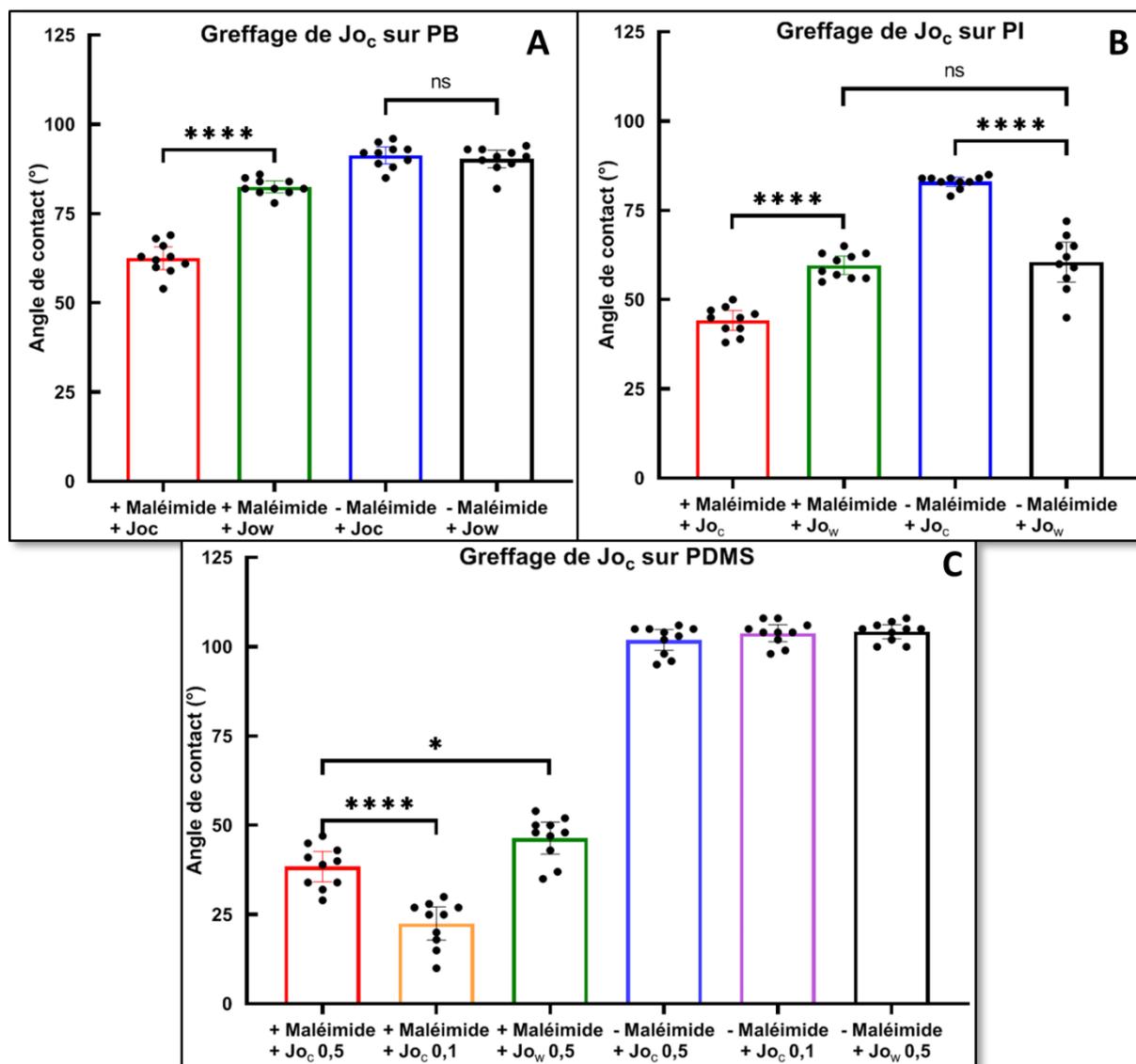


Figure 73 : Mesure d'angle de contact après greffage de la protéine Jo_c sur les surfaces A (PB) ; B (PI) ; C (PDMS). Dans la figure C, les chiffres 0,5 et 0,1 représentent les concentrations en protéines dans le surnageant (en mg.mL⁻¹). Significativité des résultats mise en évidence avec un test One-way ANOVA à comparaisons multiples. **** ($p < 0,0001$) ; * ($p < 0,05$).

(1) Surface polybutadiène

Les résultats les plus probants ont été obtenus pour la surface PB. On observe pour cet échantillon que les surfaces n'ayant pas été fonctionnalisées (en bleu et noir) ont un angle de contact très proche de 90°. L'angle de contact de la surface brute étant de 98° ((I.B.2.d), page 120), ce résultat est bien en ligne avec ce qui était anticipé, à savoir qu'en l'absence de protéines greffées, l'angle de contact obtenu est censé être proche de celui d'une surface brute. Pour la surface fonctionnalisée avec maléimides mais exposée à des protéines Jo_w (sans cystéine), l'angle de contact obtenu est proche de 85° ce qui est encore une fois en ligne avec

les anticipations en l'absence de greffage. L'abaissement de l'angle de contact peut être expliqué par la simple adsorption de protéine. Pour la surface fonctionnalisée maléimides et exposée à J_{oc} , l'angle de contact est proche de 60° . C'est donc une baisse significative (-30°) en comparaison aux autres surfaces ce qui met en évidence qu'il y a bien eu une modification de la surface. L'angle de contact de cet échantillon, bien que fortement diminué comparé aux autres, paraît tout de même élevé en comparaison de ce qui est observée sur les surfaces élastomères de PI et PDMS. Une explication pourrait être apportée par une étude de Kasakova et al.¹³⁷ qui montre que la BSA immobilisée sur différentes surfaces entraîne des modifications d'angle de contact différentes. L'immobilisation sur un polyéthylène haute densité donne un angle de contact de 30° alors que l'immobilisation sur un polyacide lactique lévogyre donne un angle de contact de presque 50° .

L'angle de contact observé pour l'échantillon PB avec greffage de J_{oc} est significativement différent des autres, et bien que sa valeur reste élevée, il est hautement probable que cette modification soit due au greffage des protéines en surface.

(2) *Surface polyisoprène*

Pour la surface PI les conclusions sont les mêmes que pour la surface PB à l'exception du témoin négatif non fonctionnalisé avec maléimides et exposé à J_{ow} (en noir). Pour cette dernière surface l'angle de contact est de 60° alors qu'il était anticipé qu'il soit, comme l'autre témoin négatif sans maléimides (en bleu), proche de 85° .

Comme observé en MEB ((I.B.2.b), page 110), la surface PI a une forte concentration surfacique en charges minérales qui pourraient correspondre entre autres à du talc ($Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$), du carbonate de calcium ($CaCO_3$) ou encore du carbonate de magnésium ($MgCO_3$). Une étude de Battu et al.²²⁴ met en évidence que l'immobilisation de lipoxygénases sur le talc est très efficace et peut même être utilisée comme méthode de purification. Cette immobilisation des enzymes sur le talc a été très efficace car il a été possible d'utiliser le talc avec protéines immobilisées à plusieurs reprises pour faire des tests enzymatiques. L'immobilisation d'enzymes sur le talc à différents pH a aussi été mise en évidence par Aoun et al.²²⁵ en précisant que certains talcs favorisent plus l'immobilisation que d'autres. Une étude plus complète de Arseguel et al.²²⁶ met en évidence que l'adsorption des protéines sur le talc est protéine- et talc-dépendant. Plus l'écart entre l'hydrophilicité des protéines et l'hydrophobicité du talc est important, plus l'immobilisation sera importante grâce à la formation d'interactions ioniques à la surface.

Un phénomène a pu être observé mais non imagé sur les surfaces PI lors d'une caractérisation par AFM sur surface sèche. La surface PI est électrostatique, ce qui fait que la pointe AFM avait tendance à se coller sur la surface rendant l'analyse impossible, d'où la transition vers une caractérisation en milieu liquide. Une étude de Zhou et al.²²⁷ met en évidence que l'immunoglobuline de lapin s'immobilise de façon orientée sur une surface électrostatique. Il est donc probable que les charges électrostatiques aient un effet sur la qualité de l'immobilisation du fait de l'orientation des protéines en surface.

La présence du talc et des charges électrostatiques sur la surface peut donc avoir un impact fort sur l'immobilisation non covalente des protéines en surface. Il est probable que l'écart d'angle de contact mesuré par rapport à ce qui était anticipé soit dû à des phénomènes non contrôlés en surface du fait de ces deux facteurs. Il est probable qu'une partie non négligeable de protéines aient été immobilisée en surface de façon non spécifique mais forte et que les lavages n'aient pas suffi à éliminer ces protéines de la surface.

L'angle de contact de la surface sans maléimides et exposée à Jo_c (en bleu) est lui au niveau attendu. Une étude de Lewis et al.²²⁸ a mis en évidence qu'il est possible d'orienter des peptides en solution à l'aide d'un champ électrique avant de les immobiliser sur une surface. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le remplacement du tryptophane dans Jo_w pour une cystéine dans Jo_c peut modifier l'orientation des protéines immobilisées en surface du fait des charges électrostatiques sur la surface élastomère. Cette différence d'orientation pourrait modifier la force de l'immobilisation des protéines en surface et donc notre capacité à laver ou non les protéines adsorbées sur la surface.

d) Surface PDMS

Encore une fois, les conclusions pour la surface PDMS sont les mêmes que pour la surface PB à un détail près. Un paramètre supplémentaire a été ajouté. Il y a donc une surface fonctionnalisée avec maléimides exposée à Jo_c à une concentration de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ (en orange) et son témoin négatif, qui n'a pas de fonctions maléimides (en violet). Pour l'échantillon en orange, on observe que l'angle de contact est plus faible que pour la surface qui a été exposée à Jo_c à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ (en rouge). Cet échantillon a été préparé après avoir réalisé que les quantités de Jo_c utilisées dans le protocole standard (III-, page 84) représentaient un excès énorme (2 227 équivalents en reprenant les hypothèses faites plus haut ((I.A.2.b), page 155) en comparaison de ce qu'il est nécessaire d'utiliser pour saturer la surface en protéines. Plusieurs indices, explicités plus loin dans ce document, ont montré la possibilité qu'une multicouche de protéines

se forme en surface, il donc a été décidé de faire un essai avec cinq fois moins de protéines, soit 445 équivalents, ce qui reste très élevé.

Une étude de Bronze-Uhle et al.²²⁹ met en évidence que les angles de contact de surfaces après adsorption ou greffage de BSA sont différents. La méthode d'immobilisation des protéines a donc un impact sur l'angle de contact observé au final. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que l'utilisation de concentrations cinq fois plus faibles de Jo_c pour le greffage modifie la nature de l'immobilisation, en diminuant fortement l'adsorption, ce qui a un impact sur l'angle de contact observé.

Globalement, parmi les différentes techniques évaluées pour mettre en évidence le greffage de la protéine Jo, seule la mesure des angles de contact a conduit à des résultats satisfaisants. Pour les surfaces PB, PI et PDMS l'angle de contact a diminué par le protocole proposé pour le greffage, en comparaison avec les témoins négatifs où seule l'adsorption est possible. La quantification du greffage n'a en revanche pas pu être réalisée à ce stade. Il est à noter qu'une fois que les protéines sont immobilisées sur la surface, l'angle de contact ne change plus avec le temps.

3. Greffage de In

La même méthode de caractérisation que pour le greffage de Jo_c a été appliquée à la différence que la manipulation n'a été faite que sur la surface PB (Figure 74).

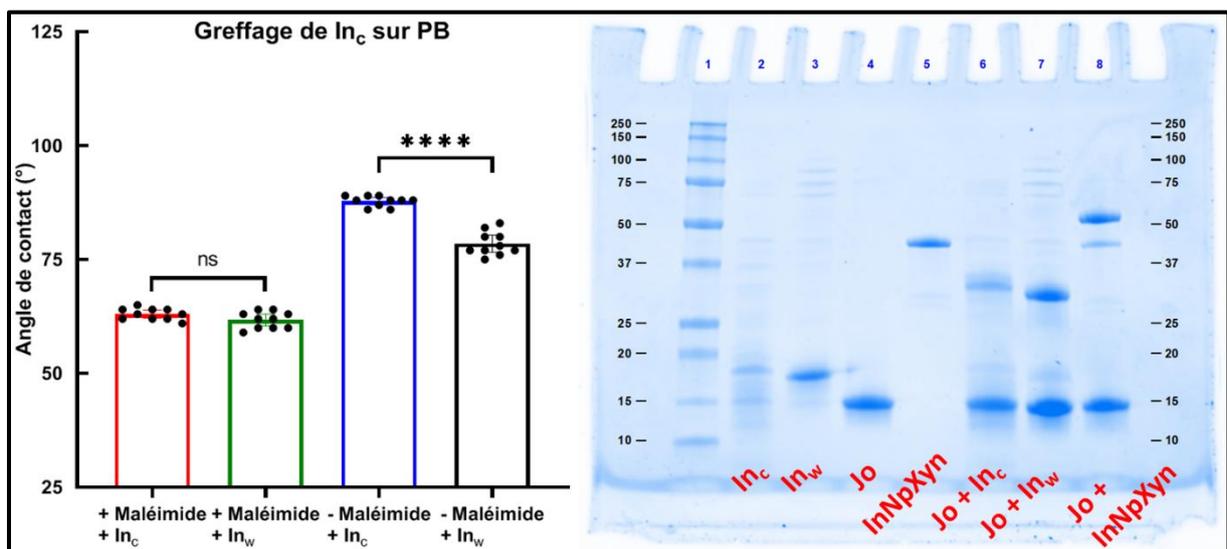


Figure 74 : A gauche : Mesure d'angle de contact après greffage de la protéine In_c sur la surfaces PB. Les protéines ont été utilisées avec une concentration de 0,5 g/mL dans le surnageant. A droite : gel d'électrophorèse SDS-PAGE des différentes protéines utilisées.

Lors de cette expérimentation, les mesures d'angle de contact ont montré une diminution de plus de 20° après fonctionnalisation par les maléimides, que ce soit avec In_c ou In_w. Toutefois, on observe sur la partie B de la figure que l'échantillon de protéines In_c est protéolysé. Les résultats de greffage et de mesure des angles de contact ne peuvent donc pas être discutés d'une façon claire.

L'immobilisation de Jo_c sur les surfaces ayant été validée, l'immobilisation de In_c n'a pas été plus approfondie. En effet, cela nécessitait la génération d'un nouveau lot de In_c. Il a été décidé d'utiliser le temps disponible pour progresser dans le développement du projet plutôt que de multiplier les options de greffage. Reproduire cette expérience en utilisant une protéine In_c non protéolysée et en testant différentes concentrations et durées permettrait probablement d'effectuer le greffage de cette protéine de façon spécifique.

B. Greffage de l'enzyme chimérique In-NpXyn11A

Le greffage de Jo_c sur la surface par réaction thiol-maléimide n'a été mis en évidence que de manière qualitative. Mais il sera possible de consolider ce résultat en mettant en évidence le greffage de In-NpXyn11A par assemblage Jo/In sur la surface (Figure 75). Les méthodes de caractérisation classiques (fluorescence, quantification en solution) rencontrent les mêmes problématiques que pour le greffage de Jo_c. Toutefois, il est possible de mettre à profit l'activité enzymatique de la xylanase pour la quantifier, en utilisant une caractéristique facilement mesurable, son activité spécifique.

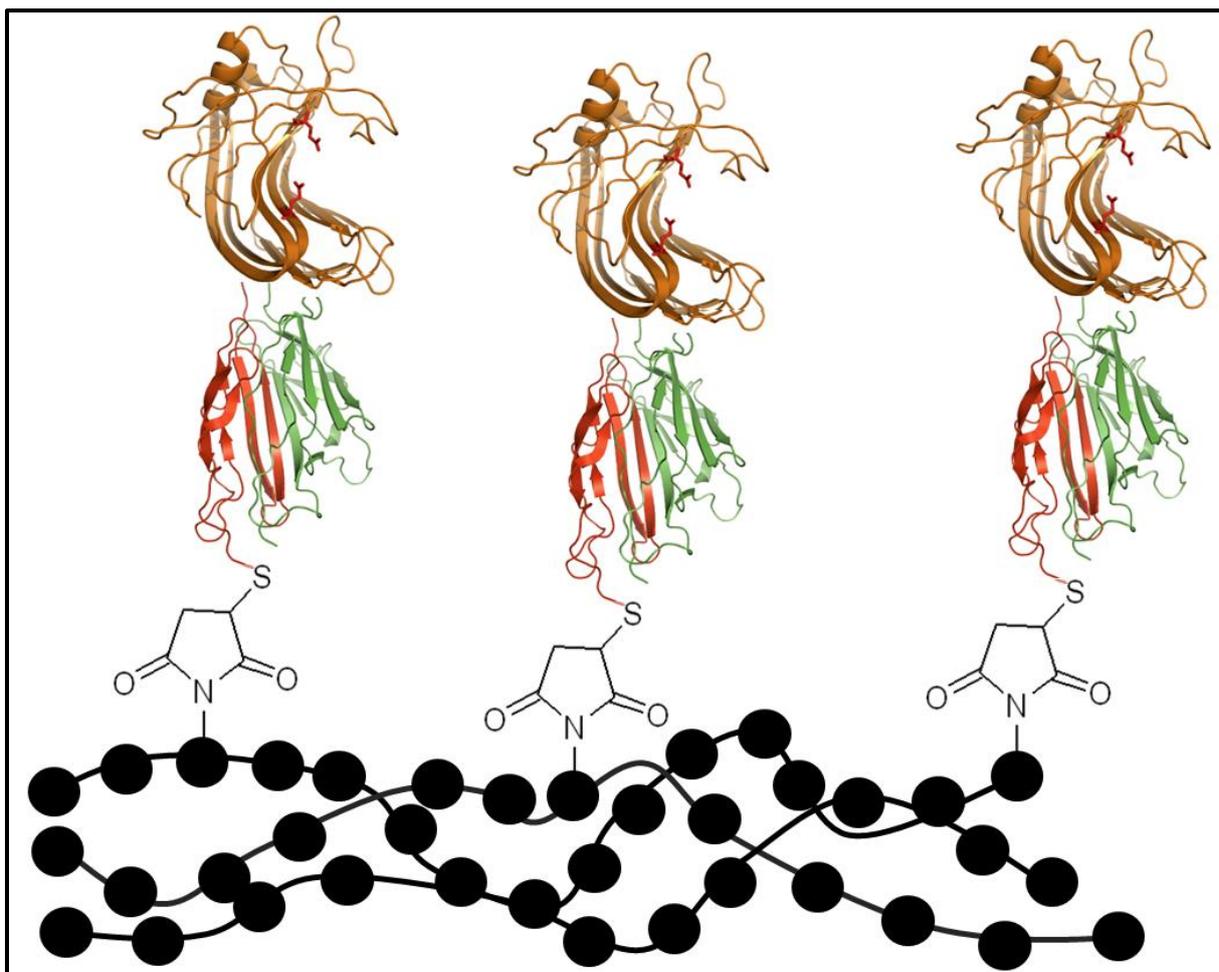


Figure 75 : Schéma d'une surface élastomère fonctionnalisée avec maléimides et avec assemblage de Jo (en rouge) et InNpXyn11A (en vert puis orange).

Comme vu plus tôt ((I.C.1.a), page 125), l'association Jo/In en solution est maximale au bout d'une heure. Il a aussi été démontré que cette association a la même cinétique que l'assemblage Jo/In-NpXyn11A. Il est par contre important de noter que l'assemblage dans le cas présent doit se faire à l'interface solide/liquide ce qui peut impacter la cinétique. En conséquence, les enzymes chimériques sont incubées en présence des surfaces greffées avec Jo_c pendant 6 h. Cette durée permet de compléter la manipulation en une journée de travail tout en palliant les potentiels problèmes associés à la cinétique d'assemblage.

1. Caractérisation du greffage de In-NpXyn11A en surface par Spectroscopie de Photoélectrons induits par Rayons X (XPS)

Suite au greffage de In-NpXyn11A par association covalente avec Jo_c en surface, la surface PB a été analysée dans un premier temps par Spectroscopie photoélectronique X (XPS) en collaboration avec la plateforme XPS du laboratoire IS2M à Mulhouse (Tableau 21, Figure 76).

Identifiant échantillon	Composition de l'échantillon
PB-M	Surface PB fonctionnalisée avec maléimides
PB-M-P	PB-M incubé en présence de Jo _c
PB-M-P-E	PB-M incubé en présence de Jo _c puis de InNpXyn11A

Tableau 21 : Indications sur les différents échantillons caractérisés par XPS.

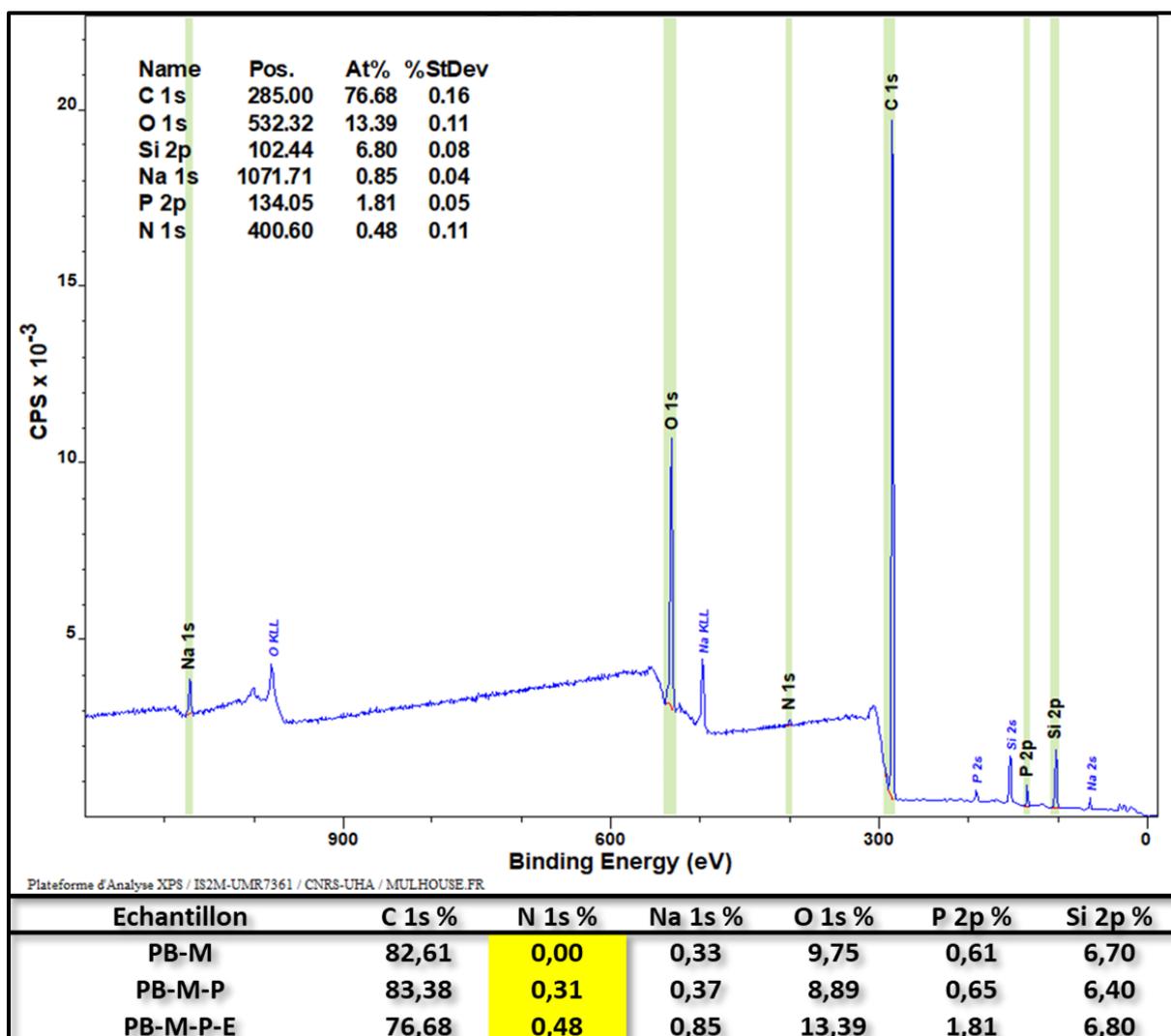


Figure 76 : Résultats de l'analyse XPS de la surface PB après assemblage de l'enzyme *InNpXynIIA* sur Jo. En haut : scan large de la surface PB-M-P-E. En bas : Tableau indiquant la présence de chaque atome en pourcentage sur les différentes surfaces.

Les photoélectrons émis par la surface sont captés. Leur énergie est spécifique de l'élément duquel ils sont émis. Ceci permet d'obtenir le spectre de la Figure 76. L'intensité des pics associés à chaque élément permet déterminer dans quelles proportions ils sont présents en surface. Il est à noter que la marge d'erreur sur la quantification est de $\pm 0,1$ %.

Au vu des écarts d'intégration des pics, un seul des trois spectres a été affiché car ils sont tous extrêmement similaires. Le tableau sous le spectre indique la composition atomique de chacune des surfaces.

L'augmentation de la présence du sodium et du phosphate au fur et à mesure des étapes de greffage est due à l'utilisation de tampon phosphate dans les surnageants contenant les protéines

et enzymes. Il est donc très probable qu'une partie des sels contenus dans ces tampons se soient déposés sur la surface ou soient restés dans le très proche environnement des protéines greffées, ce qui les rend observables par XPS.

L'augmentation de la proportion en silicium en surface semble anormale car faible. Le silicium observé sur la surface PB-M peut provenir des étapes de synthèse des différents précurseurs ((I.A.1.b), page 68) et notamment de la filtration des polymères sur Célite 454® pendant les étapes de purification. Nous observons que la proportion en silicium diminue (- 0,3 %) après le greffage de Jo_c puis réaugmente (+ 0,4 %) après le greffage de InNpXyn11A alors qu'il serait attendu que cette proportion diminue au fil des greffages. Il est à noter qu'aucun étirement n'a été appliqué sur la surface et qu'aucun des tampons ou des protéines utilisés ne contenaient de silicium. Il est donc possible que la surface utilisée pour ces différentes manipulations n'ait pas été totalement homogène et que les proportions de départ en silicium aient été différentes, ce qui viendrait expliquer ces variations qui semblent incohérentes. Au vu de la marge d'erreur de $\pm 0,1$ %, il est impossible de tirer des conclusions de variations aussi faibles

L'augmentation de la proportion en azote (+ 0,48 %) corrobore bien l'hypothèse de l'immobilisation de protéines en surface. Cependant, en reprenant des résultats observés dans la littérature,^{63,137,148} après immobilisation de protéines en surface, la proportion d'azote se trouve généralement entre 4 et 15 %.

En conclusion, bien que les résultats observés en XPS semblent aller dans le sens attendu, les variations enregistrées ne sont pas suffisamment significatives pour avoir des certitudes quant au greffage des protéines et enzymes en surface. Il faudra donc coupler les résultats obtenus par XPS avec d'autres méthodes pour avoir plus de certitudes.

2. Caractérisation du greffage de In-NpXyn11A en surface par Microscopie à Force Atomique (AFM) en mode spectroscopie de force

Toute la caractérisation du greffage de In-NpXyn11A en surface par AFM a été faite en collaboration avec la Dr Cécile Formosa, chercheuse CNRS au TBI.

L'AFM peut être utilisée en mode contact, tapping ((I.C.4.a), page 47) ou en mode spectroscopie de force. Dans notre cas, les deux modes contact et spectroscopie de force ont été utilisés. En mode spectroscopie de force, la pointe effectue un mouvement vertical descendant et entre au contact de l'échantillon, appuie jusqu'à atteindre la force consigne, puis se retire de l'échantillon. Ce mode est intéressant car il permet d'obtenir des courbes de force en fonction

de la distance de séparation entre la pointe et l'échantillon, dont différentes informations peuvent être extraites, notamment des informations sur les possibles interactions entre la pointe et l'échantillon.²³⁰

Afin d'être homogène avec la caractérisation XPS, c'est une surface PB qui a été analysée (Tableau 22, Figure 77). Il est important de noter que le second échantillon, « PB-M-E », est différent du second échantillon analysé en XPS, « PB-M-P ».

Identifiant échantillon	Composition de l'échantillon
PB-M	Surface PB fonctionnalisée avec maléimides
PB-M-E	PB-M incubé en présence de InNpXyn11A
PB-M-P-E	PB-M incubé en présence de Jo _c puis de InNpXyn11A

Tableau 22 : Indications sur les différents échantillons caractérisés par AFM

Les différentes surfaces ont dans un premier temps été caractérisées par AFM en mode contact (Figure 77).

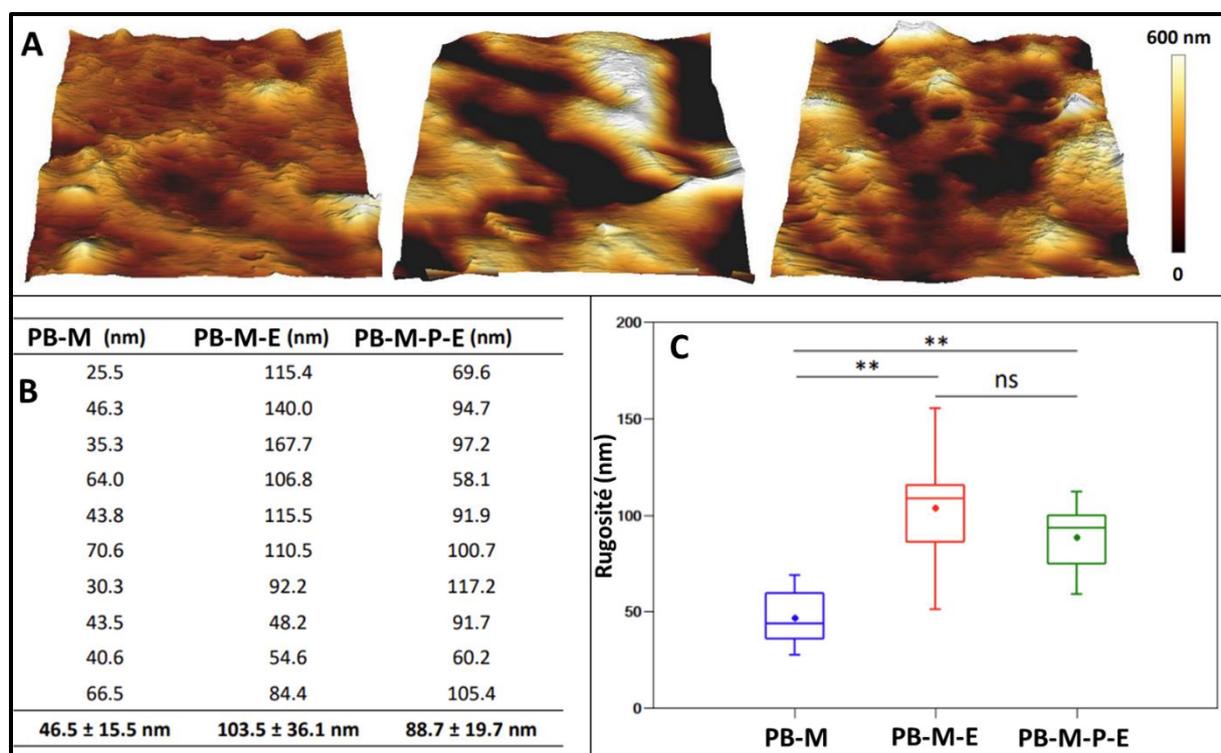


Figure 77 : A : Images AFM de hauteur obtenues en mode contact. De gauche à droite : PB-M, PB-M-E et PB-M-P-E. B (taille des images : 20 x 20 μm) : Mesure de la rugosité sur 10 aires de 5 x 5 μm. La rugosité est exprimée en nm. C : Représentation graphique en boîte à moustache des résultats de rugosité obtenus.

Le premier type d'analyse réalisée a consisté à scanner les différentes surfaces en mode contact afin d'obtenir des images haute-résolution de leur topographie. Ces images de hauteur ainsi obtenues sont présentées en Figure 77-A. De ces images, des analyses de rugosité peuvent ensuite être effectuées pour quantifier les éventuelles différences de topographie entre les différentes surfaces. Les résultats de ces analyses sont présentés en Figure 77-B (tableau reprenant toutes les valeurs obtenues) et Figure 77-C : ils montrent que les surfaces PB-M-E et PB-M-P-E ont une rugosité significativement différente de la surface PB-M.

Dans la littérature, il a été mis en évidence que l'immobilisation de fibronectine¹⁴¹ et de glucose oxydase²³¹ sur des surfaces de silice engendrait une augmentation de la rugosité de surface. Une autre étude a mis en évidence que l'immobilisation de BSA sur une surface de polyacide lactique lévogyre fait aussi augmenter la rugosité de surface.¹³⁷ Il est donc possible que la différence de rugosité observée dans le cas de nos échantillons soit causée par l'immobilisation de protéines en surface, ce qui semble cohérent car la surface PB-M n'a pas été exposée à des protéines. Cependant, Il ne devrait pas y avoir de protéines immobilisées sur la surface PB-M-E car celle-ci n'a pas été exposée à Jo_c ce qui devrait rendre impossible l'assemblage de InNpXyn11A sur la surface.

Une étude de Koen et al.²³² a mis en évidence qu'une surface polyester-uréthane voyait sa rugosité de surface augmenter avec l'exposition à l'eau. Il est donc possible d'émettre une hypothèse très peu renseignée dans la littérature. La surface étudiée est un élastomère constitué d'un réseau lâche de polymère hydrophobe. Il est possible que des portions de chaîne polymère soient pendantes en surface. Une fois ces portions de chaînes pendantes exposées à un milieu aqueux, elles pourraient se réarranger sous forme de pelote ce qui viendrait augmenter la rugosité de surface.

Suite à l'analyse AFM en mode contact des différentes surfaces, il n'est pas possible de conclure avec certitude que le greffage a bien eu lieu. Il se pourrait que les variations de rugosité de surface soient dues à l'immobilisation de protéines en surface et/ou au réarrangement de la surface élastomère en extrême surface.

Pour approfondir cette étude, les surfaces ont ensuite été analysées par AFM en mode spectroscopie de force. Les données de force enregistrées permettent d'extraire plusieurs informations à chaque point de contact avec la surface (Figure 78). En compilant les informations enregistrées sur plusieurs points de la surface il est possible de les étudier de façon statistique pour dégager des tendances.

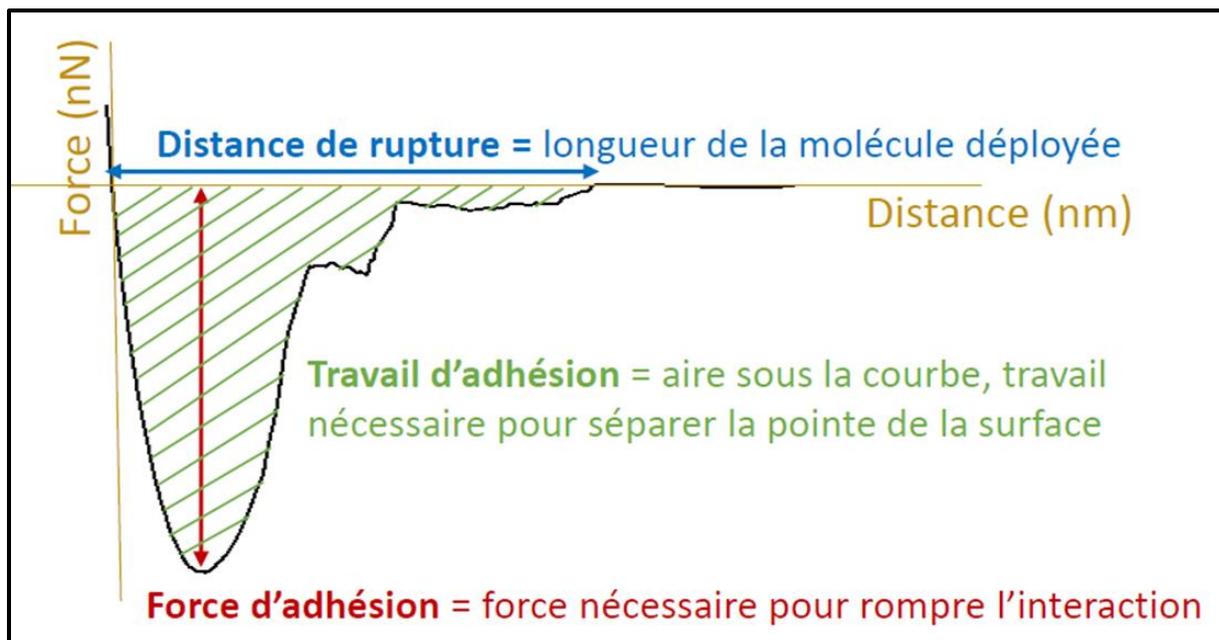


Figure 78 : Représentation schématique des différentes Informations qui peuvent être extraites d'une courbe de force (courbe de retrait) acquise lors de mesures de spectroscopie de force par AFM.

Sur chaque surface, 200 courbes de forces ont été enregistrées sur des aires de $10 \mu\text{m}^2$ sur chaque surface. Ces courbes ont ensuite été analysées pour en extraire les informations concernant la force d'adhésion, le travail, et la distance de rupture, comme représenté dans la Figure 78. Les différentes informations ainsi obtenues ont ensuite été regroupées pour chaque surface et représentées sous la forme d'histogrammes présentés en Figure 79.

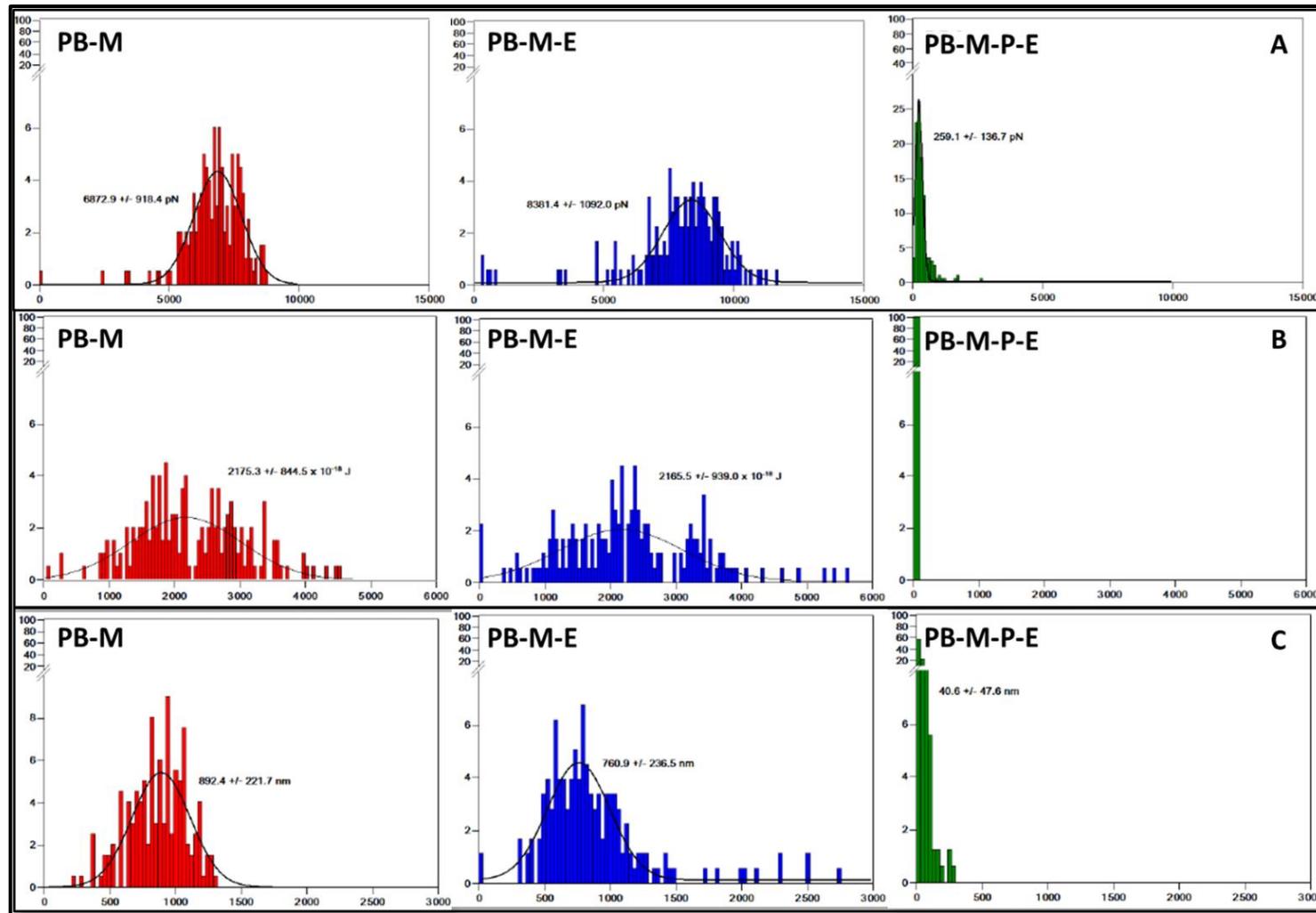


Figure 79 : Résultats des analyses AFM en mode spectroscopie de force des surfaces PB. Chaque histogramme représente les résultats obtenus en compilant les résultats extraits de 200 courbes sur chaque surface. A : Analyse de la force d'adhésion, avec le résultat indiqué en pN en abscisse. B : Analyse du travail d'adhésion, avec le résultat indiqué en $\times 10^{-18}$ J en abscisse. C : Analyse de la distance à rupture, avec le résultat indiqué en nm en abscisse.

Suite à cette analyse, il est observable sur la partie A que la force d'adhésion nécessaire pour séparer la pointe de l'échantillon est largement plus faible pour PB-M-P-E (0,3 nN) que pour les surfaces PB-M et PB-M-E (6,9 et 8,4 nN respectivement). La forme du pic principal indique qu'il s'agit d'une probable interaction de type hydrophobe (non spécifique) entre la surface et la pointe. Une autre hypothèse serait qu'il y ait des interactions électrostatiques entre la surface et la pointe de l'AFM. Des manipulations complémentaires utilisant une pointe hydrophobe pourraient mettre en évidence le type d'interactions ayant lieu ici. La partie B indique que le travail d'adhésion est beaucoup plus faible pour la surface PB-M-P-E, ce qui met en évidence qu'il n'y a pas de molécules qui adhèrent à la pointe AFM sur la surface PB-M-P-E. La distance à rupture est aussi beaucoup plus faible pour ce même échantillon (observable en C). Cela semble signifier que cette surface n'adhère pas à la pointe et ne se déploie donc pas au retrait de la pointe. Au contraire, les deux autres surfaces ont des molécules qui collent à la pointe et se déploient sur de longues distances.

Toutes ces remarques vont dans le sens qui était anticipé. Les enzymes semblent se greffer quand la surface est fonctionnalisée avec des maléimides et mise en présence de Jo_c au préalable. Au contraire, quand la surface n'a pas été mise au contact de Jo_c (PB-M-E) ou que la surface est uniquement fonctionnalisée avec des maléimides (PB-M), il n'y a pas de protéines en surface à la suite des lavages et les éventuelles chaînes polymères pendantes peuvent avoir tendance à adhérer à la pointe AFM.

Suite à cette analyse, il semble que le greffage des enzymes en surface est bien possible et spécifique. Mais au vu des résultats observés en XPS et en AFM en mode contact, il semble nécessaire de caractériser le greffage plus en profondeur afin de pouvoir le valider avec certitude.

3. Caractérisation du greffage de In-NpXyn11A en surface par mesure d'activité enzymatique

La dernière méthode mise en place pour caractériser le greffage des enzymes sur les surfaces fonctionnalisées consiste à mesurer les activités enzymatiques. Les surfaces sur lesquelles les enzymes sont greffées sont mises en présence d'un substrat chromogénique, le X₃.pNP (Figure 12, page 50), couramment utilisé dans la littérature pour caractériser des activités endoxylanitiques. Ce substrat est particulièrement bien adapté à NpXyn11A.¹⁸² Les enzymes greffées en surface hydrolysent le substrat et libèrent du paranitrophénal en solution, lequel absorbe à 401 nm. Il est donc possible de suivre l'hydrolyse du substrat par mesure

d'absorbance. Il s'agit de plus d'une méthode particulièrement sensible. Ce point permet de faire abstraction des problèmes de sensibilité rencontrés au moment de la caractérisation du greffage de Jo_c en surface (I.A.2, page 151).

Une gamme étalon a aussi été produite en introduisant différentes quantités d'enzymes dans les tubes contenant le substrat. En faisant un prélèvement unique à 30 min, il est possible de faire un graphique représentant l'absorbance mesurée à 30 min en fonction de la concentration en enzymes libres en solution (Figure 34, page 91).

Une fois cette calibration obtenue, elle peut être utilisée pour obtenir plus d'informations sur la densité enzymatique en surface pour les échantillons utilisée lors du test enzymatique. Il sera mis en évidence plus loin dans ce document que les enzymes immobilisées sur la surface ont le même comportement que des enzymes libres en solution vis-à-vis du $X_3.pNP$. Il est donc possible d'utiliser la gamme étalon faite sur des enzymes libres pour quantifier des enzymes immobilisées en surface. En effet, lors de ce test, un prélèvement est effectué à 30 min et son absorbance mesurée à 401 nm. En reportant la valeur mesurée sur la droite étalon, il est possible d'obtenir une concentration équivalente en enzymes libres (II- page 90).

Il est donc possible, par un simple test chromogénique, de connaître la densité surfacique en enzymes greffées en faisant la supposition que les enzymes libres en solution ont la même activité spécifique que les enzymes greffées. D'après une étude de Montanier et al.⁷ sur l'enzyme $InNpXyn11A$, cette supposition est valide pour des substrats de petite taille. Une expérience complémentaire venant corroborer cette hypothèse sera aussi présentée plus loin (I.A, page 176).

Un certain nombre d'expériences d'immobilisation d'enzymes ont été effectuées sur les surfaces PB, PI et PDMS en faisant varier les conditions de greffage et la totalité des surfaces ont ensuite été caractérisées suivant la méthode indiquée ci-dessus. Les premiers greffages ont été effectués sur la surface PB, c'est donc sur celle-ci que le développement de la méthode de greffage a été le plus poussée (Figure 80).

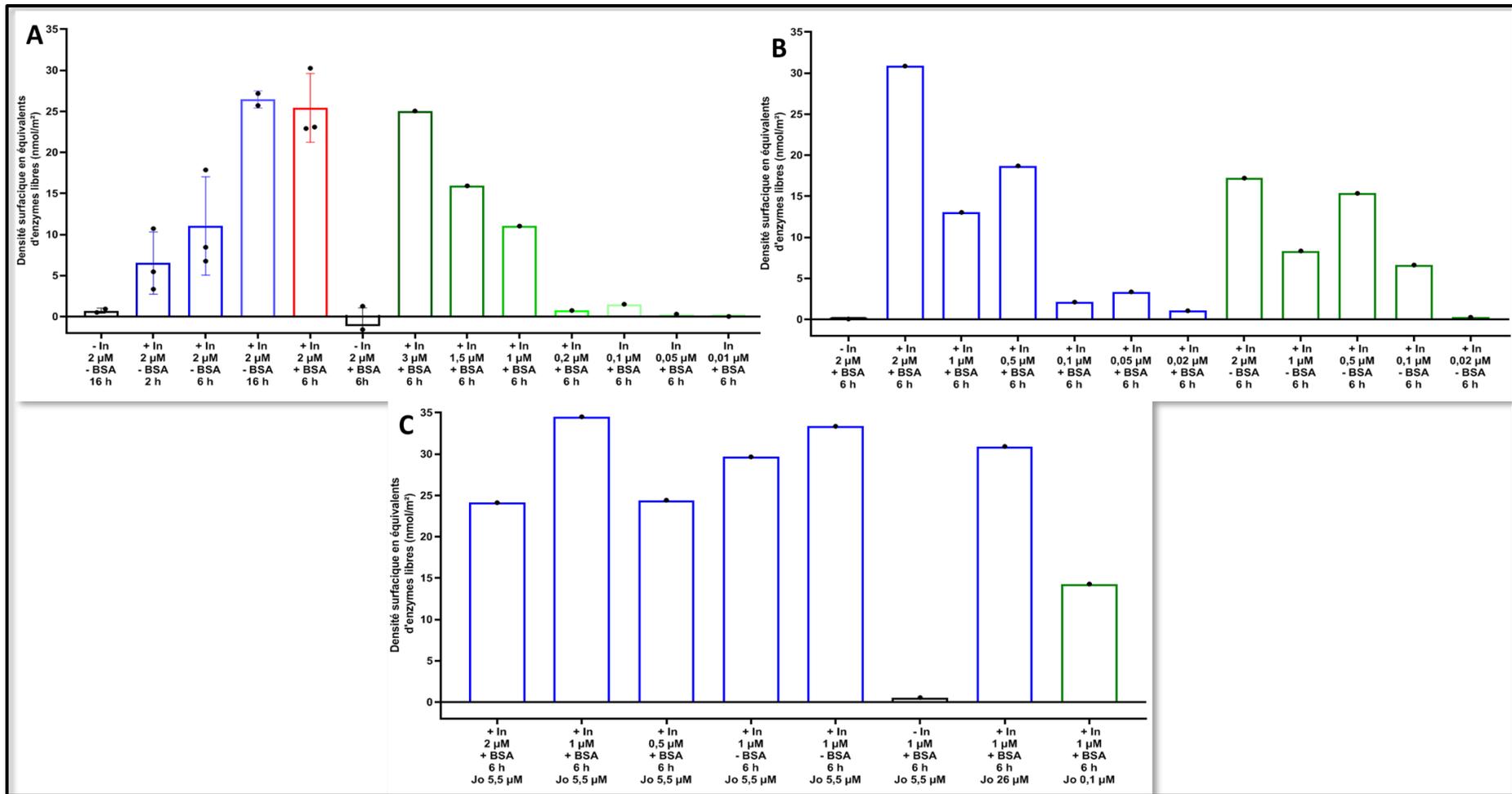


Figure 80 : Résultats des quantifications d'enzymes immobilisées en surface par le biais d'une gamme étalon faite sur des enzymes libres en solution. A/B/C : Enzymes immobilisées sur surface PB/PI/PDMS. Dans les légendes en abscisses, +/- In représente la présence ou non du fragment In associé à l'enzyme chimérique In-NpXyn11A. La concentration de l'enzyme dans le surnageant est indiquée en μM . La présence de BSA ou non dans le surnageant est indiquée par +/- . Le temps d'incubation est indiqué en heure. Dans le graphique C, la concentration de Jo_c en μM dans le surnageant au moment du greffage de cette protéine est aussi indiqué.

On observe sur l'ensemble des surfaces (Graphiques A, B et C) que lorsque le greffage est effectué avec *NpXyn11A* au lieu de *In-NpXyn11A*, les surfaces obtenues n'ont aucune activité enzymatique, ce qui met en évidence que le greffage des enzymes en surface est bien spécifique.

De plus, sur le graphique A, lorsque la durée d'incubation de la surface au contact des enzymes est prolongée, la densité de greffage finale obtenue est elle aussi augmentée. Le dernier point intéressant est que la présence de BSA (1 mg.mL^{-1}) dans le surnageant permet d'augmenter la cinétique du greffage. En effet, une surface incubée 6 h avec un surnageant contenant de la BSA aura une même densité surfacique de greffage qu'une surface incubée sur la nuit en l'absence de BSA. L'effet de la concentration en enzymes du surnageant a été étudiée pour la surface PB (graphique A). Plus la concentration est élevée, plus la densité de greffage obtenue est élevée. Ces résultats sont en ligne avec ce qui était attendu et viennent donc valider la qualité et la spécificité du greffage des enzymes en surface. De plus, en faisant l'hypothèse que les enzymes greffées ont la même activité spécifique que les enzymes libres en solution, la méthode de greffage mise en place permet de saturer la surface en enzymes avec 24 nmol/m^2 ((I.A.2.a) page 152).

Pour la surface PI (graphique B), les effets de la présence de BSA et de la concentration en enzymes du surnageant ont été étudiés. A durées d'incubations identiques, la présence de BSA et une concentration enzymatique du surnageant élevée augmentent la densité de greffage surfacique obtenue. Les tendances observées sont donc homogènes avec les observations faites sur la surface PB.

Pour la surface PDMS (graphique C), les paramètres étudiés sont l'utilisation de la BSA, l'utilisation de *InNpXyn11A* ou *NpXyn11A*, la concentration en enzymes et la concentration de Jo_c dans le surnageant au moment du greffage de celle-ci. Encore une fois, en l'absence de *In*, il n'y a pas eu de greffage. Pour cette surface, aucune tendance claire n'a pu être extraite concernant l'utilisation de la BSA et la concentration en enzymes dans le surnageant. Il est à noter qu'il a été possible de greffer des enzymes en surface malgré le greffage de Jo_c avec une très faible quantité de protéines dans le surnageant. Ce point sera intéressant pour les discussions du chapitre 6. Un dernier point notable pour le greffage sur les surfaces PDMS est que la densité surfacique obtenue a été, pour plusieurs échantillons, supérieure à 24 nmol/m^2 . Le greffage est supérieur à la saturation de surface, il est donc probable qu'une part des enzymes soient immobilisées de façon non spécifique par adsorption sur une première épaisseur d'enzymes greffées en surface. Ceci laisse supposer la formation d'une multicouche d'enzymes en surface par adsorption non spécifique. Pour remédier à ce point, il pourrait être intéressant

d'utiliser des concentrations plus faibles en enzymes et également de greffer Jo_c en surface avec des concentrations plus faibles en protéines.

Il est à noter qu'un seul greffage d'enzymes a été effectué sur la surface PDMSr et donc qu'aucune tendance n'a été étudiée sur cette surface. Le greffage effectué a cependant été validé avec une densité surfacique de 7,5 nmol/m².

En conclusion, différentes méthodes ont été mises en place pour caractériser le greffage de protéines en surface. Le greffage des protéines Jo_c n'a pu être mis en évidence que de manière qualitative par mesure d'angle de contact. L'utilisation de l'XPS et de l'AFM a permis d'obtenir des indices sur le greffage des protéines Jo_c ainsi que des enzymes In-NpXyn11A mais sans avoir de réelles certitudes. Le greffage des enzymes a lui aussi pu être mis en évidence grâce à la mesure des variations d'angles de contact en surface. Le greffage des enzymes, grâce à leur activité catalytique, a pu être mis en évidence de manière quantitative par mesure d'activités enzymatiques.

Grâce à ces méthodes de caractérisation, il est possible de conclure que la méthode de greffage est bien spécifique et applicable à différentes surfaces. Le greffage des enzymes en surface n'a lieu que lorsque l'assemblage Jo/In est possible, et il a été possible de greffer les enzymes sur 4 surfaces différentes en utilisant la même méthode. Il a été mis en évidence ci-dessus qu'une étape de développement est cependant nécessaire pour chaque surface afin d'obtenir les densités de greffage ciblées car il semble que les cinétiques d'assemblage varient d'une surface à l'autre. Ce dernier point est particulièrement remarquable en comparant les densités de greffages obtenues sur la surface PDMS aux densités obtenues, dans les mêmes conditions, sur les surfaces PB et PI.

Chapitre VI : Etude des activités enzymatiques spécifiques

A ce stade, il a été mis en évidence que les protéines Jo_c se greffent de manière spécifique sur les différentes surfaces fonctionnalisées par une réaction thiol-maléimide. Il a aussi été démontré que l'immobilisation des enzymes chimériques In-NpXyn11A a bien lieu de manière spécifique grâce à l'association Jo/In. Il a enfin été démontré qu'il était possible de caractériser la densité surfacique en enzymes grâce à un test d'activité enzymatique en faisant l'hypothèse, raisonnable au regard des travaux menés à TBI, que les enzymes greffées avaient la même activité spécifique que des enzymes libres sur le X₃.pNP. Dans ce chapitre, il sera question de valider cette hypothèse puis d'étudier le comportement des enzymes sur un substrat macromoléculaire, un polymère naturel de xylose issu du blé, le wheat arabinoxylan ou WAX ($M_w = 323\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), en étirant la surface afin de faire varier la densité surfacique en enzymes.

Il sera important de noter que l'évolution de la distance entre enzymes n'est pas linéaire avec l'évolution de la densité surfacique des enzymes. Il a été possible d'estimer les distances entre enzymes en reprenant les travaux de Montanier et al.⁷ et en émettant quelques hypothèses supplémentaires (Tableau 23).

Simulation	A	B	C	D	E	F	G	H
Densité surfacique (nmol/m ²)	21	18	15	12	9	6	3	1
Surface par enzyme (nm ² /enzyme)	79	92	110	138	184	276	553	1660
Distance entre enzyme (nm)	0.03	0.74	1.66	2.90	4.72	7.77	14.66	31.89

Tableau 23 : Estimation des distances entre enzymes greffées en fonction de la densité de greffage. Estimations faites en considérant que le greffage est homogène sur la surface. Le diamètre de l'enzyme est proche de 5 nm. La sphère occupée par l'enzyme est estimée avec un diamètre de 10 nm en accord avec Montanier et al.⁷ Une fois la surface occupée par les enzymes calculée, celles-ci sont associées à des cubes afin de pouvoir calculer simplement la distance séparant deux cubes.

Ce tableau met en évidence le fait que pour des densités enzymatiques en surface allant de 15 à 21 nmol/m², les variations de distances entre enzymes sont très faibles (1.66 et 0.03 nm respectivement). Il sera donc important d'étudier des surfaces avec des densités de greffage inférieures à 15 nmol/m².

A. Variation d'activité enzymatique spécifique due au greffage des enzymes

Dans le chapitre précédent, la densité d'enzymes greffées en surface a été déterminée à l'aide d'une droite étalon en faisant l'hypothèse que l'étape de greffage ne modifie pas leur activité spécifique. Il est important de prouver ce point afin de poursuivre le projet avec plus de certitudes.

Comme déjà mentionné, l'étude de 2019 de Montanier et al.⁷ a consisté à greffer In-NpXyn11A par association Jo/In sur des billes paramagnétiques commerciales dont la surface spécifique avait été déterminée avec précision. Toutefois, deux points diffèrent entre ces travaux et mes travaux de thèse. Tout d'abord, la chimie de greffage de Jo en surface consistait en une réaction entre les amines primaires de la protéine et le groupement carboxylique des fonctions NHS présentes à la surface des billes. De plus, ces billes présentaient une surface poreuse, augmentant considérablement la surface disponible et donc la quantité d'enzyme immobilisée, facilitant grandement sa quantification. Dans cette étude de 2019, il a donc été possible de quantifier la densité de greffage des enzymes en surface puis d'étudier plus aisément l'effet des variations des densités de greffage sur du X₃.pNP et sur un polymère naturel de xylose comparable au WAX.

Bien que des chimies différentes soient utilisées dans les deux projets, il s'agit des mêmes enzymes et de substrats très similaires : arabinoxylane de hêtre (250-350 kg.mol⁻¹) et arabinoxylane de blé (323 kg.mol⁻¹). Il est donc intéressant de comparer les résultats obtenus (Figure 81). Il est aussi important de noter que toutes les mesures d'activités enzymatiques mises en place dans ce projet sont faites en présence de BSA. La BSA s'adsorbe sur les parois du réacteur et permet d'éviter la potentielle adsorption d'enzymes qui pourraient se décrocher des surfaces.

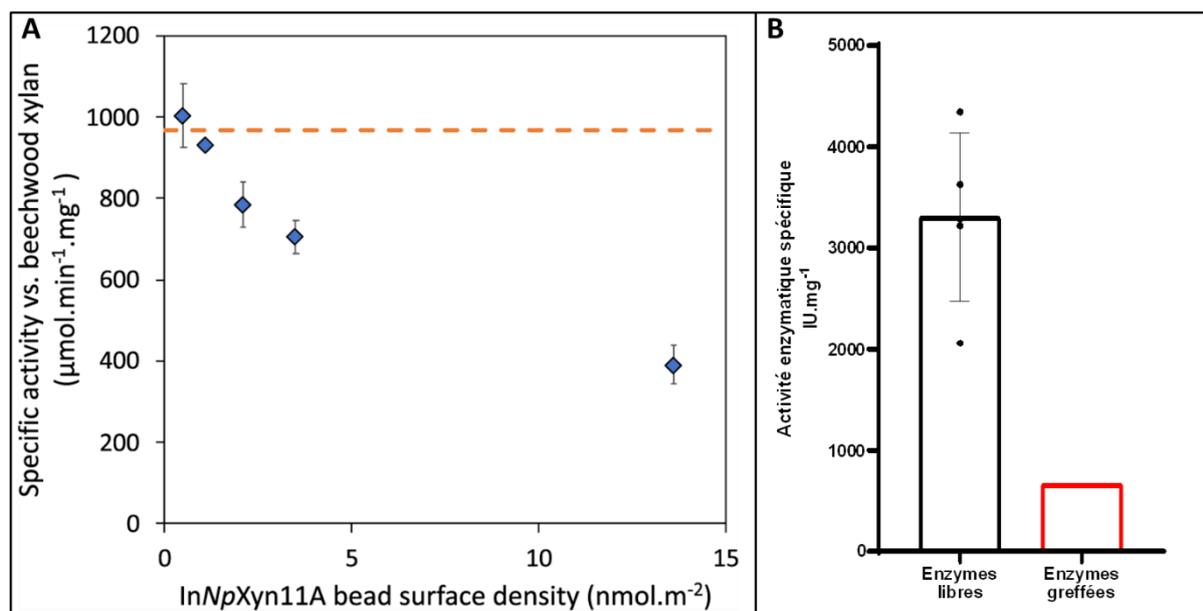


Figure 81 : A : Figure provenant de l'étude de Montanier et al.,⁷ variations d'activité spécifique d'enzymes In-NpXyn11A greffées sur des billes paramagnétiques poreuses en fonction de la densité surfacique en enzymes. L'étude est menée sur du xylane provenant de bois de hêtre. B : Mesure d'activité spécifique sur du WAX pour des enzymes In-NpXyn11A libres en solution ou greffées sur une surface PB.

Sur la partie A de la Figure 81 provenant de l'article de 2019, nous pouvons observer que plus la densité enzymatique en surface augmente plus l'activité spécifique sur le substrat macromoléculaire diminue. A une densité surfacique de 13,6 nmol/m², l'activité spécifique a diminué de plus de 60 %. Cette figure sera utilisée à de multiples reprises dans l'analyse des résultats de ce chapitre.

Sur la partie B de la Figure 81, nous observons que l'activité spécifique des enzymes immobilisées sur une surface PB et mesurée sur du WAX (en rouge) est très largement inférieure à la même quantité d'enzymes libres en solution (en noir). Avec une densité surfacique de 16 nmol/m² (mesurée en amont sur du X₃.pNP), l'activité spécifique sur le WAX a diminué de 79 % ce qui est tout à fait en ligne avec les résultats de 2019. Il est à noter que la mesure de l'activité spécifique des enzymes greffées n'a été faite qu'une seule fois. En effet, pour des raisons explicitées plus loin dans ce chapitre, il n'a pas été possible de réaliser plusieurs tests sous forme de répliques. C'est pourquoi les données obtenues présentent une grande marge d'erreur. Il est aussi important de noter, afin d'avoir une bonne compréhension des résultats présentés ultérieurement dans ce chapitre, que la mesure de l'activité spécifique de la xylanase est déterminé sur 45 min d'hydrolyse. Dans les conditions décrites dans le paragraphe II-, page 90, plusieurs points de suivi permettent de tracer une droite dont le coefficient directeur

représente la quantité de produit libéré par unité de temps exprimée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$. Le coefficient directeur est rapporté à la quantité d'enzymes exprimé en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de solution pour obtenir la valeur de l'activité spécifique de l'enzyme ($(\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1})\cdot\text{mg}^{-1}$ ou $\text{IU}\cdot\text{mg}^{-1}$, IU pour International Unit).

Suite à cette expérience, il est très probable que l'hypothèse de départ, à savoir que l'immobilisation de notre xylanase ne modifie pas l'activité spécifique des enzymes sur le X₃.pNP, soit valide. Si cette hypothèse était fausse, la quantification des enzymes en surface serait aussi fausse et il serait donc probable que les variations d'activité spécifique observées sur le WAX ne soient pas en ligne avec les résultats de 2019.

Cependant, une dernière possibilité reste à écarter. Il serait possible que l'immobilisation de *NpXyn11A* en suivant le protocole de cette thèse entraîne une modification structurelle de la xylanase dont la conséquence serait une interaction différente avec le substrat, et donc une modification de son activité spécifique. Le facteur distance entre enzyme ne serait pas le seul à prendre en compte. Si cette possibilité venait à se vérifier, il serait impossible de l'observer par l'expérience précédente (Figure 81). Il est donc nécessaire d'ajouter une dernière expérience pour corroborer l'ensemble. Pour cela, la surface élastomère greffée avec In-*NpXyn11A* a été étirée de manière mécanique (I.B.2, page 86) afin de faire varier la densité de greffage apparente. L'activité spécifique a ensuite été déterminée sur du X₃.pNP (Figure 82). Ce substrat, de par sa taille, diffuse facilement vers le site actif des enzymes. Il ne devrait donc pas y avoir de variations de l'activité spécifique des enzymes en fonction de leur densité surfacique.

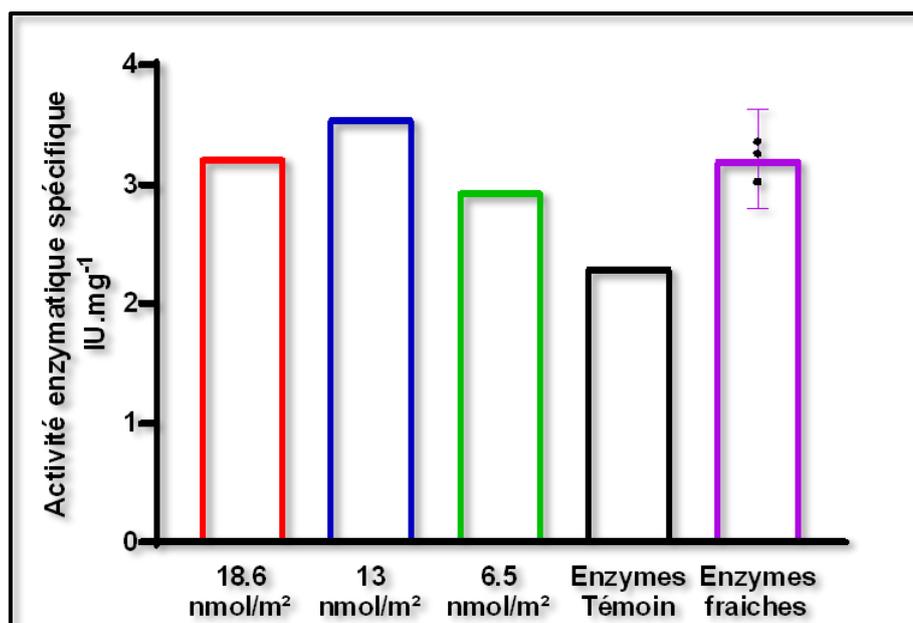


Figure 82 : Mesure d'activité spécifique d'enzymes immobilisées en surface (PB) ou libres en solution sur du X₃.pNP. Les trois premières mesures ont été faites sur une même surface avec des taux d'étirement différents pour faire varier la densité des enzymes en surface.

Sur cette figure, les trois premières colonnes correspondent à la même surface avec des taux d'étirement différents. La densité enzymatique en surface est donc différente sur chacune des trois mesures et a été indiquée en abscisse. La quatrième colonne (en noir) correspond aux enzymes libres provenant du même aliquot que les enzymes greffées sur la surface. Ces enzymes ont donc passé 17 jours à 4 °C. L'activité spécifique de ces enzymes libres a été mesurée une seule fois. La cinquième colonne (en violet) correspond à l'enzyme libre provenant du même lot de production mais dont l'aliquot a été décongelé quelques minutes avant la mise en place de l'expérience.

Il est à noter qu'aucune expérience dédiée n'a été mise en place pour ce point, mais il a été observé au fil des expériences que les enzymes, une fois décongelées et stockées à 4 °C, perdent en activité avec le temps. Dans le cas présenté ici, les enzymes libres ont perdu 28 % de leur activité spécifique en 17 jours par rapport à des enzymes qui sont restées congelées sur la même période.

En comparant les activités spécifiques des enzymes libres (en violet et noir), nous observons que les enzymes fraîchement décongelées ont une activité spécifique plus élevée de 43 % par rapport aux enzymes conservées à 4 °C, ce qui est bien en ligne avec ce qui avait été observé précédemment. En comparant les activités spécifiques des enzymes greffées (en rouge, bleu et

vert) et les enzymes libres fraîchement décongelées (en violet), il est possible d'émettre l'hypothèse que l'immobilisation stabilise les enzymes dans le temps. Il est possible que les enzymes libres en solution finissent par former des agrégats en solution ce qui pourrait expliquer la baisse de leur activité spécifique. Dans le cas des enzymes immobilisées en surface, la formation d'agrégats de ce type ne serait pas possible ce qui pourrait expliquer la meilleure stabilité dans le temps. Il serait cependant nécessaire de faire des expériences supplémentaires pour valider ce point par exemple en mettant en évidence la formation d'agrégats en solution.

En comparant les surfaces avec enzymes greffées et les enzymes libres fraîchement décongelées, on observe que les niveaux d'activités spécifiques sont très proches (3,22 ; 3,55 et 2,95 IU.mg⁻¹ pour les trois surfaces avec enzymes immobilisées et 3,21 IU.mg⁻¹ pour les enzymes libres fraîches). La mesure a été faite une seule fois pour les enzymes immobilisées mais a été faite en triplicata pour les enzymes libres fraîches. L'intervalle de confiance à 95 % pour les enzymes fraîches est compris entre 2,79 et 3,64 IU.mg⁻¹. Nous observons que les activités spécifiques pour l'ensemble des mesures avec enzymes immobilisées sont comprises dans l'intervalle de confiance à 95 % des enzymes fraîches. Il n'y a donc pas d'écart significatif entre ces données. Cette observation ajoute encore un peu plus de poids à l'hypothèse faite plus haut selon laquelle le greffage n'a pas d'effet sur l'activité spécifique des enzymes sur le X₃.pNP. Le seul impact que le greffage semble avoir sur les enzymes est de les stabiliser dans le temps, préservant par là-même leur activité spécifique.

Enfin, en comparant les trois surfaces avec enzymes greffées (en rouge, bleu et vert), on observe que les écarts d'activités spécifiques ne sont probablement pas significatifs ce qui signifie que la distance entre enzymes n'a pas d'effet sur leurs activités spécifiques quand le substrat est du X₃.pNP. Cela est sans doute dû au fait que le substrat chromogénique est petit, beaucoup plus que l'enzyme, qu'il diffuse facilement et peut ainsi être reconnu par le site catalytique de l'enzyme qui est particulièrement exposé et accessible.¹⁸²

Suite à ces deux expériences et en ajoutant les observations faites par Montanier et al.,⁷ il est possible de confirmer de manière très raisonnable que ni le protocole d'immobilisation développé, ni la densité apparente n'ont d'effet sur l'activité spécifique des enzymes sur le X₃.pNP en dehors d'une probable limitation dans le temps des phénomènes d'agrégation des enzymes. Il est donc probable que l'immobilisation des enzymes préserve leur activité dans le temps. Ceci permet donc de valider la méthode de quantification des enzymes en surface (renvoi chap 5). Nous pouvons donc étudier les variations d'activité spécifique des enzymes sur le WAX en fonction de leur densité en surface. Pour rappel, cette manipulation se rapproche de ce qui

avait été fait en 2019 à la différence majeure qu'il s'agira ici d'étirer la surface de manière mécanique pour faire varier la densité enzymatique apparente en surface.

B. Effet de la densité surfacique sur l'activité spécifique de In-NpXyn11A

Pour assurer une bonne compréhension au lecteur, il est important de noter ici que l'ensemble des travaux décrits dans cette partie sont mis en place en utilisant pour substrat le WAX. Il s'agit d'un substrat macromoléculaire de près de 800 unités xylose, en comparaison avec le X3.pnp qui ne correspond qu'à 4 unités xylose. Cette différence de taille devrait mettre en lumière une moindre diffusibilité du substrat et donc une difficulté pour le substrat d'atteindre le site actif des enzymes, d'autant plus que ces enzymes sont greffées proches les unes par rapport aux autres.

1. Relargage d'enzymes immobilisées en surface dans le surnageant

Afin d'analyser les variations d'activités spécifiques des enzymes greffées en fonction de leur densité surfacique, les surfaces sont placées sur un dispositif d'étirement (I.B.2, page 86). Celui-ci est fondé sur la fixation des surfaces polymères à l'extrémité d'une canule en verre modifiée à dessein. La surface élastomère peut alors être étirée en introduisant dans la canule des quantités connues de tampon. Le tampon injecté dans la canule est le même que celui qui sera au contact de l'extérieur de la surface afin d'éviter de potentiels phénomènes osmotiques, même s'il est très peu probable qu'un tel phénomène puisse avoir lieu. Les surfaces étirées sont ensuite plongées dans un réacteur en présence du substrat à hydrolyser et la réaction suivie selon le protocole du paragraphe I.B.3, page 90. Connaissant la quantité d'enzymes sur la surface grâce à la quantification faite au préalable (I.B.3, page 170), il est possible de déterminer l'activité spécifique de notre enzyme. Une fois la cinétique terminée, la surface est rincée puis étirée ou non à un taux différent avant d'être replongée dans le réacteur en présence d'une solution fraîche contenant du substrat (Figure 83). De cette manière, il est possible d'utiliser la même surface plusieurs fois avec des densités enzymatiques en surface différentes.

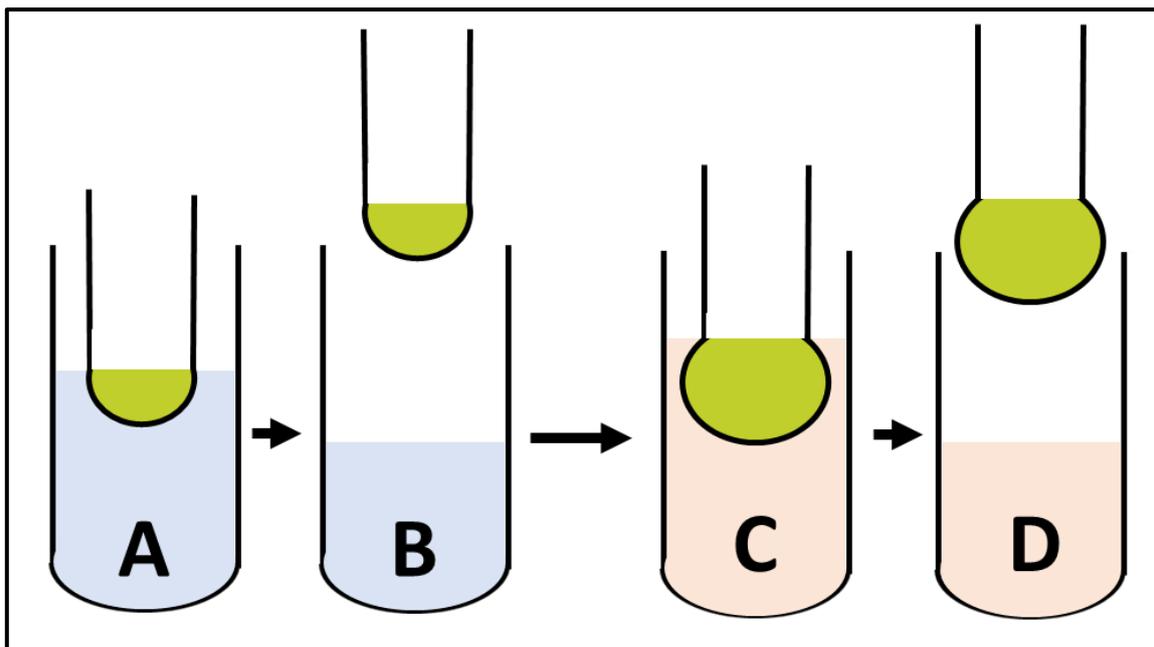


Figure 83 : Représentation de la méthode mise en place pour les études d'activités enzymatiques. A : La surface à étudier est plongée dans le surnageant. B : La surface est retirée du surnageant et celui-ci est étudié seul. C : Le surnageant est changé pour être frais puis la surface est étirée et plongée dans le réacteur pour être étudiée. D : La surface est retirée du surnageant et celui-ci est étudié seul. Le même processus est répété autant de fois que nécessaire pour compléter l'étude visée.

Les premières cinétiques ont donné des résultats surprenants car l'activité enzymatique des surfaces diminuaient constamment d'une cinétique à l'autre, que la surface soit étirée ou non. Devant le manque de cohérence et d'exploitabilité de ces résultats, il a été décidé de recommencer les manipulations en suivant l'activité enzymatique du surnageant après retrait de la surface PI (Figure 84).

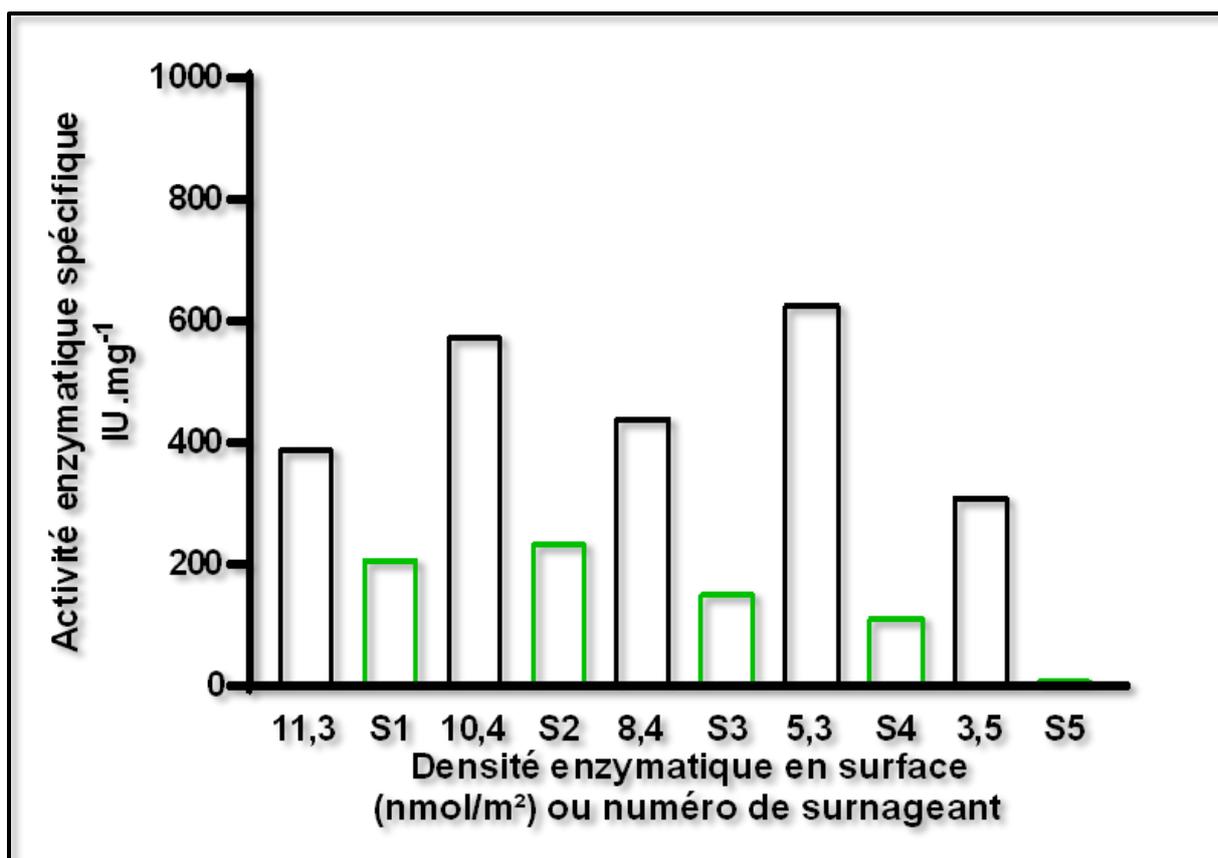


Figure 84 : Etude d'activité enzymatique d'une surface greffée PI avec différentes densités surfaciques en enzymes (en noir) ainsi que des surnageants associés (en vert). Les mesures vont par paire noir/vert. Après avoir effectué les deux mesures noir/vert, le surnageant est remplacé par du surnageant frais avant de procéder à la mesure suivante.

Il est important de clarifier la méthode mise en place pour le lecteur car cette étude est récurrente dans ce chapitre. La surface étudiée est plongée dans un milieu réactionnel et une première cinétique est réalisée (11,3 nmol/m²). La surface est ensuite retirée du milieu réactionnel et une mesure de la cinétique est prolongée sur le milieu seul (S1), à priori en absence d'enzymes. Puis la surface est étirée ou non pour faire varier sa densité surfacique et est plongée dans un milieu réactionnel nouvellement préparé pour faire une nouvelle cinétique (10,4 nmol/m²). La surface est ensuite retirée pour étudier le milieu réactionnel seul (S2), comme précédemment. Le processus est répété le nombre de fois nécessaire pour l'étude.

Quand une activité enzymatique est observée dans un surnageant (S1-2-3-4), cela met en évidence la présence d'enzymes dans celui-ci. Or, la seule source possible de ces enzymes est la surface fonctionnalisée qui était plongée dans le milieu réactionnel. Ce résidu activité ne peut alors provenir que d'un relargage d'enzymes de la surface.

On observe sur cette figure 3 que les surnageants présentent une activité enzymatique, ce qui ne devrait pas être le cas dans la mesure où les enzymes sont greffées en surface de manière covalente. Il est à noter que les activités des surnageants sont aux alentours de 30 % de l'activité des solutions contenant les surfaces. Cela pourrait laisser croire que 30 % des enzymes sont relarguées dans le surnageant, ce qui est faux. En effet, il a été observé plus tôt ((I.C.1.c), page 131) que l'activité enzymatique spécifique des enzymes libres sur le WAX est de $3\,917 \pm 11\%$ IU.mg⁻¹. En analysant la première cinétique (la plus à gauche sur la Figure 84 (à 11,3 3 nmol/m²), l'activité enzymatique spécifique est de 393 IU.mg⁻¹. Dans le cas présent, les enzymes greffées ont une activité spécifique qui est 89 % inférieure à celle des enzymes libres, ce qui est élevé mais qui sera étudié dans des expériences ultérieures. En supposant que les enzymes relarguées dans le surnageant retrouvent leur activité spécifique d'origine, il n'y a besoin de relarguer que très peu d'enzymes pour obtenir une activité élevée au vu de l'activité de la surface.

Il est donc raisonnable de penser qu'une faible quantité d'enzymes soit relarguée dans le surnageant au fil des cinétiques et que ceci vienne perturber les résultats observés. L'hypothèse du relargage d'enzymes immobilisées de façon non spécifique est aussi appuyée par le fait que l'activité des différents surnageants finit par réduire au fil des cinétiques, ce qui montre qu'à chaque cinétique, la quantité d'enzymes relarguées en solution tend à diminuer. Il est donc probable qu'après 5 cinétiques, la quasi-totalité des enzymes immobilisées de manière non spécifique ait été relarguée en solution.

Afin d'avoir plus de certitudes sur cette hypothèse, une analyse du contenu en protéines du surnageant a été effectuée. Les protéines Jo_c et les enzymes In-NpXyn11A utilisées dans nos expériences présentent toutes un His-Tag qui a été utilisé pour les purifier (XII-, page 80). Cette étiquette d'affinité a été de nouveau mise à contribution pour isoler spécifiquement ces protéines, notamment de la BSA présente à 1 mg.mL⁻¹, du surnageant en utilisant de la même résine que celle utilisée pour leur purification. Cette approche permet de plus de concentrer les protéines d'intérêt et ainsi de pouvoir les mettre en évidence par gel SDS-PAGE (Figure 85).

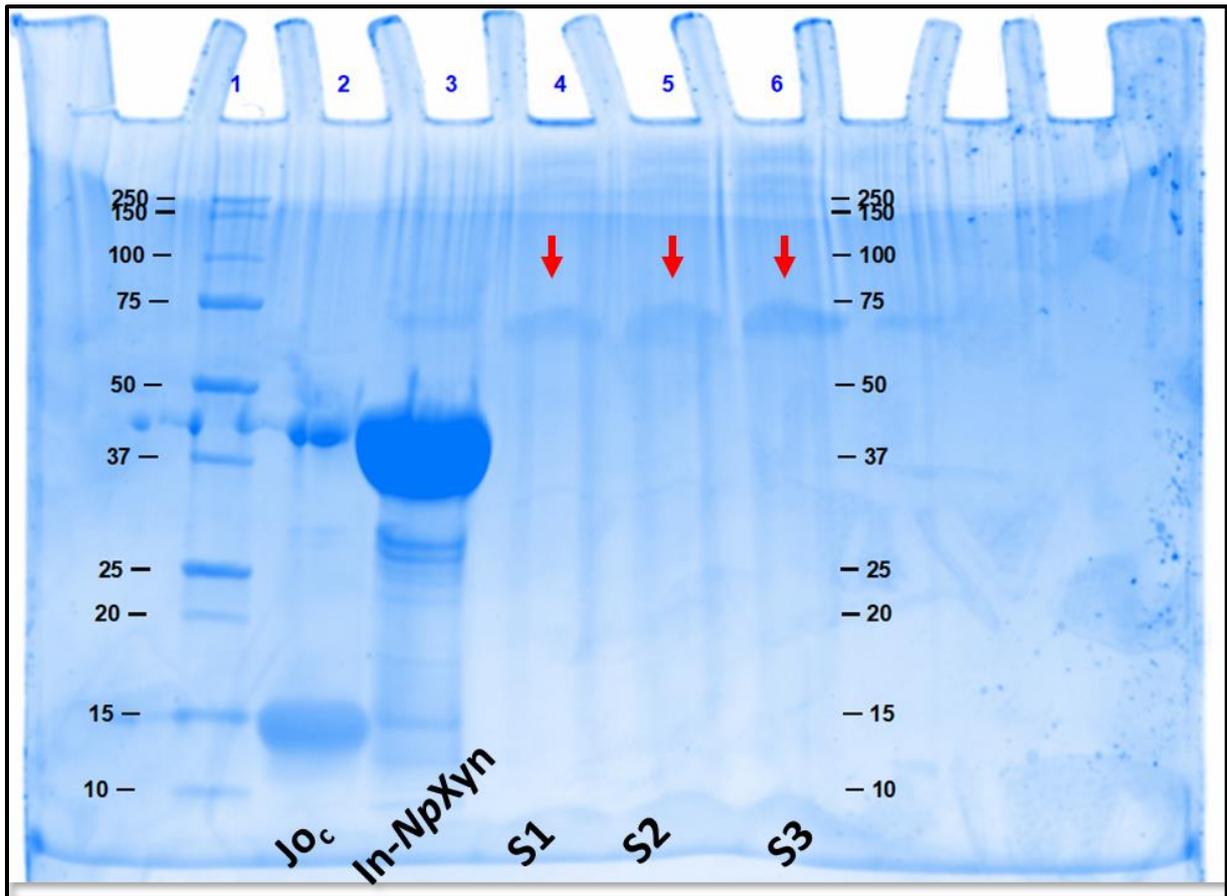


Figure 85 : Gel SDS-PAGE révélé au bleu de Coomassie. Ce gel est utilisé pour mettre en évidence la présence de protéines dans le surnageant à la suite d'une mesure d'activité enzymatique sur une surface PI. Les protéines Jo_c et $In-NpXyn11A$ sont inoculées dans les puits 2 et 3 respectivement. Les surnageants concentrés sont déposés dans les puits 4, 5 et 6.

Des bandes correspondantes à des protéines sont présentes dans les puits 4, 5 et 6 provenant des trois surnageants correspondant aux cinétiques S1, S2 et S3 de la Figure 84. Leur masse molaire apparente correspond à des complexes protéiques de type Jo_c - Jo_c / $In-NpXyn$ dans lesquels Jo_c formerait un pont disulfure avec une autre molécule de Jo_c elle-même associée à $In-NpXyn11A$. La présence de ces bandes confirme bien que des enzymes sont relarguées en solution. Ces enzymes proviennent probablement d'une immobilisation multicouche non spécifique de Jo_c . Cependant, la qualité du greffage des enzymes n'est pas remise en question car aucune bande correspondant à $In-NpXyn11A$ ou même Jo_c - $In-NpXyn11A$ n'est observable. Dans le cas où l'assemblage $Jo/In-NpXyn11A$ ne serait pas efficace et des enzymes seraient relarguées seules en solution, ce phénomène aurait lieu dans des proportions trop faibles pour être détecté ici. En conséquence, bien que la possibilité du relargage d'enzymes seules en

solution ne soit pas totalement écartée, elle sera négligée car ayant possiblement lieu dans des proportions non significatives.

Comme indiqué plus tôt (I.B, page 161), un très large excès (plus de 2 000 équivalents) de protéines Jo_c a été utilisé au moment du greffage. Dans la mesure où, pour des raisons d'encombrement stérique, seulement $1/2000^{\text{ème}}$ des protéines Jo_c peuvent se greffer sur la surface par réaction thiol-maléimide pendant l'incubation (16 h), il est probable qu'un pourcentage notable des protéines restantes s'adsorbe sur la surface de manière non spécifique. Dans ce cas, une première couche de protéines se grefferait sur la surface et d'autres protéines viendraient s'adsorber de façon non spécifique pour former par endroits des multicouches de protéines. Dans l'étape suivante, les enzymes chimériques viendraient s'assembler sans distinction avec les protéines Jo_c greffées et celles adsorbées. Une fois la surface conservée au frigo, les protéines Jo_c auraient toujours la liberté de former des dimères par le biais des ponts disulfures ((I.C.1.b)(2), page 127).

A ce stade, il est très probable qu'en plus des protéines et enzymes greffées, il y ait des protéines Jo_c adsorbées, des dimères $Jo_c - Jo_c$ adsorbés ainsi que des assemblages $Jo_c - Jo_c / In-NpXyn11A$ adsorbés. Les trois éléments adsorbés ont des poids moléculaires de 10 617, 21 234 et 62 778 $g.mol^{-1}$, respectivement. Deux raisons pourraient expliquer le fait qu'un seul de ces trois éléments soit détecté par analyse du gel SDS-PAGE des surnageants. La première est que les deux premiers éléments sont beaucoup moins gros (en masse) que le troisième ce qui fait qu'à nombre égal, leur masse est entre 3 et 6 fois plus faible. Il est donc possible que Jo_c et son dimère soient présents dans la solution mais que leur concentration soit en dessous de la limite de détection. Il est à noter que la limite de détection sur ce type de gel est comprise entre 100 et 500 ng de protéines.²³³ La seconde possibilité serait que la dimension de l'assemblage $Jo_c - Jo_c / In-NpXyn11A$ facilite sa désorption et que cet élément soit le seul à se désorber pendant les études cinétiques.

Les enzymes $In-NpXyn11A$ ont été assemblées avec Jo de façon covalente dans leur totalité et aucune adsorption non spécifique n'a été mise en lumière. La quantité d'enzymes présente dans le surnageant n'était « que » de 44 équivalents dans le cas des surfaces PI, PDMS et PDMSr et de 88 équivalents dans le cas de la surface PB. Cette concentration plus faible diminue donc la probabilité d'adsorption non spécifique. De plus, différentes conditions de greffage ont été analysées (I.B.3, page 170). Des densités surfaciques supérieures à la saturation de surface ont pu être observées mais, lorsque c'est arrivé, les conditions de greffage ont été ajustées pour n'avoir que du greffage covalent.

Les hypothèses faites ci-dessus n'ont pas pu être étayées car ces dernières expériences n'ont été faites que très tardivement dans le projet. Il a donc été décidé de considérer que les enzymes relarguées ont la même activité enzymatique spécifique que les enzymes libres d'origine. En considérant ce point il est possible de quantifier les enzymes relarguées (Figure 86).

$E_r = [E_r] \times V$	$[E_r] = A / AS$
------------------------	------------------

Figure 86 : Equation permettant de connaître la quantité d'enzymes relarguées en solution. E_r : Quantité d'enzymes relarguées en μmol . $[E_r]$: concentration des enzymes dans le surnageant en $\mu\text{mol.L}^{-1}$. V : volume du surnageant en L. A : l'activité mesurée dans le surnageant en $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$. AS : l'activité spécifique des enzymes libres sur WAX en $(\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}).\mu\text{mol}^{-1}$.

Une fois que les enzymes relarguées à chaque cinétique sont quantifiées, la densité surfacique des enzymes a été ajustée en prenant en compte l'étirement et les enzymes perdues. De cette manière, il a été possible d'exploiter les résultats malgré la présence de phénomènes non contrôlés. Il serait tout de même intéressant de pouvoir effectuer de nouveaux greffages en utilisant des quantités beaucoup plus faibles de Jo_c afin d'éviter les problématiques associées.

2. Etirements de surface

a) Mesure d'activité des enzymes immobilisées sur des surfaces élastomères à base de polybutadiène (PB) en fonction de leur densité surfacique

Les premiers résultats ont pu être obtenus sur la surface PB. Comme indiqué dans le chapitre III, des problèmes ont été rencontrés dès la deuxième année dans la synthèse des surfaces PB ce qui a impliqué que cette surface n'a pas été exploitable pour une partie du projet. Il a cependant été possible de faire une étude d'activité enzymatique spécifique avec étirement de la surface (Figure 87).

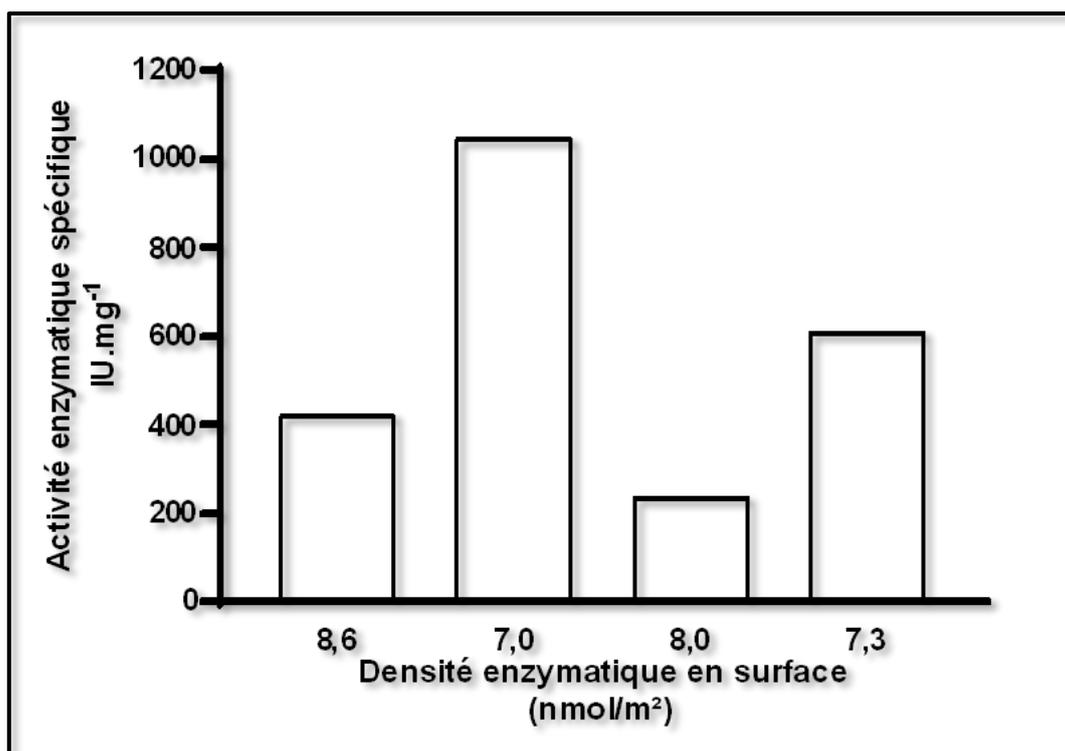


Figure 87 : Résultats des cinétiques mises en place sur la surface PB greffée avec InNpXyn11A. Quatre cinétiques ont été mises en place en alternant étirement/relaxation.

Dans cette étude, quatre cinétiques ont été mises en place sur une même surface PB sur laquelle des enzymes sont greffées. La première cinétique a été faite sur une surface relaxée (8,6 nmol/m²) puis trois autres cinétiques ont été faites en alternant étirement et relaxation. La densité surfacique en enzymes pour chaque cinétique a été indiquée en abscisse.

Il est important de noter qu'au moment de la réalisation de cette expérience, le phénomène de relargage d'enzymes en solution n'était pas connu. L'activité enzymatique des surnageants n'a donc pas été analysée et il est très probable que la quantité d'enzymes en nombre sur la surface au moment de la quatrième cinétique soit inférieure à celle de la première cinétique. Ce résultat, représentant tout ce qui a pu être obtenu avec la surface PB est donc à interpréter avec précaution. Afin de faciliter l'analyse, les résultats ont été extraits de la figure (Tableau 24).

Numéro de cinétique	1	2	3	4
Variation des dimensions de la surface par rapport à la première cinétique (%)	0,0 %	+ 23 %	+ 8 %	+ 18 %
Densité surfacique en enzymes (nmol/m ²)	8,6	6,96	7,97	7,25
Activité enzymatique spécifique (IU.mg ⁻¹)	425,9	1048,8	237,2	610,8
Variations par rapport à la première cinétique (%)	0 %	+ 146 %	- 44 %	+ 43 %
Variation par rapport à l'activité spécifique des enzymes libres	-89 %	-73 %	-94 %	-84 %

Tableau 24 : Résultats obtenus à partir de la Figure 87. Dans la dernière ligne les résultats sont comparés à l'activité spécifique des enzymes libres (3 917 IU.mg⁻¹). IU = $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$

En comparant les cinétiques 1 et 2 puis 3 et 4, on observe que lorsque la surface est étirée, l'activité enzymatique spécifique augmente. En observant la transition entre les cinétiques 2 et 3, on remarque qu'une diminution de l'étirement entraîne une diminution de l'activité spécifique. L'explication de ces phénomènes provient du fait que quand la surface est étirée, la densité surfacique en enzyme diminue et il est donc très probable que la distance moyenne entre enzymes augmente. L'augmentation de la distance entre enzymes devrait augmenter leur accessibilité au substrat et, en conséquence, leur activité spécifique.

Cependant, en comparant les cinétiques 1 et 3, on observe que la densité de surface et l'activité spécifique sont toutes deux plus faibles pour la cinétique 3 ce qui n'est pas en ligne avec les résultats attendus. Il est possible de supposer à posteriori que des enzymes ont été relarguées dans le surnageant et n'ont pas été prises en compte. L'activité spécifique est calculée en divisant l'activité par la concentration en enzymes. Si la concentration en enzymes est surestimée, ce qui est le cas dans notre hypothèse, l'activité spécifique est alors sous-estimée.

Un autre point important à souligner est la perte d'activité spécifique des enzymes greffées en comparaison aux enzymes libres. Cette perte oscille entre - 73 % et - 94 % pour des densités surfaciques allant de 6,96 à 8,6 nmol/m². Il est étrange d'avoir une perte aussi importante pour

des densités surfaciques qui sont encore loin de la saturation à 24 nmol/m². Cette observation implique la présence probable de phénomènes non contrôlés en surface.

Le comportement des polymères sous contrainte est très complexe à appréhender et comporte beaucoup de variables. Une revue de Micheletti et al.²³⁴ donne un aperçu des comportements possibles des polymères sous contrainte à l'échelle d'une chaîne polymère. Il y est notamment mis en évidence que les chaînes polymères peuvent former des nœuds qui, de la même manière qu'une ficelle emmêlée, ne peuvent pas être défaits sauf si au moins une extrémité du polymère est libérée. Dans le cas d'une surface élastomère, si un de ces nœuds venait à se former, il ne pourrait en aucun cas être démêlé car il y a des points de réticulation entre les différentes chaînes polymères. Une seconde étude de Diani et al.²³⁵ montre à l'aide de modèles statistiques le comportement d'une unique chaîne polyisoprène sous contrainte. Cette étude met en évidence le fait qu'en plus des phénomènes mécaniques mis en évidence par Micheletti et al., les polymères sont des molécules soumises à de multiples interactions du fait de leur composition chimique.

Ces deux études mettent en évidence que le comportement à l'échelle de la chaîne polymère dans un système aussi complexe que celui utilisé dans ce projet est difficilement prévisible. Bien qu'il soit clair que l'étirement homogène et pluridirectionnel de la surface va statistiquement arranger les polymères dans le sens de la contrainte et diminuer la densité de surface des enzymes, il est très probable que des phénomènes incontrôlés à l'échelle de la chaîne polymère aient lieu.

Nous pouvons supposer qu'une partie des enzymes greffées en surface sur des chaînes polymères qui vont être amenées à bouger sous la contrainte peuvent se retrouver dans des positions non prévues initialement. Il serait possible que certaines enzymes, malgré la présence de Jo-In jouant le rôle d'espaceur utilisé pour le greffage, entrent en contact avec la surface sous l'effet de la contrainte mécanique. Si l'enzyme entre en contact avec la surface, la topologie de son site catalytique peut être modifiée, diminuant l'affinité de l'enzyme pour son substrat, où même être en contact avec la surface dans une position qui rendrait son site catalytique inaccessible au substrat. Si cela venait à arriver, certaines enzymes ne seraient plus actives. La perte d'activité de certaines enzymes pourrait donc expliquer la faible activité spécifique en comparaison de celle des enzymes libres. Dans le cas où cette hypothèse serait vérifiée, le phénomène tendrait à s'accroître avec les différents étirements (Figure 88).

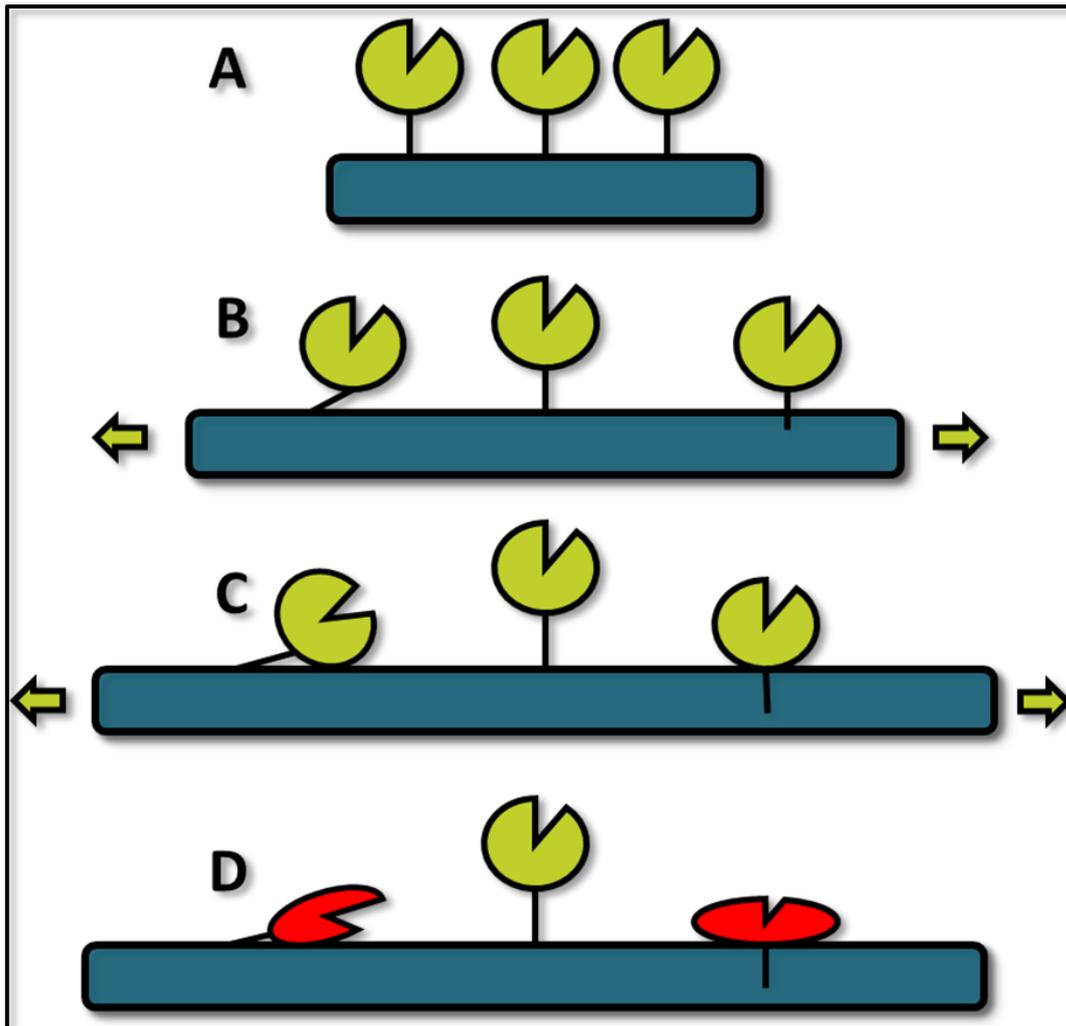


Figure 88 : Représentation des potentiels effets non-contrôlés rencontrés lors de l'étirement des surfaces. A : Les enzymes sont greffées avec une densité donnée sur la surface via un espaceur Jo/In. B : La surface est étirée et les premiers phénomènes sont observables. La densité surfacique moyenne des enzymes diminue. A gauche, une enzyme se rapproche de la surface par inclinaison du fait de l'espace qui lui est rendu disponible. Au milieu, rien ne se passe, c'est le cas idéal. A droite, Une enzyme se rapproche de la surface car la chaîne polymère sur laquelle elle est immobilisée commence à être internalisée sous l'effet de la traction. C : La surface est encore étirée et les phénomènes observés sont accentués. D : En rouge, les enzymes forment des interactions faibles au contact de la surface ce qui peut provoquer l'adsorption et la déformation de leur structure tridimensionnelle.

En conclusion, l'étude de cette surface a permis de mettre en évidence que l'étirement de la surface diminue la densité surfacique statistique en enzymes et que ceci entraîne une hausse de l'activité enzymatique spécifique. Il apparaît cependant très probable que des enzymes aient été relarguées en surface et que des phénomènes non contrôlés aient eu lieu en surface ce qui a impliqué une non répétabilité des phénomènes observés à l'étirement ainsi qu'une perte d'activité enzymatique beaucoup plus forte que ce qui était anticipé. Il sera intéressant de

croiser les résultats obtenus ici avec ceux obtenus sur les autres surfaces pour, peut-être, obtenir plus de réponses à ces hypothèses.

b) Mesure d'activité des enzymes immobilisées sur des surfaces élastomères à base de polyisoprène (PI) en fonction de leur densité surfacique

I- Cinétiques successives sur une surface PI avec enzymes greffées en appliquant un gradient d'étirement à chaque cinétique

Beaucoup plus de cinétiques ont pu être mises en place sur les surfaces PI. Dans un premier temps, un gradient d'étirements a été mis en place (I.B.2, page 86). Le faible contrôle procuré actuellement par l'outil utilisé sur le taux d'étirement ne permet pas d'anticiper en amont l'étirement exact de la surface. En conséquence, la surface est étirée dans des proportions approximatives et la surface étirée est imagée. Le traitement des images de chaque surface étirée sur le logiciel ImageJ permet de déterminer le taux d'étirement des surfaces à chaque cinétique.

Cette manipulation a consisté à faire 5 cinétiques successives en augmentant l'étirement de la surface à chaque fois (Figure 89 et Tableau 25). Pour cela, entre chaque cinétique 0,25 mL ont été injectés dans l'outil d'étirement de la surface.

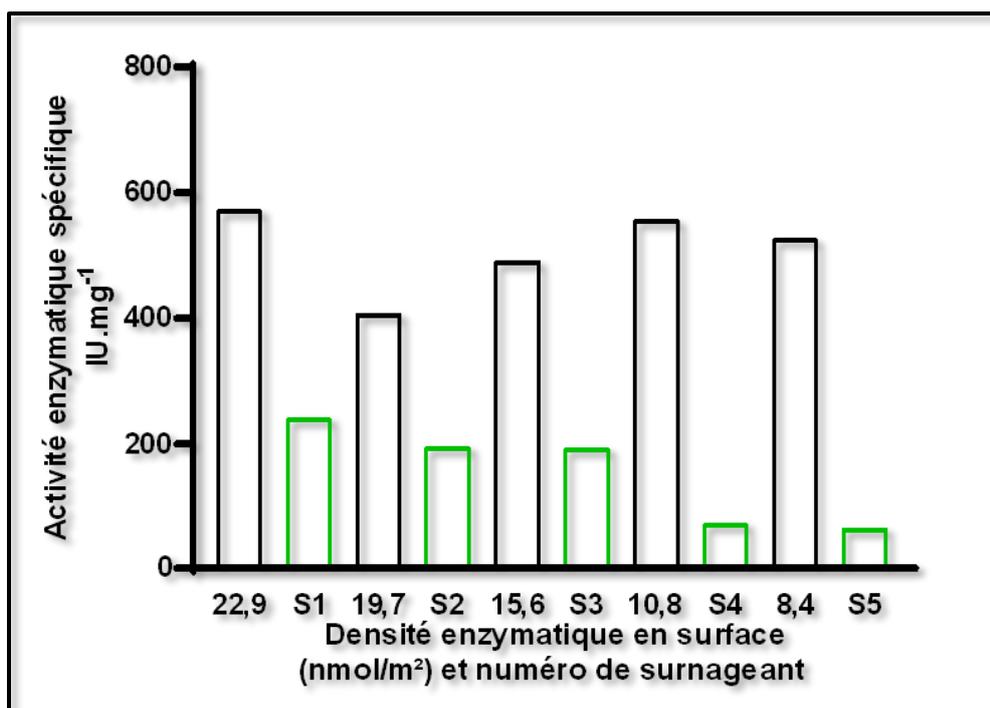


Figure 89 : Etude d'activité enzymatique d'une surface greffée PI avec différentes densités surfaciques en enzymes (en noir) ainsi que des surnageants associés (en vert). Un gradient d'étirement a été appliqué à chaque cycle (noir/vert) ainsi qu'un changement de surnageant pour démarrer le cycle suivant avec du surnageant frais.

Numéro de cinétique	1	2	3	4	5
Variation des dimensions de la surface par rapport à la première cinétique (%)	0 %	+ 9 %	+ 31 %	+ 81 %	+ 128 %
Densité surfacique (nmol/m²)	22,9	19,7	15,6	10,8	8,3
Activité enzymatique spécifique (IU.mg ⁻¹)	571,2	407,5	490,2	555,9	526,0
Variation par rapport à la première cinétique (%)	0 %	- 28 %	- 14 %	- 2 %	- 8 %
Variation pas rapport à l'activité spécifique des enzymes libres (%)	- 85 %	- 89 %	- 87 %	- 85 %	- 86 %

Tableau 25 : Récapitulatif des données obtenues en appliquant un gradient d'étirement à une surface PI greffée.

Dans la Figure 89, différentes cinétiques ont été mises en place sur la même surface avec des taux d'étirement de la surface croissants. L'analyse de l'activité des surnageants a permis d'estimer la quantité d'enzymes relarguées en solution et donc d'ajuster la densité surfacique en enzyme pour les cinétiques successives. Les données ont ensuite été assemblées dans le Tableau 25 pour faciliter la lecture.

Malheureusement, il est difficile d'extraire une tendance des données obtenues. Il est cependant possible de faire quelques observations et émettre des hypothèses. Il est à noter que des enzymes ont été relarguées dans le surnageant à chacune des cinétiques car tous les surnageants ont une activité enzymatique. Ces enzymes relarguées ont été prises en compte pour ajuster les valeurs de densités surfaciques.

En analysant les résultats de la première cinétique, on observe que, pour une densité surfacique de 22,9 nmol/m², les enzymes greffées ont une activité spécifique 85 % plus faible que des enzymes libres. C'est la même diminution d'activité que ce qui avait été observé sur la surface PB à la différence qu'ici, la densité surfacique est très proche de la saturation. Bien que nous n'ayons pas de données claires pour prédire la perte d'activité attendue pour ce niveau de densité surfacique, il paraît crédible de considérer que cette perte d'activité spécifique est cohérente car en prolongeant la tendance observée dans l'étude de Montanier et al.⁷ (Figure 81) nous nous approchons de cet ordre de grandeur.

En analysant les résultats des cinétiques 2, 3 et 4, on voit que chaque étirement a entraîné une diminution de la densité surfacique et une augmentation de l'activité spécifique des enzymes. Cette tendance est en ligne avec les attentes mais elle n'a pas été aussi forte qu'anticipé. En effet, entre les cinétiques 2 et 4, la densité surfacique passe de 19,7 à 10,8 nmol/m² alors que l'activité spécifique n'augmente que de 36 %. En se basant sur l'étude de Montanier et al. (Figure 81) l'augmentation attendue était plus importante car pour une densité surfacique de 10,8 nmol/m², l'activité spécifique aurait dû être de l'ordre de 50 % de celle des enzymes libres, soit environ 1 950 IU.mg⁻¹ au lieu de 555,9 IU.mg⁻¹ ici.

Pour la cinétique 5, donc l'étirement le plus fort, l'activité spécifique diminue à nouveau ce qui est contraire aux anticipations. L'activité spécifique à étirement maximum est la même que celle obtenue à étirement minimum ce qui est totalement contraire aux attentes.

Plusieurs hypothèses peuvent être mises en avant pour essayer d'expliquer les tendances observées ici. Comme indiqué pour la surface PB, il est possible que la contrainte appliquée à la surface au moment de l'étirement fasse entrer des enzymes en contact avec l'élastomère ce

qui pourrait leur faire perdre leur conformation et donc leur activité. Ce phénomène viendrait expliquer la très faible augmentation de l'activité avec l'étirement et plus particulièrement la perte d'activité au moment de l'étirement le plus important.

Cependant, il semble que cette hypothèse ne soit pas suffisante pour expliquer les très faibles variations observées du fait de l'étirement. En comparant les données obtenues avec celles observées sur la surface PB, il apparaît que les variations d'activités spécifiques observées sur la surface PI sont beaucoup plus faibles qu'attendues.

Une étude de Mertz et al.²³⁶ a mis en évidence que quand des phosphatases alcalines, plus connues sous le nom ALP, sont immobilisées dans une matrice de polyélectrolytes, celles-ci n'ont plus accès au substrat en surface. Quand la surface est étirée, les enzymes « remontent » mécaniquement vers la surface et ont accès au substrat ce qui permet de mesurer leur activité.

Dans notre projet, des images de MEB sur la surface PI (Figure 46) ont montré qu'après étirement de la matrice PI, la densité surfacique en charges diminue de 27,9 %. Bien qu'à notre connaissance aucune publication ne permet de valider ce point, il est possible que les charges en surface se comportent comme les enzymes de l'étude de Mertz et al. et « remontent » mécaniquement vers la surface. Si cette hypothèse était vérifiée, alors les particules n'étant pas liées chimiquement à la matrice polyisoprène pourraient être relarguées dans le surnageant.

La méthode de fonctionnalisation de la surface se base sur un traitement plasma. Il est donc possible que les charges soient aussi fonctionnalisées,^{237,238} ce qui leur donnerait une densité surfacique en enzymes identique à la matrice polyisoprène, à savoir 22,9 nmol/m² dans ce cas. Si cette hypothèse était vérifiée, elle expliquerait une grande partie des incohérences observées plus haut car elle impliquerait que la quantification des enzymes relarguées dans le surnageant serait fautive et que les densités surfaciques et activités spécifiques estimées seraient également fausses.

En considérant que les charges soient relarguées dans le surnageant avec une densité de greffage de 22,9 nmol/m², les enzymes relarguées auraient une activité spécifique d'environ 500 IU.mg⁻¹ très proche de l'activité spécifique des enzymes en surface avant étirement. En reprenant la formule utilisée pour quantifier les enzymes dans le surnageant (Figure 86), on voit que l'estimation serait très différente dans le cas indiqué ici.

Afin d'observer ce phénomène, une simulation a été faite en considérant que la totalité des enzymes relarguées dans le surnageant soient en fait adsorbées sur des charges. Il ne s'agit que

d'une approximation, la réalité est sûrement plus nuancée. En reprenant les données de la (Figure 89) et en utilisant cette hypothèse, les nouveaux résultats ont pu être résumés ici (Tableau 26).

Numéro de cinétique	1	2	3	4	5
Variation des dimensions de la surface par rapport à la première cinétique (%)	0 %	+ 9 %	+ 31 %	+ 81 %	+ 128 %
Densité surfacique (nmol/m ²)	22,9	12,1	4,6	- 0,5	- 1,5
Activité enzymatique spécifique (IU.mg ⁻¹)	571,2	660,7	1 679,3	- 11 400,1	- 2 935,5
Variation par rapport à la première cinétique (%)	0 %	+ 15 %	+ 194 %	- 2 095 %	- 613 %
Variation par rapport à l'activité spécifique des enzymes libres (%)	- 85 %	- 83 %	- 57 %	- 391 %	- 174 %

Tableau 26 : Résultats obtenus en faisant des mesures d'activités spécifiques sur des enzymes greffées sur surface PI et en appliquant un gradient d'étirement. Résultats obtenus en faisant l'estimation que toutes les enzymes relarguées dans le surnageant étaient greffées sur des charges, impliquant que leur activité spécifique est de 571,2 IU.mg⁻¹.

Les résultats obtenus ici sont évidemment farfelus. Il est impossible d'avoir une densité enzymatique en surface négative. Cependant, en observant les résultats des trois premières cinétiques et en les comparant aux résultats obtenus plus haut (Tableau 25), il est clair que les résultats sont très différents. Nous mettons en évidence ici que des enzymes relarguées dans le surnageant sous forme libre ou greffées sur des charges vont totalement changer les résultats obtenus. Dans le premier cas la densité surfacique en enzymes est largement surestimée alors qu'elle est fortement sous-estimée dans le second cas.

Il est possible que les trois facteurs cités plus haut soient représentés, à savoir :

- Enzymes libres relarguées dans le surnageant sous forme Jo-Jo/In-NpXyn11A. Ce relargage est entraîné par la formation d'une adsorption multicouche de Jo_c au moment

du greffage de celle-ci. Les enzymes relarguées ayant une activité spécifique de $3\,917 \text{ IU.mg}^{-1}$.

- Enzymes ayant perdu leur activité. Ceci serait provoqué par la mise en contact d'enzymes avec la surface au moment de l'étirement du fait de mouvements non-contrôlés des chaînes polymères sur lesquelles des enzymes seraient greffées, entraînant la potentielle perte de conformation du site catalytique des enzymes ou la non-accessibilité de celui-ci au substrat. Certaines enzymes, toujours présentes en surfaces, n'auraient plus d'activité spécifique.
- Enzymes relarguées dans le surnageant en étant greffées sur des charges. Ce relargage serait provoqué par la remontée en surface et le relargage en solution des charges du fait des contraintes mécaniques appliquées. Les enzymes relarguées ont la même activité que les enzymes greffées initialement, soit 571 IU.mg^{-1} dans ce cas.

II- Cinétiques successives sur une surface PI avec enzymes greffées en alternant étirement et relaxation de la surface

Une autre expérience a été mise en place afin d'étudier l'effet de l'étirement de nos surfaces PI sur l'activité des enzymes immobilisées. Dans ce cas, plusieurs cinétiques ont été réalisées en alternant des états étirés et relaxés. Les résultats ont été représentés comme précédemment (Figure 90 et Tableau 27).

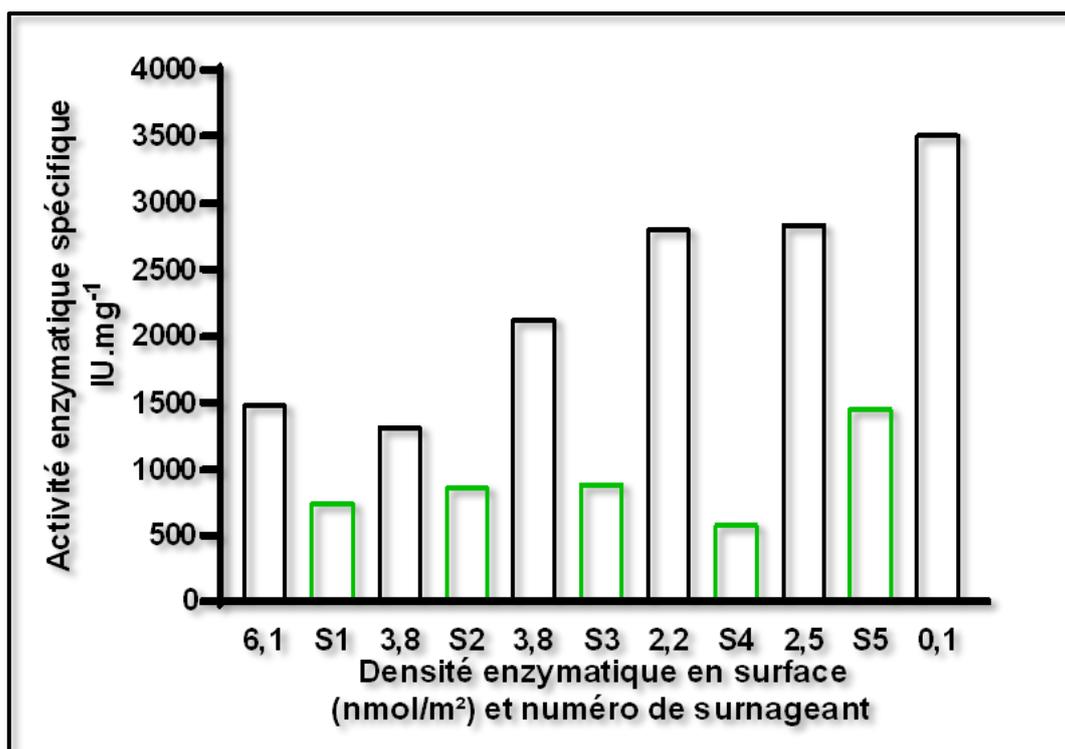


Figure 90 : Etude d'activité enzymatique d'une surface greffée PI avec différentes densités surfaciques en enzymes (en noir) ainsi que des surnageants associés (en vert). La surface a été successivement étirée et relaxée d'un cycle de mesure (noir/vert) à l'autre. Le surnageant a aussi été changé entre chaque cycle afin de démarrer le cycle suivant dans des conditions identiques.

Numéro de cinétique	1	2	3	4	5	6
Variation des dimensions de la surface par rapport à la première cinétique (%)	0 %	+ 29 %	0 %	+ 35 %	0 %	+ 182 %
Densité surfacique (nmol/m ²)	6,1	3,8	3,8	2,2	2,5	0,01
Activité enzymatique spécifique (IU.mg ⁻¹)	1491,8	1321,3	2143,9	2804,4	2845,4	3517,5
Variation par rapport à la première cinétique (%)	0 %	+ 11 %	+ 43 %	+ 88 %	+ 90 %	+ 135 %
Variation pas rapport à l'activité spécifique des enzymes libres (%)	- 61 %	- 66 %	- 45 %	- 28 %	- 27 %	- 10 %

Tableau 27 : Récapitulatif des données obtenues en appliquant une alternance étirement/relaxation à une surface PI greffée. Ces résultats ont été obtenus en supposant que l'ensemble des enzymes relarguées dans le surnageant soient sous forme libre.

Les différentes cinétiques ont été mises en place sur la même surface PI en alternant successivement étirement et relaxation de la surface. L'analyse de l'activité des surnageants a permis d'estimer la quantité d'enzymes relarguées en solution et donc d'ajuster la densité surfacique en enzyme pour les cinétiques successives. Les données ont ensuite été assemblées dans le Tableau 27 pour faciliter la lecture.

En partant de l'idée que la surface allait subir une alternance étirement/relaxation entre les cinétiques, il aurait été prévisible que l'activité enzymatique spécifique alterne entre hausse et baisse d'une cinétique à l'autre. Ce n'est pas du tout ce qui est observé ici. Le fort relargage d'enzymes en solution a complètement annulé les effets de l'étirement entre les différentes cinétiques. Ce phénomène est particulièrement visible en comparant les cinétiques 2 et 3 dans le tableau. En passant de la cinétique 2 à 3, la surface est relaxée ce qui diminue la surface totale. Dans le même temps, du fait du relargage des enzymes en solution, la densité surfacique en enzymes reste la même à 3,8 nmol/m². Ce même phénomène est observable dans une moindre mesure en comparant les cinétiques 4 et 5. Il est donc clair que le relargage des enzymes en solution complexifie encore une fois fortement l'interprétation des résultats.

Dans cette expérience, les variations d'activités enzymatiques spécifiques ont suivi une tendance intéressante. Une autre représentation des résultats a été faite afin de permettre une meilleure lecture de cette tendance (Figure 91).

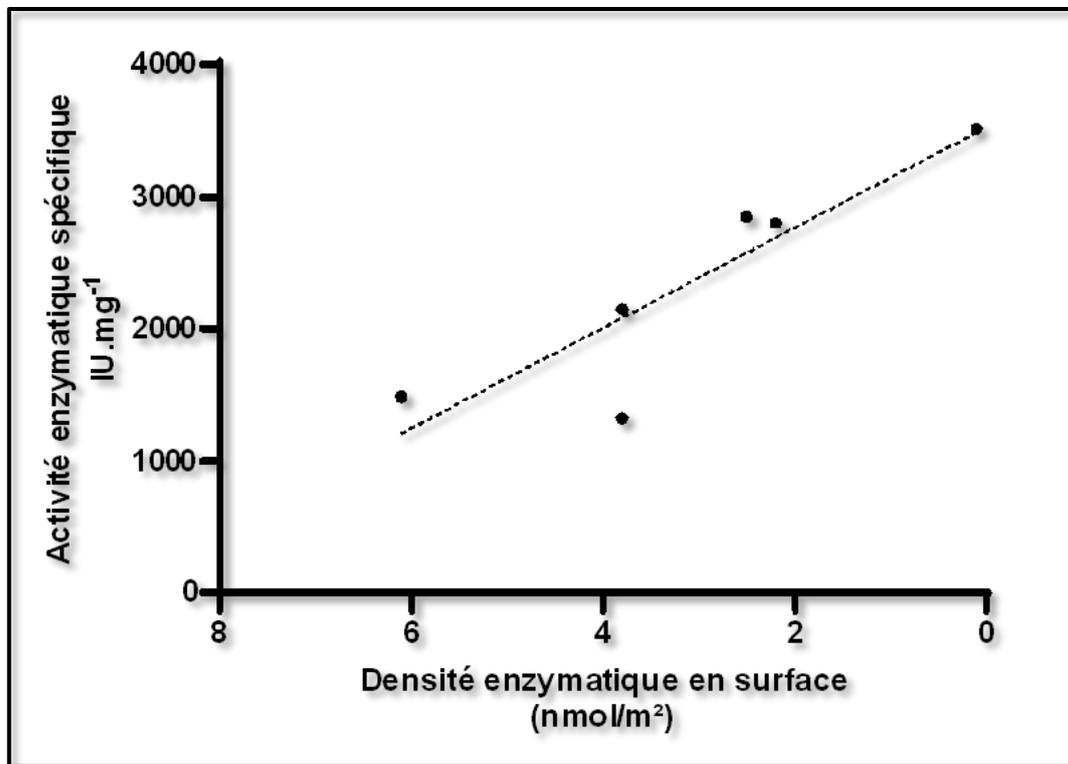


Figure 91 : Activités spécifiques des enzymes *In-NpXyn11A* en fonction de leur densité surfacique sur une surface PI. Ces résultats sont obtenus en appliquant une alternance étirement/relaxation à la surface entre les différentes mesures d'activités.

Ce graphique reprend les données obtenues dans la Figure 90 et représente l'activité spécifique des enzymes immobilisées en surface en fonction de leur densité sur cette même surface.

Selon ce graphique, la diminution de la densité enzymatique en surface entraîne une hausse de l'activité enzymatique spécifique. Il est aussi intéressant de noter qu'à la densité minimale, 0,01 nmol/m², l'activité spécifique est la plus élevée avec 3 517 IU.mg⁻¹ ce qui est 10 % inférieur à l'activité spécifique des enzymes libres de 3 917 IU.mg⁻¹.

Pour la première cinétique, une densité surfacique de 6,1 nmol/m² donne une activité spécifique 60 % inférieure à celle des enzymes libres. En reprenant l'étude de Montanier et al.,⁷ la diminution aurait dû être d'environ 40 % (Figure 81). Dans la mesure où les conditions n'étaient pas les mêmes (substrat, réacteur, manipulateur...) il est possible que cet écart ne soit pas significatif.

Il est à noter que la surface a subi une première cinétique en amont afin de quantifier les enzymes en surface. Il est possible qu'au moment de cette cinétique des enzymes aient été relarguées dans le surnageant, ce qui nous a amenés à surestimer la densité surfacique réelle fixée à 6,1 nmol/m².

En conclusion, les trois phénomènes non contrôlés décrits dans la première expérience sur la surface PI sont probablement présents ici aussi mais avec des proportions différentes :

- Enzymes relarguées dans le surnageant sous forme Jo-Jo/In-NpXyn11A. Les densités et activités spécifiques affichées (Figure 90, Figure 91 et Tableau 27) ont été calculées en faisant la supposition que la totalité des enzymes relarguées dans le surnageant l'ont été sous forme libre. Nous observons que les résultats calculés sont cohérents et s'approchent de ce qui était anticipé. Il est donc probable que ce phénomène de désorption soit prépondérant ici.
- Enzymes dégradées sous la contrainte mécanique. Ce phénomène n'est pas vraiment observé ici. Cela semble cohérent car les taux d'étirements, en dehors de la dernière cinétique, ont été plus faibles que sur la première expérience avec gradient d'étirement.
- Enzymes relarguées dans le surnageant en étant greffées sur des charges. Ce phénomène semble faible ici. S'il est probablement présent, son impact est beaucoup plus faible que pour l'expérience où un gradient d'étirement a été appliqué. Les enzymes sont greffées avec une densité de 6,1 nmol/m² au lieu de 22,9 nmol/m² précédemment. Les enzymes greffées sur les charges ont donc une activité spécifique de 1 491,8 IU.mg⁻¹ au lieu de 571,2 IU.mg⁻¹ précédemment. En conséquence, si des enzymes sont relarguées dans le surnageant en étant greffées sur des charges, leur activité spécifique s'écarte moins de l'activité spécifique des enzymes libres que ce qui avait été vu précédemment, ce qui limite l'erreur de quantification des enzymes dans le surnageant.

III- Cinétiques successives sur une surface PI avec enzymes greffées avec plusieurs répétitions avec des taux d'étirement identiques

La dernière expérience mise en place sur la surface PI a consisté à faire plusieurs cinétiques sans étirement puis en refaire plusieurs avec un étirement constant (Figure 92 et Tableau 28).

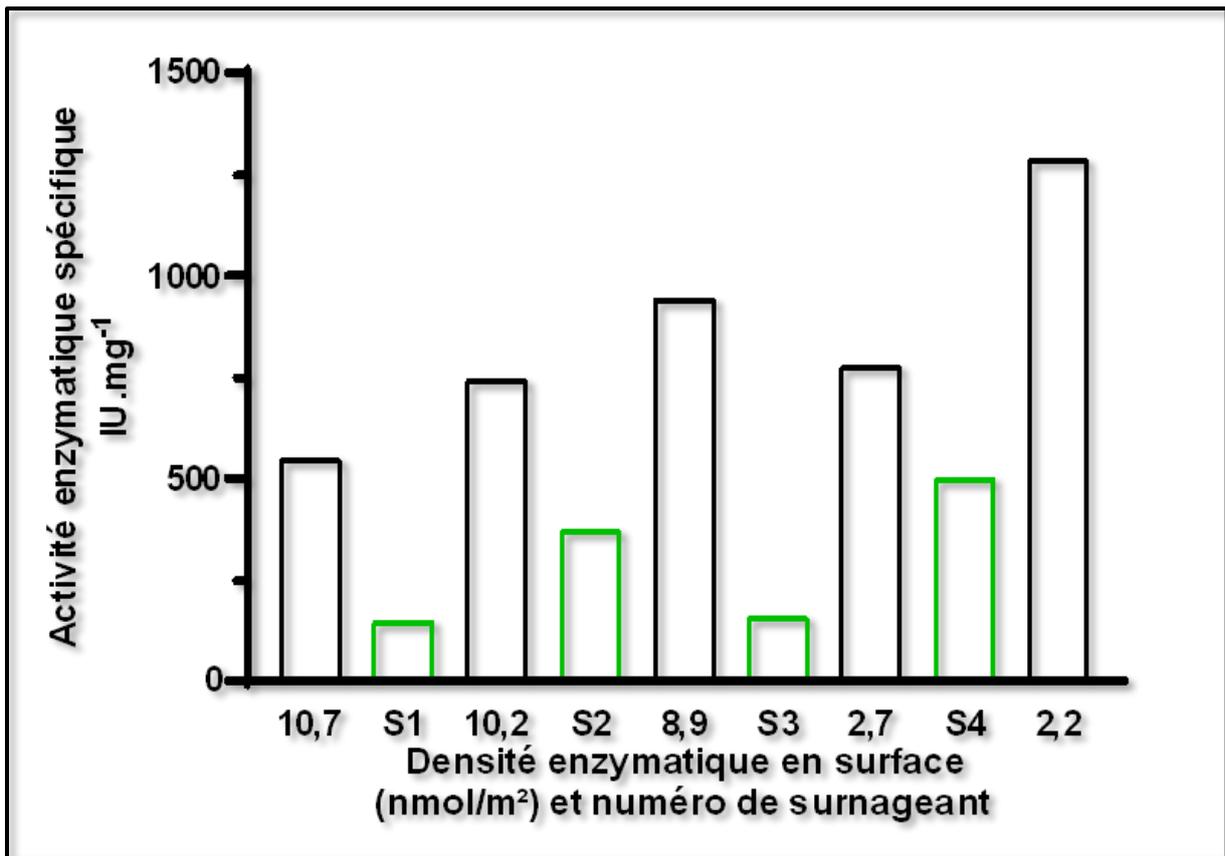


Figure 92 : Etude d'activité enzymatique d'une surface greffée PI avec différentes densités surfaciques en enzymes (en noir) ainsi que des surfactants associés (en vert). La surface a été utilisée sous sa forme relaxée pour les trois premiers cycles (noir/vert) puis avec un étirement de + 215 % pour les deux derniers cycles. Le surfactant a été changé entre chaque cycle afin d'être dans des conditions comparables.

Numéro de cinétique	1	2	3	4	5
Variation des dimensions de la surface par rapport à la première cinétique (%)	0 %	0 %	0 %	+ 215 %	+ 215 %
Densité surfacique (nmol/m ²)	10,7	10,3	9,3	2,8	2,5
Activité enzymatique spécifique (IU.mg ⁻¹)	563,2	751,2	922,7	747,6	1164,3
Variation par rapport à la première cinétique (%)	0 %	+ 33 %	+ 64 %	+ 33 %	+ 107 %
Variation par rapport à l'activité spécifique des enzymes libres (%)	- 86 %	- 81 %	- 76 %	- 81 %	- 70 %

Tableau 28 : Résultats obtenus en faisant 5 cinétiques sur une surface PI avec enzymes greffées. La surface a été utilisée pour trois cinétiques sans étirement puis a été étirée une fois pour être utilisée dans deux cinétiques supplémentaires. Ces résultats ont été obtenus en supposant que l'ensemble des enzymes relarguées dans le surnageant soient sous forme libre.

Les cinétiques ont été mises en place sur la même surface PI. La surface a été utilisée trois fois sous sa forme relaxée puis a été utilisée deux fois supplémentaires avec un taux d'étirement de + 215 %. L'analyse de l'activité des surnageants a permis d'estimer la quantité d'enzymes relarguées en solution et donc d'ajuster la densité surfacique en enzyme pour les cinétiques successives. Les données ont ensuite été assemblées dans le Tableau 28 pour faciliter la lecture.

Encore une fois, les résultats ne peuvent pas être interprétés avec certitude du fait des phénomènes non contrôlés qui ont lieu en surface. Plusieurs points intéressants peuvent cependant être notés.

Tous les calculs de densités et d'activités spécifiques ont été faits en faisant la supposition que l'ensemble des enzymes relarguées en solution l'ont été du fait de la désorption de Jo-Jo/In-NpXyn11A. Pour la première cinétique, la densité surfacique en enzymes estimée est de 10,7 nmol/m² et l'activité spécifique obtenue est 86 % inférieure à celle des enzymes libres. Comme vu dans les expériences précédentes, cette valeur est beaucoup plus faible que ce qui était attendu, à savoir environ 50 % de perte d'activité spécifique. Seules deux hypothèses ont été émises pour expliquer ce point. La première serait que la densité enzymatique en surface a

été surestimée et la seconde est qu'il est possible qu'un des paramètres de l'expérience (pH, température) ait varié et que ceci ait entraîné un léger décalage de l'activité qui pourrait expliquer une petite partie de l'écart observé ici. Dans la mesure où nous nous intéressons ici aux variations d'activités spécifiques dues à la densité de surface des enzymes, une activité de base plus basse que prévue n'est pas rédhibitoire.

En observant les cinétiques 1, 2 et 3 et en particulier leurs surnageants, il est observable que des enzymes sont ici aussi relarguées dans le surnageant bien qu'il n'y ait aucun étirement appliqué à la surface. Il est donc très probable que la quasi-totalité des enzymes relarguées dans ce cas proviennent du phénomène de désorption. Sur ces trois cinétiques, la densité de surface diminue de l'une à l'autre et l'activité enzymatique spécifique augmente dans des proportions non négligeables, plus de 30 % à chaque fois, ce qui va bien dans le sens qui était attendu.

Au moment de la cinétique 4, la surface est étirée de 215 %. L'activité du surnageant montre que beaucoup d'enzymes ont été relarguées à ce moment-là. En analysant les résultats du tableau nous voyons que la densité surfacique a diminué mais contrairement aux trois premières cinétiques l'activité spécifique a diminué. Ce point est très intéressant car il vient appuyer les hypothèses émises plus tôt. Dans le cas où les enzymes relarguées proviendraient de la désorption, les résultats seraient en ligne avec les trois premières cinétiques. Une diminution de la densité surfacique aurait provoqué une hausse de l'activité spécifique. Dans le cas où les enzymes relarguées seraient en fait sur des charges, l'estimation de leur quantité en solution serait largement sous-estimée. En conséquence, la densité surfacique en enzymes serait largement surestimée à l'inverse de l'activité spécifique.

L'analyse de la cinétique 5 vient corroborer ce point. L'étirement de la surface n'est pas modifié mais les enzymes relarguées sont prises en compte. Comme il n'y a pas eu d'étirement, nous nous attendons à ce que la densité surfacique diminue et que l'activité spécifique augmente. Cette projection est bien vérifiée par l'expérience.

Il est donc très probable que le relargage de l'enzyme en solution se produise par désorption en l'absence d'étirement de la surface alors qu'en cas d'étirement, il s'agirait de désorption et de relargage de charges en solution.

Comme précédemment, le lien entre densité enzymatique de surface et activité spécifique a été évalué (Figure 93).

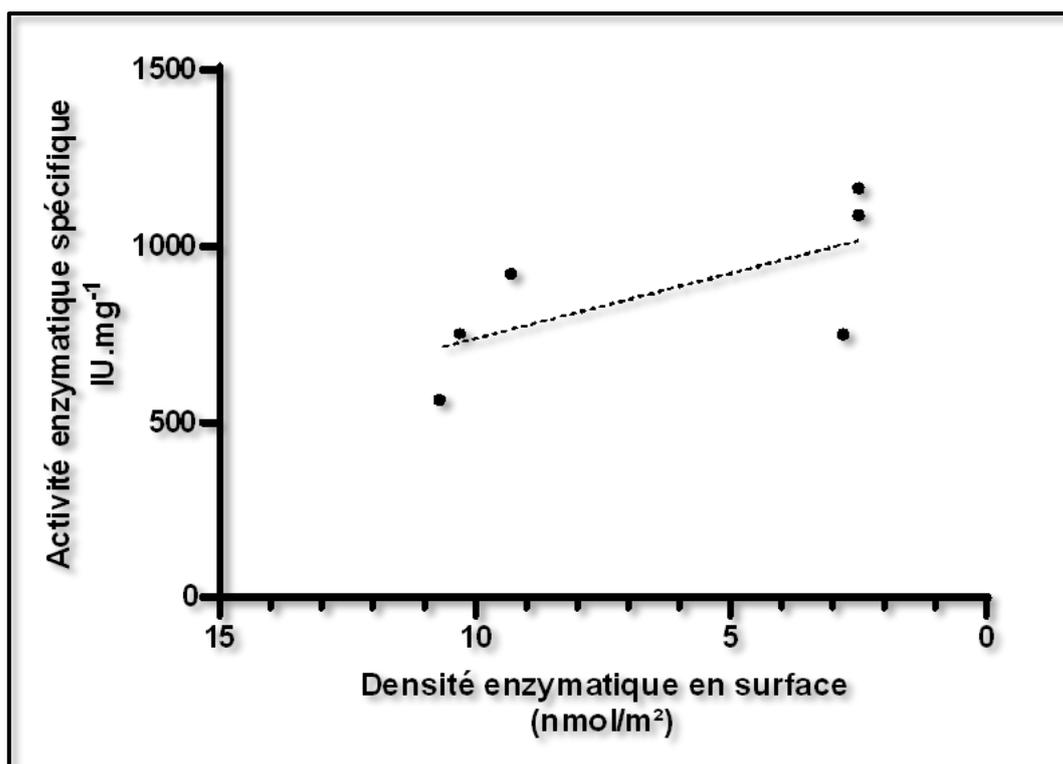


Figure 93 : Activités spécifiques des enzymes In-NpXyn11A en fonction de leur densité surfacique sur une surface PI. Ces résultats sont obtenus en maintenant l'état relaxé de la surface pendant trois cinétiques puis en appliquant un étirement constant pour trois cinétiques supplémentaires.

Comme indiqué dans la mesure des activités spécifiques faite plus haut (Figure 92), en l'absence d'étirement, l'activité spécifique semble être en hausse quand la densité enzymatique en surface diminue. L'étirement induit quant à lui des phénomènes non contrôlés qui donnent des résultats non interprétables.

IV- Conclusion des expériences sur surface polyisoprène

De nombreuses études cinétiques ont été mises en place pour identifier les variations d'activité enzymatique spécifique dans plusieurs conditions. La présence de charges en surface complique beaucoup les interprétations mais il semble que plusieurs tendances puissent être extraites :

Des enzymes sont relarguées en solution à chaque utilisation de la surface. Il semble que deux phénomènes expliquent ce relargage d'enzymes en solution à savoir, la désorption des complexes Jo-Jo/InNpXyn et le relargage des charges ayant des enzymes greffées en surface. Le premier phénomène semble être le seul observé en l'absence d'étirement de la surface alors que le second semble prépondérant quand la surface est étirée, en particulier pour les étirements forts. Il est aussi possible que des enzymes perdent leur conformation ainsi que leur activité du

fait des contraintes appliquées en surface qui les mettraient en contact avec la surface élastomère. Ce phénomène n'a pas pu être isolé et n'est pas rédhibitoire car des activités enzymatiques ont pu être observées dans la totalité des cinétiques ce qui signifie qu'il n'y a jamais eu de situation où la totalité des enzymes ont été relarguées en solution ou inactivées.

Bien que la surface PI ait été la plus utilisée dans le cadre de ce projet, il semble qu'elle ne soit pas la surface idéale pour ce type d'étude. Il sera intéressant de croiser les résultats obtenus ici avec ceux obtenus sur d'autres surfaces.

c) Mesure d'activité des enzymes immobilisées sur des surfaces élastomères à base de polydiméthylsiloxane (PDMS) en fonction de leur densité surfacique

I- *Cinétiques successives sur une surface PDMS avec enzymes greffées en appliquant un gradient d'étirement à chaque cinétique*

Deux expériences supplémentaires ont été mises en place sur des films PDMS greffés. La première expérience a consisté à faire différentes cinétiques en appliquant un gradient d'étirement à la surface (Figure 94 et Tableau 29).

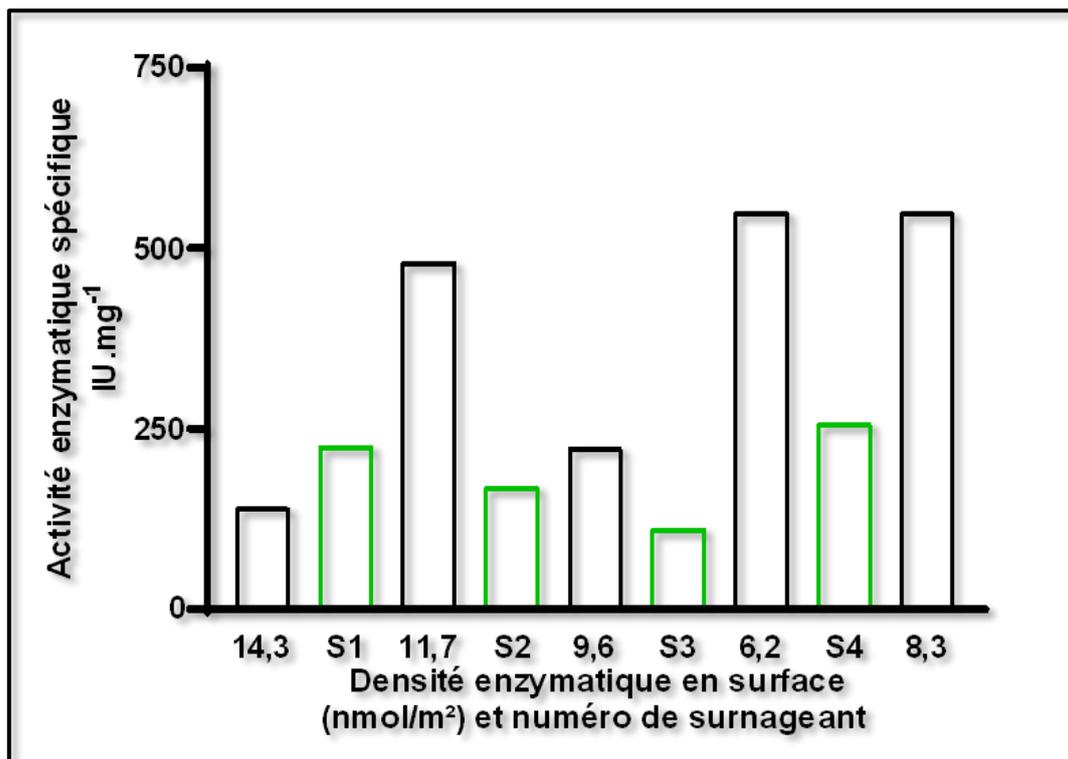


Figure 94 : Etude d'activité enzymatique d'une surface greffée PDMS avec différentes densités surfaciques en enzymes (en noir) ainsi que des surnageants associés (en vert). Un gradient d'étirement a été appliqué à la surface d'un cycle (noir/vert) à l'autre pour les quatre premières cinétiques puis la surface a été relaxée pour faire la dernière cinétique. Le surnageant est changé après chaque cycle.

Numéro de cinétique	1	2	3	4	5
Variation des dimensions de la surface par rapport à la première cinétique (%)	0 %	+ 15 %	+ 34 %	+ 101 %	+ 41 %
Densité surfacique (nmol/m ²)	14,3	11,7	9,6	6,2	8,3
Activité enzymatique spécifique (IU.mg ⁻¹)	140,6	480,9	224,4	551,9	550,4
Variation par rapport à la première cinétique (%)	0%	+ 242 %	+ 60 %	+ 293 %	+ 292 %
Variation pas rapport à l'activité spécifique des enzymes libres (%)	- 96 %	- 88 %	- 94 %	- 86 %	- 86 %

Tableau 29 : Résultats obtenus en faisant des mesures d'activités enzymatiques sur des surfaces PDMS en appliquant un gradient d'étirement. Résultats obtenus en faisant l'estimation que toutes les enzymes relarguées dans le surnageant étaient sous forme libre, impliquant que leur activité spécifique est de 3 917 IU.mg⁻¹.

Différentes cinétiques ont été mises en place sur la même surface PDMS avec des taux d'étirement de la surface croissants (Figure 94). L'analyse de l'activité des surnageants a permis d'estimer la quantité d'enzymes relarguées en solution et donc d'ajuster la densité surfacique en enzyme pour les cinétiques successives. Les données ont ensuite été assemblées dans le (Tableau 29) pour faciliter la lecture.

Sur les quatre premières cinétiques, la surface est étirée graduellement alors que le passage à la cinquième cinétique a été fait en relaxant la surface. Bien que les densités surfaciques en enzymes ne soient pas très élevées, 14,3 nmol/m² au plus haut, l'activité spécifique des enzymes greffées est très faible en comparaison de l'activité spécifique des enzymes libres en solution. Comme vu sur la surface polyisoprène ((III- page 201), il est possible que cette très faible activité spécifique provienne d'une erreur de manipulation entraînant une variation des conditions de pH ou, moins probable, de température qui aurait eu un fort impact sur l'activité spécifique des enzymes. Il est aussi possible que la quantification des enzymes en surface soit surestimée auquel cas les calculs d'activités spécifiques seraient faux. Enfin, la surface ici est un élastomère de PDMS qui a donc une chimie et une potentielle charge électrostatique très

différente des surfaces PI et PB, il est donc possible que ceci ait un impact, non identifié, sur le comportement des enzymes greffées en surface.

Il est difficile d'extraire des tendances des résultats obtenus ici. La représentation graphique de l'activité spécifique en fonction de la densité des enzymes en surface donne des résultats très aléatoires et n'a donc pas été utilisée ici. Il est possible que les phénomènes non contrôlés observés sur les surfaces PI soient aussi présents ici. Au vu de la quantité de charges en surface (Figure 49), le relargage en solution d'enzymes greffées sur des charges devrait être beaucoup moins important que ce qui a été vu précédemment.

II- *Cinétiques successives sur une surface PDMS avec enzymes greffées en alternant étirement et relaxation de la surface*

Aucune conclusion n'a pu être tirée de l'expérience précédente car les résultats étaient trop variables. Il a donc été décidé d'effectuer une seconde expérience en alternant des cinétiques avec surface étirée puis relaxée. (Figure 95 et Tableau 30).

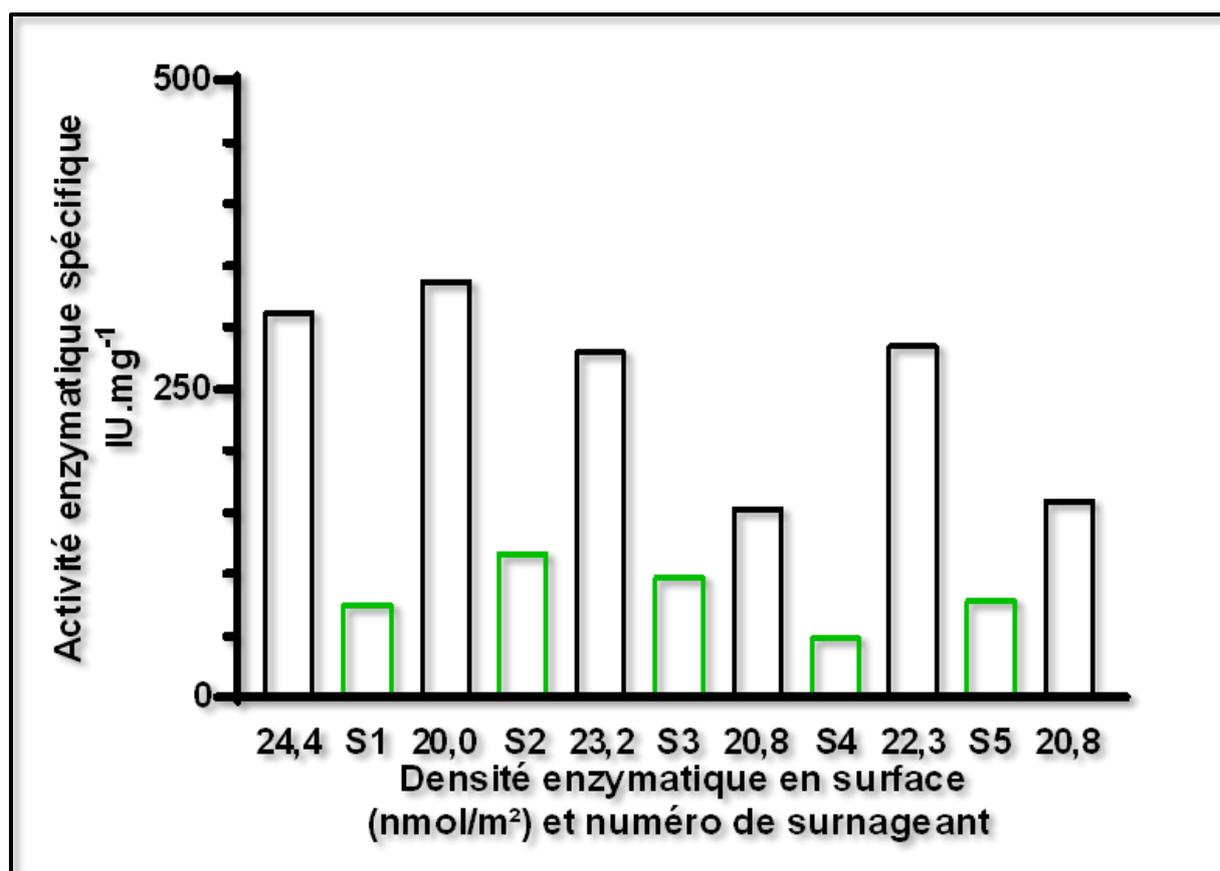


Figure 95 : Etude d'activité enzymatique d'une surface greffée PDMS avec différentes densités surfaciques en enzymes (en noir) ainsi que des surnageants associés (en vert). La surface a été successivement étirée et relaxée d'une cinétique à l'autre. Le surnageant est changé après chaque cycle (noir/vert).

Numéro de cinétique	1	2	3	4	5	6
Variation des dimensions de la surface par rapport à la première cinétique (%)	0 %	+ 20 %	0 %	+ 9 %	0 %	+ 5 %
Densité surfacique (nmol/m ²)	24,4	19,9	23,2	20,8	22,3	20,8
Activité enzymatique spécifique (IU.mg ⁻¹)	312,7	338,1	281,0	154,3	285,7	160,5
Variation par rapport à la première cinétique (%)	0 %	+ 8 %	- 10 %	- 51 %	- 9 %	- 49 %
Variation pas rapport à l'activité spécifique des enzymes libres (%)	- 92 %	- 91 %	- 93 %	- 96 %	- 93 %	- 96 %

Tableau 30 : Résultats obtenus en faisant des mesures d'activités enzymatiques sur des surfaces PDMS en appliquant une alternance d'étirement. Résultats obtenus en faisant l'estimation que toutes les enzymes relarguées dans le surnageant étaient sous forme libre, impliquant que leur activité spécifique est de 3 917 IU.mg⁻¹.

Les cinétiques ont été mises en place sur la même surface PDMS en alternant successivement étirement et relaxation de la surface. L'analyse de l'activité des surnageants a permis d'estimer la quantité d'enzymes relarguées en solution et donc d'ajuster la densité surfacique en enzyme pour les cinétiques successives. Les données ont ensuite été assemblées dans le Tableau 30 pour faciliter la lecture.

En analysant les données du tableau il est notable que la densité surfacique en enzymes est maximale (surface saturée) et que les étirements appliqués sont beaucoup plus faibles qu'anticipé, car le volume à injecter dans l'outil d'étirement (I.B.2, page 86) a été sous-estimé, avec un étirement maximal de la surface de 20 %, ce qui est faible au vu des étirements précédents qui ont pu être supérieurs à 200 %. La faiblesse des étirements est due à des difficultés pour anticiper la volume d'eau à injecter dans le système d'étirement pour atteindre un taux d'étirement donné. Ce système pourrait être optimisé avec quelques manipulations de développement simples.

La cinétique 1 donne une activité spécifique des enzymes greffées inférieure à 92 % par rapport aux enzymes libres. Aucune donnée ne permet de valider cette activité spécifique mais au vu des résultats précédents, une diminution d'activité spécifique de 80 % ou plus était attendue.

Les densités surfaciques étant très élevées et les étirements mis en place assez faibles, les densités surfaciques ne varient que très peu d'une manipulation à l'autre. La quantité d'enzymes relarguées en solution est similaire à ce qui avait été observé dans le cas de surfaces PI greffées avec une densité surfacique d'une dizaine de nmol/m². En conséquence, la quantité d'enzymes relarguées en solution par rapport à leur densité surfacique est plus faible qu'auparavant, ce qui explique que ce phénomène a moins d'impact sur les résultats que ce qui avait été observé plus tôt.

Au vu des très faibles variations d'activités spécifiques et de densités enzymatiques en surface, les résultats observés ne présentent aucune variation significative et ne peuvent donc pas être interprétés avec certitudes. Ceci met en évidence que les cinétiques doivent être mises en place sur des surfaces ayant des densités enzymatiques en surface permettant d'observer des variations significatives. Une autre solution serait d'utiliser des surfaces avec des densités très élevée comme ici, mais d'appliquer des taux d'étirements de 200 % et plus pour atteindre des densités surfaciques exploitables.

d) Mesure d'activité des enzymes immobilisées sur des surfaces élastomères à base de polydiméthylsiloxane renforcé avec des fibres de polyester (PDMSr) en fonction de leur densité surfacique

La dernière surface utilisée est l'élastomère PDMSr. Du fait du renfort en polyester dans sa matrice, la surface ne peut pas être étirée de façon significative. L'utilisation de cette surface est cependant très intéressante car elle ne présente aucune charge en surface. Ceci permet d'isoler les phénomènes non contrôlés en surface. La surface ne pouvant pas être étirée, il est très peu probable que des enzymes soient forcées par les contraintes mécaniques d'entrer en contact avec la surface, ce qui pourrait leur faire perdre leur activité. La surface n'ayant pas de charges en surface, il n'est pas possible que des enzymes soient relarguées dans le surnageant en étant greffées sur des charges.

Ainsi, les enzymes relarguées dans le surnageant proviendront de leur désorption sous forme Jo-Jo/InNpXyn11A, ce qui permettra de calculer leur concentration avec plus de certitude (Figure 96 et Tableau 31).

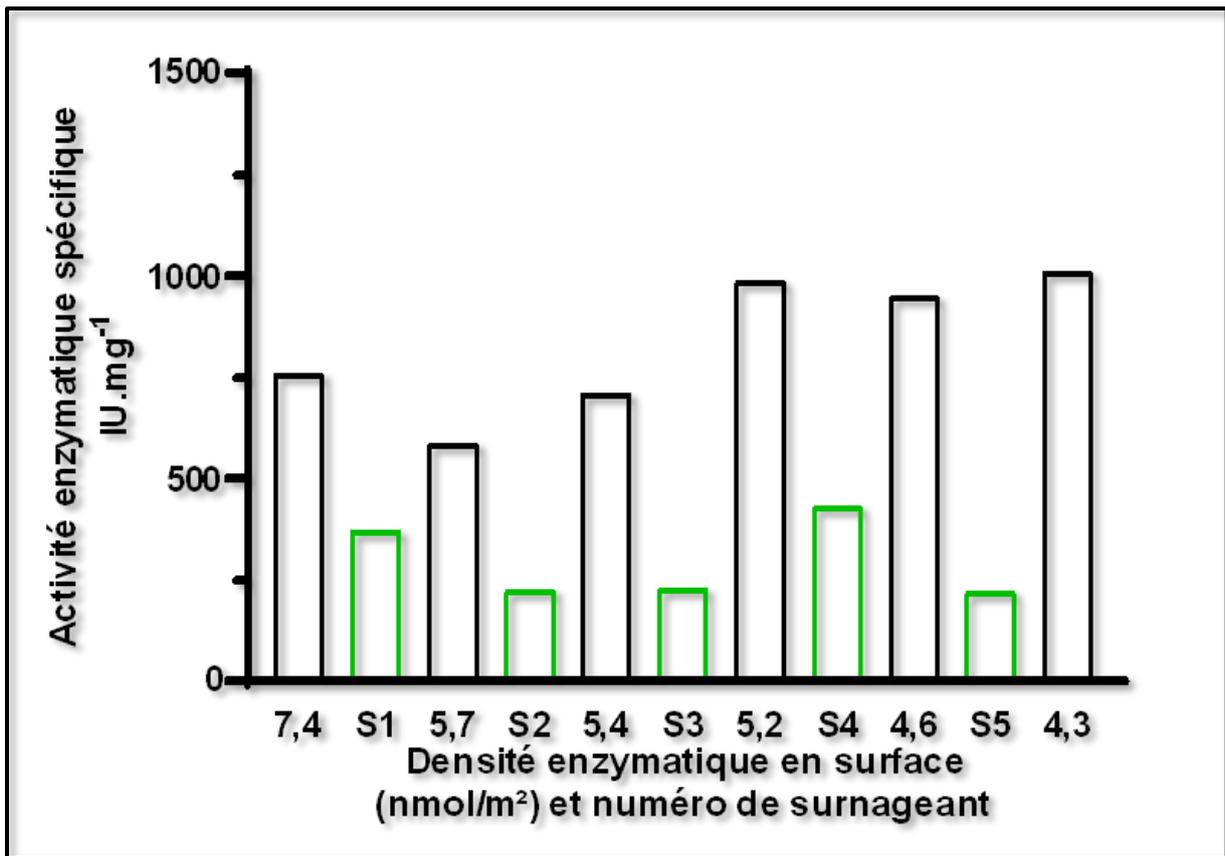


Figure 96 : Etude d'activité enzymatique d'une surface greffée PDMSr avec différentes densités surfaciques en enzymes (en noir) ainsi que des surnageants associés (en vert). Un étirement de la surface inférieur à 20 % a été appliqué à la surface à partir de la seconde cinétique. Le surnageant est changé après chaque cycle (noir/vert).

Numéro de cinétique	1	2	3	4	5	6
Variation des dimensions de la surface par rapport à la première cinétique (%)	0 %	+ 18 %	+ 18 %	+ 14 %	+ 14 %	+ 16 %
Densité surfacique (nmol/m ²)	7,4	5,7	5,4	5,2	4,6	4,3
Activité enzymatique spécifique (IU.mg ⁻¹)	760,1	587,0	711,7	988,6	948,3	1010,4
Variation par rapport à la première cinétique (%)	0 %	- 23 %	- 6 %	+ 30 %	+ 25 %	+ 33 %
Variation pas rapport à l'activité spécifique des enzymes libres (%)	- 81 %	- 85 %	- 82 %	- 75 %	- 76 %	- 74 %

Tableau 31 : Résultats obtenus en faisant des mesures d'activités enzymatiques sur des surfaces PDMSr en appliquant un faible étirement. La supposition a été faite que la totalité des enzymes relarguées dans le surnageant sont sous forme libre et ont donc une activité spécifique de 3 917 IU.mg⁻¹.

Les cinétiques ont été mises en place sur la même surface PDMSr appliquant un étirement très faible (+ 18 % au maximum). L'analyse de l'activité des surnageants a permis d'estimer la quantité d'enzymes relarguées en solution et donc d'ajuster la densité surfacique en enzyme pour les cinétiques successives. Les données ont ensuite été assemblées dans le Tableau 31 pour faciliter la lecture.

Comme attendu, on observe qu'à chaque cinétique, des enzymes sont relarguées dans le surnageant. Il ne s'agit ici que d'enzymes relargués par désorption ce qui permet de les quantifier avec une certaine précision car nous connaissons leur activité enzymatique spécifique (3 917 IU.mg⁻¹).

En observant les résultats de la première cinétique, nous voyons que pour une densité surfacique en enzymes estimée à 7,4 nmol/m², l'activité spécifique est 81 % inférieure à celle des enzymes libres en solution. Cette valeur d'activité spécifique est très faible comparée à une perte d'activité attendue aux alentours de 50 %. Il est probable que des enzymes aient été relarguées dans le surnageant au moment de la quantification des enzymes en surface. Celles-ci n'étant pas prises en compte, il est possible que la densité obtenue soit faussée. Ce point pourrait

expliquer la très faible activité observée dès la première cinétique ainsi, qu'en partie, les faibles activités observées sur les autres cinétiques.

Une chute d'activité spécifique est observable entre la première et la seconde cinétique alors qu'un léger étirement a été appliqué sur la surface. Ce phénomène a été observé plusieurs fois dans les différentes cinétiques présentées plus haut et va dans le sens de l'hypothèse émise plus haut à savoir que l'étirement peut forcer la mise en contact entre des enzymes et la surface ce qui peut potentiellement les inactiver.

Il est intéressant d'observer, en particulier pour les cinétiques 2 à 6, le graphique représentant l'activité enzymatique spécifique en fonction de la densité enzymatique en surface (Figure 97).

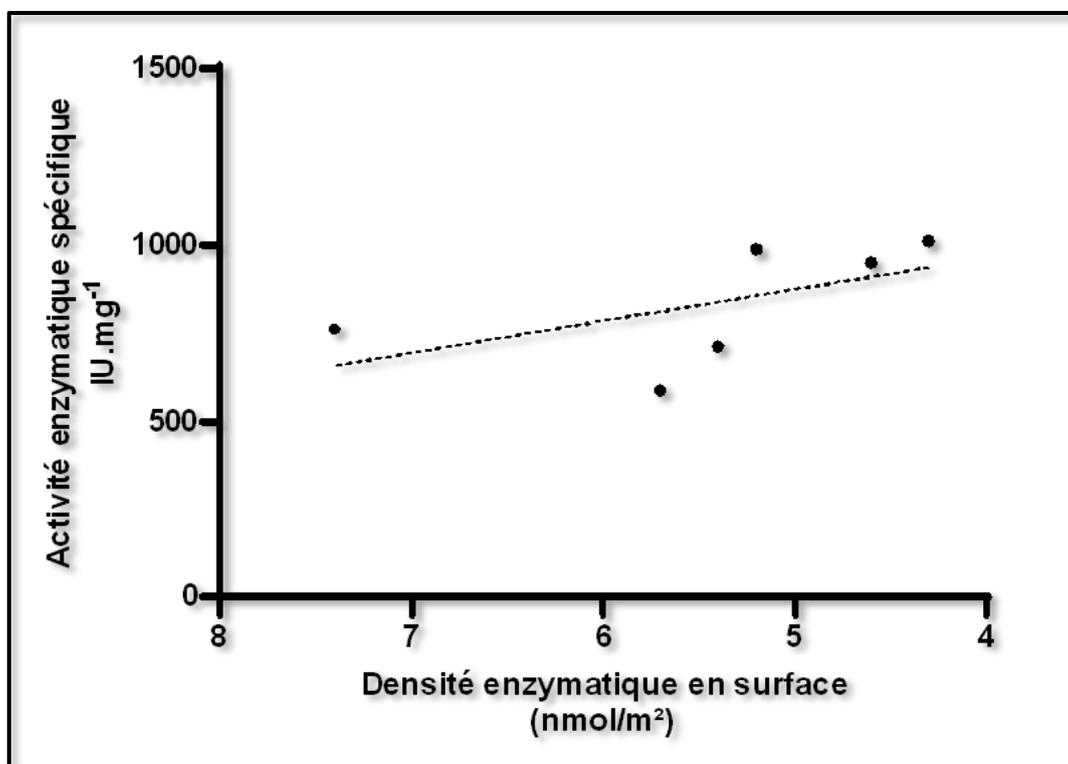


Figure 97 : Activités spécifiques des enzymes *In-NpXyn11A* en fonction de leur densité surfacique sur une surface PDMSr. Ce résultat est obtenu en faisant plusieurs cinétiques sur une même surface en appliquant un étirement inférieur à 20 %.

Il est à noter ici que quand aucun étirement n'est appliqué à la surface (points de 5,7 à 4,3 nmol/m² ci-dessus), la densité continue à diminuer du fait du relargage des enzymes en solution par désorption et que l'activité enzymatique spécifique suit une tendance haussière dans le même temps. Il est probable, mais non vérifié, que la tendance haussière de l'activité

spécifique soit respectée du fait que les enzymes ne soient relarguées en solution que par désorption, auquel cas, la quantification des enzymes relarguées en solution serait juste.

C. Interprétation des résultats du chapitre

Plusieurs points très importants ont été mis en évidence dans ce chapitre. La méthode de greffage des enzymes a pu être validée. Nous savons désormais que le greffage n'a pas d'influence sur le comportement intrinsèque des enzymes car leur activité spécifique sur le X₃.pNP n'est pas modifiée. Il a aussi été mis en évidence que la distance moyenne entre enzymes n'a aucune influence sur le comportement des enzymes car les activités spécifiques sont restées identiques sur le X₃.pNP. En conséquence, le seul facteur ayant un impact sur l'activité spécifique des enzymes sur le substrat macromoléculaire WAX est de type stérique. Quand les enzymes sont proches les unes des autres, l'accessibilité au substrat est modifiée, mais le comportement intrinsèque des enzymes est strictement identique à celui des enzymes libres en solution.

L'étude de l'activité des enzymes greffées sur différentes surfaces envers le substrat macromoléculaire WAX a permis de mettre en évidence plusieurs points qui pourront être utilisés dans une potentielle poursuite du projet (Tableau 32).

Surface élastomère	Phénomène incontrôlé probablement présent	Conséquences	Avantages
PB	-Relargage Jo-Jo/In-NpXyn11A -Perte d'activité d'enzymes suite à l'étirement	Bons résultats mais la production des surfaces peut être complexe	-Formulation contrôlée et adaptable
PI	-Relargage Jo-Jo/In-NpXyn11A -Relargage de charges -Perte d'activité d'enzymes suite à l'étirement	Accumulation d'effets incontrôlés entraînant une grande difficulté pour exploiter les résultats	-Très peu cher -Très étirable -Simple à manipuler
PDMS	-Relargage Jo-Jo/In-NpXyn11A -Relargage de charges (très faible) -Perte d'activité d'enzymes suite à l'étirement	Accumulation d'effets incontrôlés entraînant une grande difficulté pour exploiter les résultats.	-Peu cher -Bonne étirabilité -Très simple à manipuler
PDMSr	-Relargage Jo-Jo/In-NpXyn11A	Simple à étudier mais impossible de faire varier la densité surfacique en l'absence de relargage d'enzymes	-Pas de charges en surface -Très simple à manipuler

Tableau 32 : Récapitulatif des différents phénomènes non-contrôlés suggérés dans ce chapitre en fonction des surfaces étudiées.

L'utilisation d'une trop large concentration de Jo_c au moment du greffage de celle-ci a probablement entraîné la formation de multicouches en surface ce qui a provoqué des phénomènes de désorption d'assemblages Jo-Jo/InNpXyn11A en solution. Ce facteur a eu un fort impact négatif lors de l'analyse des résultats. Il pourrait être très intéressant d'effectuer des greffages de Jo_c en surface en minimisant au maximum la quantité de protéines utilisées afin de limiter, voire éliminer, les phénomènes de désorption.

Nous pouvons supposer que l'utilisation d'élastomères comportant de nombreuses charges dans leur matrice a aussi eu un impact très négatif sur les expériences mises en place. Le potentiel relargage de charges en solution avec des enzymes greffées dessus fausse fortement les résultats obtenus. Ce phénomène, contrairement au phénomène de désorption des assemblages Jo-Jo/InNpXyn11A, n'a pas pu être mis en évidence avec certitude. Il pourrait être intéressant d'utiliser des surfaces élastomères non renforcées, étirables, et ne comportant pas de charges en surface pour effectuer de nouvelles expériences. Ceci permettrait de s'assurer que le phénomène de relargage de charges en solution n'ait pas lieu. Il est très probable qu'en faisant cela, les

résultats obtenus soient significativement différents de ceux décrits dans ce chapitre pour les surfaces PI et PDMS.

Les très faibles activités spécifiques initiales observées pour les enzymes greffées en comparaison des enzymes libres ont été une surprise. Il pourrait être intéressant de produire une figure qui mette en lien l'activité spécifique sur le WAX en fonction de la densité de greffage en utilisant les surfaces une fois chacune. Cela demanderait de produire beaucoup de surfaces mais pourrait donner beaucoup d'informations sur l'activité spécifique en fonction de la densité de surface en pouvant faire abstraction des phénomènes de relargage d'enzymes en solution.

Au moment du premier étirement, les activités enzymatiques spécifiques ont fortement chuté. Il est possible que certaines enzymes entrent en contact avec la surface du fait des contraintes mécaniques et qu'elles perdent leur activité. Ce phénomène n'a cependant pas pu être mis en évidence. Il pourrait être intéressant d'utiliser un polyéthylène glycol (PEG), très souvent utilisé comme espaceur dans la littérature. Si ce PEG était fonctionnalisé maléimide à une extrémité et thiol à l'autre, il pourrait potentiellement être inséré entre le maléimide en surface et J_0 ce qui pourrait permettre d'éviter les phénomènes de perte d'activité du fait de l'étirement de la surface.

Du fait des paramètres indiqués ici, il est compliqué de conclure avec assurance, mais il semblerait que l'activité enzymatique spécifique sur le WAX augmente bien avec la distance entre enzymes. Il semble aussi réalisable de faire varier avec précision la densité enzymatique en surface par étirement de la surface. Les problématiques identifiées dans ce chapitre donnent des perspectives sur ce qui pourrait être mis en place pour valider totalement le système développé dans ce projet.

Conclusion et perspectives

Cette thèse a permis d'adresser de multiples problématiques dans des domaines variés, à savoir la synthèse polymère, la chimie de surface et l'enzymologie. Plusieurs innovations ont pu être mises en place mais l'objectif initial n'a pas pu être atteint en totalité. En revanche, de nombreuses problématiques ont pu être mises en évidence ce qui ouvre la voie à des recherches complémentaires tant d'un point de vue fondamental qu'applicatif.

La synthèse d'une matrice élastomère à base de polybutadiène a pu être faite mais nous avons été confrontés à des problèmes de répétabilité de la synthèse. Le facteur limitant n'a pas pu être identifié clairement malgré plusieurs expériences dédiées. Si ce type de matrice élastomère venait à être utilisée dans des projets ultérieurs, il serait nécessaire de passer par une étape de développement du protocole de synthèse afin d'identifier le facteur limitant la répétabilité. La matrice élastomère synthétisée a pu être utilisée pour plusieurs expériences lors de ce projet. Il a été mis en évidence que les fonctions maléimides générées en long de chaîne sur le premier précurseur ont pu être utilisées pour réticuler la matrice par réaction Diels-Alder en présence du second précurseur qui était fonctionnalisé furane en bout de chaîne. En revanche, il a été démontré que les fonctions maléimides en long de chaîne n'étaient pas générées en quantité suffisante pour greffer des protéines en surface. Il a donc été nécessaire de trouver une solution pour générer plus de fonctions maléimides en surface de l'élastomère.

Dans la mesure où la synthèse de surfaces élastomères à base de polybutadiène a été impossible en cours du travail, il a été décidé d'utiliser des surfaces élastomères commerciales à base de polyisoprène et de polydiméthylsiloxane. L'étude de ces différentes surfaces a permis de mettre en évidence des disparités en extrême surface. Il est apparu que les surfaces commerciales ont, exception faite de la surface élastomère à base de polydiméthylsiloxane renforcée avec des fibres de polyester, des charges en surface. Ces charges sont souvent utilisées en milieu industriel pour limiter l'adhésion des élastomères ce qui facilite leur remise en forme. La surface élastomère à base de polyisoprène présente beaucoup de charges qui viennent saturer la surface et rendre très problématique les analyses faites plus loin dans ce projet. Dans l'hypothèse d'une poursuite du projet, la surface élastomère à base de polyisoprène ne devrait plus être utilisée.

L'ensemble des surfaces élastomères utilisées dans ce projet ont donc dû être fonctionnalisées afin de disposer d'une quantité de fonctions maléimides suffisante en surface pour procéder au greffage des protéines. Idéalement, la surface devrait être saturée en protéines suite au greffage.

La méthode de fonctionnalisation de la surface se base sur un traitement plasma car cette méthode peut être appliquée de manière identique aux 4 surfaces exploitées dans ce projet. Le traitement plasma a permis de générer des radicaux libres en surface qui, une fois la surface plongée dans l'eau, ont donné des fonctions alcool. Il a ensuite été possible d'utiliser ces fonctions alcools pour fonctionnaliser la surface avec des maléimides à l'aide d'un traitement chimique. Bien que cette fonctionnalisation ait bien été validée, il n'a pas été possible de quantifier les maléimides en surface. Il a aussi été mis en évidence que les chaînes polymères qui constituent la surface élastomère ont une mobilité locale qui entraîne l'internalisation des fonctions générées en surface. Il est donc nécessaire de procéder au greffage des protéines rapidement à la suite de l'étape de fonctionnalisation.

Le greffage des enzymes en surface s'effectue en deux étapes. L'objectif a donc été de greffer dans un premier temps la protéine Jo sur la surface. La surface est ensuite mise en présence de l'enzyme chimérique In-NpXyn11A afin que l'assemblage Jo/In permette d'obtenir l'enzyme NpXyn11A greffée de façon covalente et monopoint sur la surface par le biais du complexe Jo/In qui joue le rôle d'espaceur.

Les protéines et enzymes ont toutes été produites avec des His-Tag afin de permettre leur purification par affinité sur des résines cobalt dans des colonnes. La protéine Jo a été modifiée par génie génétique pour introduire une cystéine à la suite du His-Tag. La cystéine, contenant une fonction thiol, peut réagir de façon spécifique à 20 °C avec les maléimides présentes sur la surface élastomère.

Il a été mis en évidence en étudiant les variations d'angle de contact et en corroborant les résultats avec des études d'activités enzymatiques ultérieures, que le greffage de la protéine Jo_c en surface par réaction thiol-maléimide est bien efficace et spécifique. Une étude similaire a été mise en place avec la protéine In_c, sensée s'assembler avec l'enzyme chimérique Jo-NpXyn11A, mais la spécificité du greffage n'a pas pu être mise en évidence.

Dans la mesure où le greffage des protéines en surface a pu être mis en évidence mais pas quantifié, il était difficile de connaître la quantité de protéines à mettre en présence de la surface afin de faire un greffage efficace. Il a été mis en évidence à posteriori que les quantités de protéines utilisées étaient beaucoup trop importantes et cela a posé des problèmes dans la suite

du projet. Il serait intéressant d'effectuer une manipulation permettant de déterminer la quantité de protéines optimale à utiliser pour saturer la surface en enzymes greffées tout en évitant la formation de multicouche de protéines du fait de leur adsorption non-spécifique. Le développement du greffage de In_c sur la surface pourrait aussi être intéressant car il permettrait d'avoir deux systèmes de greffage disponibles, à savoir : Surface-Jo/ $In-NpXyn11A$ et Surface- $In/Jo-NpXyn11A$. Dans la mesure où Jo_c est 37 % plus petit en masse molaire que In_c , il pourrait être intéressant de disposer de deux systèmes de greffage car les comportements ultérieurs pourraient varier. Reproduire les manipulations décrites dans ce manuscrit en ajustant les concentrations et durées d'incubation devrait permettre de répondre aux difficultés de greffage de In en surface.

Une fois le greffage de Jo_c sur la surface effectué, il a été possible de procéder au greffage de l'enzyme chimérique $In-NpXyn11A$ par assemblage Jo/In . Des études XPS et AFM ont permis d'obtenir les premiers indices que le greffage de l'enzyme était bien valide mais sans le confirmer avec certitude. Une méthode a été développée pour quantifier les enzymes en surface. Cette méthode, spéculative au départ, a pu être validée dans un second temps en corroborant plusieurs résultats. La méthode de quantification des enzymes en surface, basée sur des mesures d'activité enzymatique, a permis de mettre en évidence la validité du greffage des enzymes en surface. Il a aussi été possible, toujours grâce à cette méthode, de valider que les étapes de greffage de Jo_c et $In-NpXyn11A$ sont bien spécifiques. Un dernier point important est qu'il a été possible de déterminer les quantités optimales d'enzymes à mettre en présence de la surface pour obtenir un greffage efficace en fonction de la densité surfacique en enzymes visée. Il ne fait aucun doute que si le projet décrit ici devait être développé, l'utilisation de cette méthode serait un atout majeur. Il est aussi intéressant de noter que cette méthode pourrait s'appliquer à d'autres surfaces et d'autres enzymes à condition d'ajuster les volumes et concentrations en substrat utilisés.

L'étape suivante a consisté à développer un outil permettant de faire varier la densité surfacique en enzymes par étirement. Dans cet objectif, l'étirement se devait d'être fait de façon homogène, c'est pourquoi il a été décidé d'étirer la surface sous forme de sphère. L'outil a été développé et fiabilisé, en particulier au niveau du point d'attache de la surface, mais peut encore être optimisé. L'outil permet actuellement d'atteindre un étirement maximum de la surface aux alentours de + 200 %. Ceci permet de faire varier la densité surfacique en enzymes de façon significative mais reste un facteur limitant. Les élastomères utilisés dans ce projet peuvent être étirés de façon réversible dans des proportions plus importantes et n'ont donc pas pu être utilisés

à leur plein potentiel ici. Un autre axe de développement pourrait être de rendre l'outil plus prévisible. Il est en effet impossible, à l'heure actuelle, de prédire le volume à injecter pour atteindre un étirement donné.

La dernière partie du projet a consisté à étudier les variations d'activité enzymatique en fonction de la distance entre les enzymes. Pour ce faire, un système utilisant un réacteur aux dimensions de l'outil d'étirement a été développé. Les protocoles permettant les mesures d'activités enzymatiques ont aussi été adaptés afin d'être en ligne avec les volumes et les quantités d'enzymes utilisées dans ces expériences. Il a donc été possible de mettre en place de nombreuses manipulations où l'activité des enzymes greffées sur les surfaces étudiées a été mesurée en fonction du taux d'étirement, et en conséquence, de la densité enzymatique en surface.

Les premières manipulations ont été mises en place avec du X₃.pNP. Ce petit substrat diffuse facilement et est théoriquement accessible à tout instant par les enzymes greffées en surface. Il a été mis en évidence que l'activité spécifique des enzymes immobilisées en surface est la même que celle des enzymes libres en solution sur ce substrat. Ceci nous a aussi permis de mettre en évidence que la méthode de greffage des enzymes mise en place n'a aucun impact sur leur comportement intrinsèque. Le comportement des enzymes immobilisées est donc parfaitement comparable à celui des enzymes libres. Le seul facteur pouvant impacter leur comportement est leur densité surfacique.

Afin de mettre ce point en évidence, des manipulations ont été menées avec du WAX, qui est un substrat macromoléculaire qui diffuse moins facilement du fait de l'encombrement stérique. Dans ce cas, le substrat n'est donc plus accessible aux enzymes à tous temps. Les résultats de ces manipulations, en particulier pour les surfaces élastomères PB et PDMSr, vont bien dans le sens d'une augmentation significative de l'activité enzymatique spécifique quand la densité enzymatique en surface diminue. Les résultats sont à nuancer, en particulier pour les surfaces élastomères PI et PDMS, car un fort relargage d'enzymes en solution a été observé entre les différents étirements mis en place. Les résultats ont été difficilement exploitables du fait d'une forte variabilité. Plusieurs éléments ont permis de mettre en évidence que la forte variabilité des résultats provient de phénomènes non contrôlés au moment des études d'activités enzymatiques.

Il apparaît très probable que les enzymes sont relarguées en solution pour partie du fait de la formation d'une multicouche de Jo_c sur la surface sur laquelle les enzymes In-NpXyn11A ont

été greffées ce qui donne lieu au relargage d'assemblages Jo-Jo/In-NpXyn11A en solution. Cette partie du relargage a pu être mise en évidence par dépôt du surnageant sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Il est très probable que la formation d'une multicouche de Jo_c provienne d'une utilisation de celle-ci dans des quantités beaucoup trop importantes au moment du greffage. Si le projet devait être prolongé, il serait très important de reprendre cette étape du greffage afin d'ajuster les quantités à utiliser. Une expérience préliminaire a été faite dans ce sens et a montré que le greffage pouvait être fait en utilisant des concentrations de Jo_c 50 fois plus faibles que ce qui a été fait dans le projet décrit ici. Une étude regroupant une large gamme de greffages avec des concentrations de Jo dans le surnageant devrait permettre de répondre à cette problématique. Il pourrait aussi être intéressant de décrocher l'ensemble des protéines greffées en surface pour pouvoir les quantifier et donc optimiser le protocole de greffage. Une petite molécule contenant un thiol et utilisée en très large excès pourrait permettre le décrochage de la protéine Jo par remplacement de celle-ci en surface. Il a en effet été précisé dans ce manuscrit que la substitution d'un élément greffé en surface via une liaison thiol-maléimide est possible en présence de thiols en solution.

Une autre partie du relargage des enzymes en solution pourrait provenir du relargage de charges en solutions du fait de la contrainte mécanique. Cette hypothèse n'a pas pu être prouvée mais semble tout de même probable. Dans le cas où des enzymes seraient greffées sur les charges, leur relargage en solution rendrait très problématique leur quantification du fait de leur proximité les unes par rapport aux autres maintenue. Nous avons mis en évidence que des charges sont relarguées avec l'étirement des surfaces et, d'après la littérature, il semble possible que nos enzymes se greffent aussi sur les charges en surface. Il est donc probable que ce phénomène ait bien lieu et fausse grandement les résultats obtenus. Dans l'avenir, il semble primordial d'utiliser des surfaces n'ayant pas de charges en surface afin d'obtenir des résultats plus fiables.

Un dernier phénomène non contrôlé pourrait être la perte de conformation de certaines enzymes du fait de la contrainte mécanique au moment de l'étirement de la surface. Comme référencé dans la littérature, il est impossible de prédire de façon précise le mouvement des chaînes polymères individuelles au moment de l'étirement de la surface. Il est possible qu'au moment de l'étirement certaines enzymes soient forcées d'entrer en contact avec la surface ce qui pourrait leur faire perdre leur activité et donc fausser les résultats finaux. Ce phénomène serait très problématique dans un possible prolongement du projet. Utiliser des espaceurs

supplémentaires pourrait être une solution pour éviter ce problème mais cela entraînerait une augmentation de la complexité du système.

En conclusion, nous avons développé une méthode qui permet de greffer des enzymes sur des surfaces élastomères avec une densité surfacique contrôlée. Le greffage a été mis en place sur 4 surfaces élastomères mais pourrait très probablement être étendu à une gamme de surfaces, polymères ou non, beaucoup plus large. Il semblerait aussi que ce système puisse être adapté à une gamme d'enzymes beaucoup plus large à condition de pouvoir produire l'enzyme chimérique associée au fragment In. Ce projet a permis de poser les premiers jalons pour un système qui, s'il venait à être perfectionné, permettrait d'étudier l'effet de la distance entre les enzymes sur leur activité spécifique vis-à-vis de substrats macromoléculaires à l'aide d'un système d'étirement de surface innovant.

La méthode développée ici pourrait être utilisée pour étudier certaines problématiques. Le comportement des enzymes aux interfaces solide/liquide est un paramètre important à étudier, notamment dans les applications industrielles. Il pourrait être intéressant d'utiliser la méthode d'immobilisation développée ici sur une large variété de surfaces pour étudier l'impact de la surface sur le comportement des enzymes. L'utilisation d'espaceurs plus ou moins longs pourrait aussi entrer dans cette étude.

Le comportement du WAX à l'approche des surfaces serait aussi intéressant à connaître. Est-ce que ce substrat macromoléculaire se déplie ou s'arrange en pelote en solution ? Est-ce que cette conformation est modifiée à l'approche d'une surface ? Les greffage d'enzymes sur des surfaces poreuses avec des tailles de pores contrôlées, proches des dimensions du WAX, pourrait peut-être permettre d'obtenir plus d'informations sur le comportement du WAX en solution.

La perspective qui semble la plus prometteuse sera d'utiliser le système développé dans ce projet avec plusieurs types d'enzymes. Il pourrait être possible de greffer la xylanase de ce projet avec une cellulase sur une même surface, le tout avec des densités surfaciques contrôlées. Ce système pourrait être étudié sur un substrat, plus proche de la complexité de la biomasse, combinant de la cellulose et du xylane. Un tel système permettrait d'étudier l'effet de la distance entre enzymes sur leur comportement intrinsèque, à l'exemple de notre travail, ainsi que sur l'efficacité d'une potentielle cascade enzymatique. L'activité d'une enzyme pourrait faciliter l'accès au substrat de l'autre et ainsi, le système développé permettrait d'observer des synergies.

A terme, ce type de développement pourrait permettre de créer des systèmes hautement complexes qui permettraient de valoriser des substrats difficilement exploitables avec les connaissances actuelles.

Bibliographie

- (1) Rose, I. A.; Hanson, K. R. Enzyme Reaction Stereospecificity: A Critical Review. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1972**, *1* (1), 33–57. <https://doi.org/10.3109/10409237209102543>.
- (2) Wu, S.; Snajdrova, R.; Moore, J. C.; Baldenius, K.; Bornscheuer, U. T. Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60* (1), 88–119. <https://doi.org/10.1002/anie.202006648>.
- (3) Rajendran, D. S.; Venkataraman, S.; Kumar, P. S.; Rangasamy, G.; Bhattacharya, T.; Nguyen Vo, D.-V.; Vaithyanathan, V. K.; Cabana, H.; Kumar, V. V. Coimmobilized Enzymes as Versatile Biocatalytic Tools for Biomass Valorization and Remediation of Environmental Contaminants - A Review. *Environ. Res.* **2022**, *214*, 114012. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114012>.
- (4) Tournier, V.; Topham, C. M.; Gilles, A.; David, B.; Folgoas, C.; Moya-Leclair, E.; Kamionka, E.; Desrousseaux, M.-L.; Texier, H.; Gavalda, S.; Cot, M.; Guémard, E.; Dalibey, M.; Nomme, J.; Cioci, G.; Barbe, S.; Chateau, M.; André, I.; Duquesne, S.; Marty, A. An Engineered PET Depolymerase to Break down and Recycle Plastic Bottles. *Nature* **2020**, *580* (7802), 216–219. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4>.
- (5) Moraïs, S.; Morag, E.; Barak, Y.; Goldman, D.; Hadar, Y.; Lamed, R.; Shoham, Y.; Wilson, D. B.; Bayer, E. A. Deconstruction of Lignocellulose into Soluble Sugars by Native and Designer Cellulosomes. *mBio* **2012**, *3* (6). <https://doi.org/10.1128/mBio.00508-12>.
- (6) Moraïs, S.; Barak, Y.; Caspi, J.; Hadar, Y.; Lamed, R.; Shoham, Y.; Wilson, D. B.; Bayer, E. A. Cellulase-Xylanase Synergy in Designer Cellulosomes for Enhanced Degradation of a Complex Cellulosic Substrate. *mBio* **2010**, *1* (5). <https://doi.org/10.1128/mBio.00285-10>.
- (7) Montanier, C. Y.; Fanuel, M.; Rogniaux, H.; Ropartz, D.; Di Guilmi, A.-M.; Bouchoux, A. Changing Surface Grafting Density Has an Effect on the Activity of Immobilized Xylanase towards Natural Polysaccharides. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 5763. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42206-w>.
- (8) Lan, K.; Xu, Y.; Kim, H.; Ham, C.; Kelley, S. S.; Park, S. Techno-Economic Analysis of Producing Xylo-Oligosaccharides and Cellulose Microfibers from Lignocellulosic Biomass. *Bioresour. Technol.* **2021**, *340*, 125726. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125726>.
- (9) Nieto-Domínguez, M.; de Eugenio, L. I.; York-Durán, M. J.; Rodríguez-Colinas, B.; Plou, F. J.; Chenoll, E.; Pardo, E.; Codoñer, F.; Jesús Martínez, M. Prebiotic Effect of Xylooligosaccharides Produced from Birchwood Xylan by a Novel Fungal GH11 Xylanase. *Food Chem.* **2017**, *232*, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.149>.
- (10) Schroeder, M. M.; Wang, Q.; Badieyan, S.; Chen, Z.; Marsh, E. N. G. Effect of Surface Crowding and Surface Hydrophilicity on the Activity, Stability and Molecular Orientation of a Covalently Tethered Enzyme. *Langmuir* **2017**, *33* (28), 7152–7159. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00646>.
- (11) Liston, E. M. Plasma Treatment for Improved Bonding: A Review. *J. Adhes.* **1989**, *30* (1–4), 199–218. <https://doi.org/10.1080/00218468908048206>.
- (12) Artico, M.; Roux, C.; Peruch, F.; Mingotaud, A.-F.; Montanier, C. Y. Grafting of Proteins onto Polymeric Surfaces: A Synthesis and Characterization Challenge. *Biotechnol. Adv.* **2023**, *64*, 108106. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108106>.
- (13) Richbourg, N. R.; Peppas, N. A. The Swollen Polymer Network Hypothesis: Quantitative Models of Hydrogel Swelling, Stiffness, and Solute Transport. *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *105*, 101243. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2020.101243>.

- (14) Tian, Z.; Jing, Q.; Qiao, S.; You, W. Encapsulation/Capture of S-nZVI Particles by PANa-PAM Hydrogel Limits Their Leakage and Improves Cr(VI) Removal. *Process Saf. Environ. Prot.* **2023**, *172*, 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2023.01.068>.
- (15) Clegg, J. R.; Peppas, N. A. Design of Synthetic Hydrogel Compositions for Noncovalent Protein Recognition. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2023**. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c20857>.
- (16) Zhao, Y.; Ma, Y.; Xiong, Y.; Qin, T.; Zhu, Y.; Deng, H.; Qin, J.; Shi, X.; Zhang, G. Chemically Crosslinked Crystalline Thermoplastic Polyolefin Elastomer with Good Elasticity and Improved Thermo-Mechanical Properties. *Polymer* **2022**, *254*, 125075. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2022.125075>.
- (17) Haque, S. M.; Ardila-Rey, J. A.; Umar, Y.; Mas'ud, A. A.; Muhammad-Sukki, F.; Jume, B. H.; Rahman, H.; Bani, N. A. Application and Suitability of Polymeric Materials as Insulators in Electrical Equipment. *Energies* **2021**, *14* (10), 2758. <https://doi.org/10.3390/en14102758>.
- (18) Qi, Q.; Wu, Y.; Tian, M.; Liang, G.; Zhang, L.; Ma, J. Modification of Starch for High Performance Elastomer. *Polymer* **2006**, *47* (11), 3896–3903. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.03.095>.
- (19) Chen, Q.; Zhang, Z.; Huang, Y.; Zhao, H.; Chen, Z.; Gao, K.; Yue, T.; Zhang, L.; Liu, J. Structure–Mechanics Relation of Natural Rubber: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2022**, *4* (5), 3575–3586. <https://doi.org/10.1021/acsapm.2c00147>.
- (20) Berto, P.; Mehats, J.; Wirotius, A.-L.; Grelier, S.; Peruch, F. Reprocessable Covalent Elastomeric Networks from Functionalized 1,4-Cis-Polyisoprene and -Polybutadiene. *Macromolecules* **2022**, *55* (11), 4557–4567. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.1c02156>.
- (21) Yu, Z.; Zhao, Z.; Wei, X.; Yan, P.; Liu, R.; Jin, Y.; Gong, G.; Xu, X.; Wu, Y. PREPARATION AND PROPERTIES OF CHLORINATED POLYISOBUTYLENE ELASTOMER BY ONE-STEP POLYMERIZATION. *Rubber Chem. Technol.* **2023**. <https://doi.org/10.5254/rct.23.77969>.
- (22) Shaban, A.; Colin, X.; MARQUE, G.; MONCHY-LEROY, C. Peroxide Cross-Linking of EPDMs Having High Fractions of Ethylenic Units. *Rubber Chem. Technol.* **2014**, *87*. <https://doi.org/10.5254/rct.14.85989>.
- (23) Kaur, A.; Gautrot, J. E.; Cavalli, G.; Watson, D.; Bickley, A.; Akutagawa, K.; Busfield, J. J. C. Kinetic Analysis of Thiol-Ene Based Cross-Linking Reaction of Polychloroprene Rubber. In *Constitutive Models for Rubber XII*; CRC Press, 2022.
- (24) Wang, L.; Liu, Y.; Hao, N.; Qiao, Y.; Zeng, W.; Wei, L.; Du, A. Combining Multiple Hydrogen Bonds and Boronic Ester Chemistry towards Mechanically Robust and Creep Resisting Elastomer Vitrimer. *Polymer* **2023**, *265*, 125595. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2022.125595>.
- (25) Yang, G.; Wang, Q.; Zhuo, W.; Li, G.; Niu, Y.; Li, G. Oxidation of Lubricating Oil and Its Influence on the Aging Behaviors of Fluorine Rubber. *J. Appl. Polym. Sci.* **2023**, *140* (5), e53402. <https://doi.org/10.1002/app.53402>.
- (26) Wang, R.; Suzuki, K.; Miyoshi, T.; Suzuki, Y. Intrinsically Stretchable Polymer Electret for Powering Skin Electronics. In *2022 21st International Conference on Micro and Nanotechnology for Power Generation and Energy Conversion Applications (PowerMEMS)*; 2022; pp 14–17. <https://doi.org/10.1109/PowerMEMS56853.2022.10007566>.
- (27) Zhuang, G.; Wang, J.; Yang, J.; Ma, Y.; Zhang, Y.; Wang, H.; Ji, G. Polysulfide Polyurethane-Urea(PSPU)-Based Self-Healing Dielectric Composites with Poly-

- Dopamine and KH550 Chemically Modified Carbon Nanotubes. *Eur. Polym. J.* **2023**, *188*, 111944. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.111944>.
- (28) Yue, X.; Zeng, S.; Sun, R.; Li, Y.; Lu, A.; Kang, M.; Yu, F. Study on Synthesis and Mechanical Properties of Eu³⁺- π /Covalent Hybrid Crosslinked Silicone Rubber. *Polym. Eng. Sci.* n/a (n/a). <https://doi.org/10.1002/pen.26292>.
- (29) Smejda-Krzewicka, A.; Mrozowski, K.; Kobędza, P.; Adamus-Włodarczyk, A. The Use of Iron(II,III) Oxide (Fe₃O₄) as a Cross-Linking Agent for Unfilled and Filled Chlorosulfonated Polyethylene (CSM) and Study of the Vulcanizates Properties. *Materials* **2022**, *15* (20), 7276. <https://doi.org/10.3390/ma15207276>.
- (30) Ikura, R.; Park, J.; Osaki, M.; Yamaguchi, H.; Harada, A.; Takashima, Y. Supramolecular Elastomers with Movable Cross-Linkers Showing High Fracture Energy Based on Stress Dispersion. *Macromolecules* **2019**, *52* (18), 6953–6962. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.9b01198>.
- (31) Lawandy, S. N.; Halim, S. F. Effect of Vulcanizing System on the Crosslink Density of Nitrile Rubber Compounds. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *96* (6), 2440–2445. <https://doi.org/10.1002/app.21711>.
- (32) Yamaguchi, H.; Azuma, K.; Minoura, Y. Asymmetric Hydroboration of Diene Polymers. *Polym. J.* **1972**, *3* (1), 12–20. <https://doi.org/10.1295/polymj.3.12>.
- (33) Derouet, D.; Phinyocheep, P.; Brosse, J. C.; Boccaccio, G. Synthèse d'elastomeres photoreticulables par modification chimique du caoutchouc naturel liquide—I. Introduction de l'anhydride maleique sur les structures polyisopreniques. *Eur. Polym. J.* **1990**, *26* (12), 1301–1311. [https://doi.org/10.1016/0014-3057\(90\)90143-R](https://doi.org/10.1016/0014-3057(90)90143-R).
- (34) Hoyle, C. E.; Bowman, C. N. Thiol–Ene Click Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (9), 1540–1573. <https://doi.org/10.1002/anie.200903924>.
- (35) Zheng, J.; Liu, F.; Lin, Y.; Zhang, Z.; Zhang, G.; Wang, L.; Liu, Y.; Tang, T. Synthesis of Diverse Well-Defined Functional Polymers Based on Hydrozirconation and Subsequent Anti-Markovnikov Halogenation of 1,2-Polybutadiene. *Macromolecules* **2012**, *45* (3), 1190–1197. <https://doi.org/10.1021/ma202628p>.
- (36) Yang, X.; Wang, C. Diverse Fates of β -Silyl Radical under Manganese Catalysis: Hydrosilylation and Dehydrogenative Silylation of Alkenes. *Chin. J. Chem.* **2018**, *36* (11), 1047–1051. <https://doi.org/10.1002/cjoc.201800367>.
- (37) Atienza, C. C. H.; Diao, T.; Weller, K. J.; Nye, S. A.; Lewis, K. M.; Delis, J. G. P.; Boyer, J. L.; Roy, A. K.; Chirik, P. J. Bis(Imino)Pyridine Cobalt-Catalyzed Dehydrogenative Silylation of Alkenes: Scope, Mechanism, and Origins of Selective Allylsilane Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (34), 12108–12118. <https://doi.org/10.1021/ja5060884>.
- (38) Zuchowska, D. Polybutadiene Modified by Epoxidation. 1. Effect of Polybutadiene Microstructure on the Reactivity of Double Bonds. *Polymer* **1980**, *21* (5), 514–520. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(80\)90217-7](https://doi.org/10.1016/0032-3861(80)90217-7).
- (39) Brosse, J. C.; Campistrion, I.; Derouet, D.; El Hamdaoui, A.; Houdayer, S.; Reyx, D.; Ritoit-Gillier, S. Chemical Modifications of Polydiene Elastomers: A Survey and Some Recent Results. *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *78* (8), 1461–1477. [https://doi.org/10.1002/1097-4628\(20001121\)78:8<1461::AID-APP20>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-4628(20001121)78:8<1461::AID-APP20>3.0.CO;2-V).
- (40) Kirpichev, V. P.; Yakubchik, A. I.; Maglysh, G. N. Modification of Cis-1,4-Polybutadiene with β -Naphthylamine. *Polym. Sci. USSR* **1968**, *10* (10), 2728–2735. [https://doi.org/10.1016/0032-3950\(68\)90115-9](https://doi.org/10.1016/0032-3950(68)90115-9).
- (41) Kébir, N.; Morandi, G.; Campistrion, I.; Laguerre, A.; Pilard, J.-F. Synthesis of Well Defined Amino Telechelic Cis-1,4-Oligoisoprenes from Carbonyl Telechelic Oligomers; First Studies of Their Potentialities as Polyurethane or Polyurea Materials Precursors. *Polymer* **2005**, *46* (18), 6844–6854. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.05.122>.

- (42) Jaratrotkamjorn, R.; Nourry, A.; Pasetto, P.; Choppé, E.; Panwiriyarat, W.; Tanrattanakul, V.; Pilard, J.-F. Synthesis and Characterization of Elastomeric, Biobased, Nonisocyanate Polyurethane from Natural Rubber. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134* (42), 45427. <https://doi.org/10.1002/app.45427>.
- (43) Nemani, S. K.; Annavarapu, R. K.; Mohammadian, B.; Raiyan, A.; Heil, J.; Haque, Md. A.; Abdelaal, A.; Sojoudi, H. Surface Modification of Polymers: Methods and Applications. *Adv. Mater. Interfaces* **2018**, *5* (24), 1801247. <https://doi.org/10.1002/admi.201801247>.
- (44) Xu, Q. F.; Mondal, B.; Lyons, A. M. Fabricating Superhydrophobic Polymer Surfaces with Excellent Abrasion Resistance by a Simple Lamination Templating Method. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3* (9), 3508–3514. <https://doi.org/10.1021/am200741f>.
- (45) Siau, S.; Vervaeet, A.; Calster, A. V.; Swennen, I.; Schacht, E. Influence of Wet Chemical Treatments on the Evolution of Epoxy Polymer Layer Surface Roughness for Use as a Build-up Layer. *Appl. Surf. Sci.* **2004**, *237* (1), 457–462. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2004.06.111>.
- (46) Penn, L. S.; Wang, H. Chemical Modification of Polymer Surfaces: A Review. *Polym. Adv. Technol.* **1994**, *5* (12), 809–817. <https://doi.org/10.1002/pat.1994.220051207>.
- (47) Ma, M.; Mao, Y.; Gupta, M.; Gleason, K. K.; Rutledge, G. C. Superhydrophobic Fabrics Produced by Electrospinning and Chemical Vapor Deposition. *Macromolecules* **2005**, *38* (23), 9742–9748. <https://doi.org/10.1021/ma0511189>.
- (48) Cáceres, C. A.; Mazzola, N.; França, M.; Canevarolo, S. V. Controlling In-Line the Energy Level Applied during the Corona Treatment. *Polym. Test.* **2012**, *31* (4), 505–511. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2012.02.002>.
- (49) Lindner, M.; Rodler, N.; Jesdinszki, M.; Schmid, M.; Sänglerlaub, S. Surface Energy of Corona Treated PP, PE and PET Films, Its Alteration as Function of Storage Time and the Effect of Various Corona Dosages on Their Bond Strength after Lamination. *J. Appl. Polym. Sci.* **2018**, *135* (11), 45842. <https://doi.org/10.1002/app.45842>.
- (50) Lee, J. H.; Kim, H. G.; Khang, G. S.; Lee, H. B.; Jhon, M. S. Characterization of Wettability Gradient Surfaces Prepared by Corona Discharge Treatment. *J. Colloid Interface Sci.* **1992**, *151* (2), 563–570. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(92\)90504-F](https://doi.org/10.1016/0021-9797(92)90504-F).
- (51) Ramsay, J.; Rhazi, B.; Garnier, A.; Sapiéha, S.; Chavarie, C.; Ramsay, B. Attachment of Vero Cells to Corona-Treated, Plastic Surfaces. *J. Ferment. Bioeng.* **1997**, *83* (2), 173–178. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)83578-7](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)83578-7).
- (52) Rocca-Smith, J. R.; Karbowski, T.; Marcuzzo, E.; Sensidoni, A.; Piasente, F.; Champion, D.; Heinz, O.; Vitry, P.; Bourillot, E.; Lesniewska, E.; Debeaufort, F. Impact of Corona Treatment on PLA Film Properties. *Polym. Degrad. Stab.* **2016**, *132*, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.03.020>.
- (53) Chan, C.-M.; Ko, T.-M.; Hiraoka, H. Polymer Surface Modification by Plasmas and Photons. *Surf. Sci. Rep.* **1996**, *24* (1), 1–54. [https://doi.org/10.1016/0167-5729\(96\)80003-3](https://doi.org/10.1016/0167-5729(96)80003-3).
- (54) Gao, S. L.; Häßler, R.; Mäder, E.; Bahners, T.; Opwis, K.; Schollmeyer, E. Photochemical Surface Modification of PET by Excimer UV Lamp Irradiation. *Appl. Phys. B* **2005**, *81* (5), 681–690. <https://doi.org/10.1007/s00340-005-1928-9>.
- (55) Glaris, P.; Coulon, J.-F.; Dorget, M.; Poncin-Epaillard, F. Thermal Annealing as a New Simple Method for PTFE Texturing. *Polymer* **2013**, *54* (21), 5858–5864. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.08.011>.
- (56) Hibon, P.; von Seggern, H.; Tseng, H.-R.; Leonhard, C.; Hamburger, M.; Béalle, G. Improved Thin Film Stability of Differently Formulated, Printed, and Crosslinked Polymer Layers against Successive Solvent Printing. *J. Appl. Polym. Sci.* **2020**, *137* (29), 48895. <https://doi.org/10.1002/app.48895>.

- (57) Ting, Y.-H.; Liu, C.-C.; Park, S.-M.; Jiang, H.; Nealey, P. F.; Wendt, A. E. Surface Roughening of Polystyrene and Poly(Methyl Methacrylate) in Ar/O₂ Plasma Etching. *Polymers* **2010**, *2* (4), 649–663. <https://doi.org/10.3390/polym2040649>.
- (58) Lee, Y. M.; Shim, J. K. Plasma Surface Graft of Acrylic Acid onto a Porous Poly(Vinylidene Fluoride) Membrane and Its Riboflavin Permeation. *6*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19960822\)61:8<1245::AID-APP2>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19960822)61:8<1245::AID-APP2>3.0.CO;2-K).
- (59) Wang, P.; Tan, K. L.; Ho, C. C.; Khew, M. C.; Kang, E. T. Surface Modification of Natural Rubber Latex Films by Graft Copolymerization. *Eur. Polym. J.* **2000**, *36* (7), 1323–1331. [https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(99\)00193-7](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(99)00193-7).
- (60) Abdel-Fattah, E. Surface Activation of Poly(Methyl Methacrylate) with Atmospheric Pressure Ar + H₂O Plasma. *Coatings* **2019**, *9* (4), 228. <https://doi.org/10.3390/coatings9040228>.
- (61) Hansen, R. H.; Schonhorn, H. A New Technique for Preparing Low Surface Energy Polymers for Adhesive Bonding. *J. Polym. Sci. [B]* **1966**, *4* (3), 203–209. <https://doi.org/10.1002/pol.1966.110040309>.
- (62) Schonhorn, H.; Hansen, R. H. Surface Treatment of Polymers for Adhesive Bonding. *J. Appl. Polym. Sci.* **1967**, *11* (8), 1461–1474. <https://doi.org/10.1002/app.1967.070110809>.
- (63) Vasile, C.; Baican, M. C.; Tibirna, C. M.; Tuchilus, C.; Debarnot, D.; Pâslaru, E.; Poncin-Epaillard, F. Microwave Plasma Activation of a Polyvinylidene Fluoride Surface for Protein Immobilization. *J. Phys. Appl. Phys.* **2011**, *44* (47), 475303. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/44/47/475303>.
- (64) Sharma, V.; Dhayal, M.; Govind; Shivaprasad, S. M.; Jain, S. C. Surface Characterization of Plasma-Treated and PEG-Grafted PDMS for Micro Fluidic Applications. *Vacuum* **2007**, *81* (9), 1094–1100. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2007.02.004>.
- (65) Yamamoto, M.; Matsumae, T.; Kurashima, Y.; Takagi, H.; Suga, T.; Itoh, T.; Higurashi, E. Comparison of Argon and Oxygen Plasma Treatments for Ambient Room-Temperature Wafer-Scale Au–Au Bonding Using Ultrathin Au Films. *Micromachines* **2019**, *10* (2), 119. <https://doi.org/10.3390/mi10020119>.
- (66) Abbas, A.; Vercaigne-Marko, D.; Supiot, P.; Bocquet, B.; Vivien, C.; Guillochon, D. Covalent Attachment of Trypsin on Plasma Polymerized Allylamine. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2009**, *73* (2), 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.06.007>.
- (67) Cheo, S. H. Y.; Wang, P.; Tan, K. L.; Ho, C. C.; Kang, E. T. Surface Modification of Natural Rubber Latex Films via Grafting of Poly(Ethylene Glycol) for Reduction in Protein Adsorption and Platelet Adhesion. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2001**, *12* (5), 377–384. <https://doi.org/10.1023/A:1011280416520>.
- (68) Brena, B.; González-Pombo, P.; Batista-Viera, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition*; Guisan, J. M., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2013; pp 15–31. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_2.
- (69) Rodrigues, R. C.; Berenguer-Murcia, Á.; Carballares, D.; Morellon-Sterling, R.; Fernandez-Lafuente, R. Stabilization of Enzymes via Immobilization: Multipoint Covalent Attachment and Other Stabilization Strategies. *Biotechnol. Adv.* **2021**, *52*, 107821. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107821>.
- (70) dos Santos, J. C. S.; Rueda, N.; Torres, R.; Barbosa, O.; Gonçalves, L. R. B.; Fernandez-Lafuente, R. Evaluation of Divinylsulfone Activated Agarose to Immobilize Lipases and to Tune Their Catalytic Properties. *Process Biochem.* **2015**, *50* (6), 918–927. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.03.018>.
- (71) Klibanov, A. M. Enzyme Stabilization by Immobilization. *Anal. Biochem.* **1979**, *93*, 1–25. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(79\)80110-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(79)80110-4).

- (72) Boudrant, J.; Woodley, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Parameters Necessary to Define an Immobilized Enzyme Preparation. *Process Biochem.* **2020**, *90*, 66–80. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.026>.
- (73) Pessela, B. C. C.; Mateo, C.; Carrascosa, A. V.; Vian, A.; García, J. L.; Rivas, G.; Alfonso, C.; Guisan, J. M.; Fernández-Lafuente, R. One-Step Purification, Covalent Immobilization, and Additional Stabilization of a Thermophilic Poly-His-Tagged β -Galactosidase from *Thermus* Sp. Strain T2 by Using Novel Heterofunctional Chelate–Epoxy Sepabeads. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (1), 107–113. <https://doi.org/10.1021/bm020086j>.
- (74) Santos, J. C. S. dos; Barbosa, O.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, A.; Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. *ChemCatChem* **2015**, *7* (16), 2413–2432. <https://doi.org/10.1002/cctc.201500310>.
- (75) Finbloom, J. A.; Francis, M. B. Supramolecular Strategies for Protein Immobilization and Modification. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *46*, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.05.023>.
- (76) Bilal, M.; Iqbal, H. M. N. Chemical, Physical, and Biological Coordination: An Interplay between Materials and Enzymes as Potential Platforms for Immobilization. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *388*, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.02.024>.
- (77) Romero-Fernández, M.; Paradisi, F. Protein Immobilization Technology for Flow Biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *55*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.11.008>.
- (78) Xu, R.; Zhou, Q.; Li, F.; Zhang, B. Laccase Immobilization on Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Composite Nanofibrous Membranes for 2,4-Dichlorophenol Removal. *Chem. Eng. J.* **2013**, *222*, 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.02.074>.
- (79) Liu, Y.; Ogorzalek, T. L.; Yang, P.; Schroeder, M. M.; Marsh, E. N. G.; Chen, Z. Molecular Orientation of Enzymes Attached to Surfaces through Defined Chemical Linkages at the Solid–Liquid Interface. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (34), 12660–12669. <https://doi.org/10.1021/ja403672s>.
- (80) Wieszczycka, K.; Staszak, K.; Woźniak-Budych, M. J.; Litowczenko, J.; Maciejewska, B. M.; Jurga, S. Surface Functionalization – The Way for Advanced Applications of Smart Materials. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *436*, 213846. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.213846>.
- (81) Dumri Kanchana; Hung Anh Dau; Dr. Bruno Werdelmann Foundation; Chiang Mai University; Thailand’s Office of the Higher Education Commission. Immobilization of Lipase on Silver Nanoparticles via Adhesive Polydopamine for Biodiesel Production. *Enzyme Res.* **2014**, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/389739>.
- (82) Kang, H.-J.; Cha, E. J.; Park, H.-D. Protein Immobilization onto Various Surfaces Using a Polymer-Bound Isocyanate. *Appl. Surf. Sci.* **2015**, *324*, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.10.117>.
- (83) Malar, C. G.; Seenuvasan, M.; Kumar, K. S. Improvisation of Diffusion Coefficient in Surface Modified Magnetite Nanoparticles: A Novel Perspective. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *103*, 109832. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109832>.
- (84) Wang, D.; Jiang, W. Preparation of Chitosan-Based Nanoparticles for Enzyme Immobilization. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *126*, 1125–1132. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.243>.
- (85) Campeau, M.-A.; Lortie, A.; Tremblay, P.; Béliveau, M.-O.; Dubé, D.; Langelier, È.; Rouleau, L. Effect of Manufacturing and Experimental Conditions on the Mechanical and Surface Properties of Silicone Elastomer Scaffolds Used in Endothelial Mechanobiological

- Studies. *Biomed. Eng. OnLine* **2017**, *16* (1), 90. <https://doi.org/10.1186/s12938-017-0380-5>.
- (86) Zhang, J.; Chen, Y.; Brook, M. A. Facile Functionalization of PDMS Elastomer Surfaces Using Thiol–Ene Click Chemistry. *Langmuir* **2013**, *29* (40), 12432–12442. <https://doi.org/10.1021/la403425d>.
- (87) Sánchez-Moreno, P.; De Vicente, J.; Nardecchia, S.; Marchal, J. A.; Boulaiz, H. Thermo-Sensitive Nanomaterials: Recent Advance in Synthesis and Biomedical Applications. *Nanomaterials* **2018**, *8* (11), 935. <https://doi.org/10.3390/nano8110935>.
- (88) Yang, L.; Fan, X.; Zhang, J.; Ju, J. Preparation and Characterization of Thermoresponsive Poly(N-Isopropylacrylamide) for Cell Culture Applications. *Polymers* **2020**, *12* (2), 389. <https://doi.org/10.3390/polym12020389>.
- (89) Liu, X.; Fang, Y.; Yang, X.; Li, Y.; Wang, C. Electrospun Epoxy-Based Nanofibrous Membrane Containing Biocompatible Feather Polypeptide for Highly Stable and Active Covalent Immobilization of Lipase. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *166*, 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.03.037>.
- (90) Huang, X.-J.; Yu, A.-G.; Xu, Z.-K. Covalent Immobilization of Lipase from *Candida Rugosa* onto Poly(Acrylonitrile-Co-2-Hydroxyethyl Methacrylate) Electrospun Fibrous Membranes for Potential Bioreactor Application. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99* (13), 5459–5465. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.009>.
- (91) Oktay, B.; Demir, S.; Kayaman-Apohan, N. Immobilization of α -Amylase onto Poly(Glycidyl Methacrylate) Grafted Electrospun Fibers by ATRP. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *50*, 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.02.033>.
- (92) Arica, M. Y.; Salih, B.; Celikbicak, O.; Bayramoglu, G. Immobilization of Laccase on the Fibrous Polymer-Grafted Film and Study of Textile Dye Degradation by MALDI–ToF-MS. *Chem. Eng. Res. Des.* **2017**, *128*, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2017.09.023>.
- (93) Mateo, C.; Fernández-Lorente, G.; Abian, O.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Multifunctional Epoxy Supports: A New Tool To Improve the Covalent Immobilization of Proteins. The Promotion of Physical Adsorptions of Proteins on the Supports before Their Covalent Linkage. *Biomacromolecules* **2000**, *1* (4), 739–745. <https://doi.org/10.1021/bm000071q>.
- (94) Mateo, C.; Abian, O.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. Increase in Conformational Stability of Enzymes Immobilized on Epoxy-Activated Supports by Favoring Additional Multipoint Covalent Attachment☆. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *26* (7), 509–515. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00188-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00188-X).
- (95) Singh, M.; Ray, A. R.; Verma, P. V. K.; Guha, S. K. Potential Biosoluble Carriers: Biocompatibility and Biodegradability of Oxidized Cellulose. *Biomater. Med. Devices Artif. Organs* **1979**, *7* (4), 495–512. <https://doi.org/10.3109/10731197909118964>.
- (96) Jin, F.; Toda, K. Preparation of Immobilized Papain Covalently Bound on Natural Cellulose for Treatment of Beer. *Biotechnol. Lett.* **1988**, *10* (3), 221–223. <https://doi.org/10.1007/BF01134834>.
- (97) Varavinit, S.; Chaokasem, N.; Shobsngob, S. Covalent Immobilization of a Glucoamylase to Bagasse Dialdehyde Cellulose. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *17* (7), 721–725. <https://doi.org/10.1023/A:1012984802624>.
- (98) Ma, Z.; Ramakrishna, S. Electrospun Regenerated Cellulose Nanofiber Affinity Membrane Functionalized with Protein A/G for IgG Purification. *J. Membr. Sci.* **2008**, *319* (1), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.03.045>.
- (99) Huang, X.-J.; Chen, P.-C.; Huang, F.; Ou, Y.; Chen, M.-R.; Xu, Z.-K. Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase on Electrospun Cellulose Nanofiber Membrane. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, *70* (3), 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.02.010>.

- (100) Sathishkumar, P.; Kamala-Kannan, S.; Cho, M.; Kim, J. S.; Hadibarata, T.; Salim, M. R.; Oh, B.-T. Laccase Immobilization on Cellulose Nanofiber: The Catalytic Efficiency and Recyclic Application for Simulated Dye Effluent Treatment. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *100*, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.12.008>.
- (101) Guisán, José M. Aldehyde-Agarose Gels as Activated Supports for Immobilization-Stabilization of Enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **1988**, *10* (6), 375–382. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(88\)90018-X](https://doi.org/10.1016/0141-0229(88)90018-X).
- (102) Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fuentes, M.; Betancor, L.; Grazu, V.; López-Gallego, F.; Pessela, B. C. C.; Hidalgo, A.; Fernández-Lorente, G.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Glyoxyl Agarose: A Fully Inert and Hydrophilic Support for Immobilization and High Stabilization of Proteins. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39* (2), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.014>.
- (103) Grazu, V.; Betancor, L.; Montes, T.; Lopez-Gallego, F.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Glyoxyl Agarose as a New Chromatographic Matrix. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *38* (7), 960–966. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.08.034>.
- (104) Monier, M. Immobilization of β -Galactosidase from Escherichia Coli onto Modified Natural Silk Fibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *130* (4), 2923–2931. <https://doi.org/10.1002/app.39475>.
- (105) Lou, L.-L.; Qu, H.; Yu, W.; Wang, B.; Ouyang, L.; Liu, S.; Zhou, W. Covalently Immobilized Lipase on a Thermoresponsive Polymer with an Upper Critical Solution Temperature as an Efficient and Recyclable Asymmetric Catalyst in Aqueous Media. *ChemCatChem* **2018**, *10* (5), 1166–1172. <https://doi.org/10.1002/cctc.201701512>.
- (106) Xu, R.; Cui, J.; Tang, R.; Li, F.; Zhang, B. Removal of 2,4,6-Trichlorophenol by Laccase Immobilized on Nano-Copper Incorporated Electrospun Fibrous Membrane-High Efficiency, Stability and Reusability. *Chem. Eng. J.* **2017**, *326*, 647–655. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.05.083>.
- (107) Harir, M.; Bellahcene, M.; Baratto, M. C.; Pollini, S.; Rossolini, G. M.; Trabalzini, L.; Fatarella, E.; Pogni, R. Isolation and Characterization of a Novel Tyrosinase Produced by Sahara Soil Actinobacteria and Immobilization on Nylon Nanofiber Membranes. *J. Biotechnol.* **2018**, *265*, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.11.004>.
- (108) Tseng, H.-C.; Lee, A.-W.; Wei, P.-L.; Chang, Y.-J.; Chen, J.-K. Clinical Diagnosis of Colorectal Cancer Using Electrospun Triple-Blend Fibrous Mat-Based Capture Assay of Circulating Tumor Cells. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (40), 6565–6580. <https://doi.org/10.1039/C6TB01359G>.
- (109) Ye, P.; Xu, Z.-K.; Wu, J.; Innocent, C.; Seta, P. Nanofibrous Membranes Containing Reactive Groups: Electrospinning from Poly(Acrylonitrile-Co-Maleic Acid) for Lipase Immobilization. *Macromolecules* **2006**, *39* (3), 1041–1045. <https://doi.org/10.1021/ma0517998>.
- (110) Chauhan, D.; Gupta, P. K.; Solanki, P. R. Electrochemical Immunosensor Based on Magnetite Nanoparticles Incorporated Electrospun Polyacrylonitrile Nanofibers for Vitamin-D3 Detection. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *93*, 145–156. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.07.036>.
- (111) Dai, X.-Y.; Kong, L.-M.; Wang, X.-L.; Zhu, Q.; Chen, K.; Zhou, T. Preparation, Characterization and Catalytic Behavior of Pectinase Covalently Immobilized onto Sodium Alginate/Graphene Oxide Composite Beads. *Food Chem.* **2018**, *253*, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.157>.
- (112) Çakıroğlu, B.; Çiğil, A. B.; Ogan, A.; Kahraman, M. V.; Demir, S. Covalent Immobilization of Acetylcholinesterase on a Novel Polyacrylic Acid-Based Nanofiber Membrane. *Eng. Life Sci.* **2018**, *18* (4), 254–262. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700130>.

- (113) E, B.; S, D.; O, D.; Mv, K. Covalent immobilization of α -amylase onto thermally crosslinked electrospun PVA/PAA nanofibrous hybrid membranes. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *127* (1), 349–355.
- (114) Xu, R.; Si, Y.; Li, F.; Zhang, B. Enzymatic Removal of Paracetamol from Aqueous Phase: Horseradish Peroxidase Immobilized on Nanofibrous Membranes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22* (5), 3838–3846. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3658-1>.
- (115) Oktay, B.; Kayaman-Apohan, N.; Erdem-Kuruca, S.; Süleymanoğlu, M. Fabrication of Collagen Immobilized Electrospun Poly (Vinyl Alcohol) Scaffolds. *Polym. Adv. Technol.* **2015**, *26* (8), 978–987. <https://doi.org/10.1002/pat.3512>.
- (116) Marino, S. M.; Gladyshev, V. N. Analysis and Functional Prediction of Reactive Cysteine Residues *. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (7), 4419–4425. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.275578>.
- (117) Jansen, L. E.; Negrón-Piñeiro, L. J.; Galarza, S.; Peyton, S. R. Control of Thiol-Maleimide Reaction Kinetics in PEG Hydrogel Networks. *Acta Biomater.* **2018**, *70*, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.01.043>.
- (118) Park, E. J.; Gevrek, T. N.; Sanyal, R.; Sanyal, A. Indispensable Platforms for Bioimmobilization: Maleimide-Based Thiol Reactive Hydrogels. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (11), 2004–2011. <https://doi.org/10.1021/bc500375r>.
- (119) Rajesh Singh, R.; Chang, J.-Y. Structural Stability of Human α -Thrombin Studied by Disulfide Reduction and Scrambling. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2003**, *1651* (1), 85–92. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(03\)00238-3](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(03)00238-3).
- (120) Niño-Ramírez, V. A.; Insuasty-Cepeda, D. S.; Rivera-Monroy, Z. J.; Maldonado, M. Evidence of Isomerization in the Michael-Type Thiol-Maleimide Addition: Click Reaction between L-Cysteine and 6-Maleimidehexanoic Acid. *Molecules* **2022**, *27* (16), 5064. <https://doi.org/10.3390/molecules27165064>.
- (121) Henkel, M.; Röckendorf, N.; Frey, A. Selective and Efficient Cysteine Conjugation by Maleimides in the Presence of Phosphine Reductants. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (10), 2260–2265. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00371>.
- (122) Baldwin, A. D.; Kiick, K. L. Reversible Maleimide–Thiol Adducts Yield Glutathione-Sensitive Poly(Ethylene Glycol)–Heparin Hydrogels. *Polym. Chem.* **2013**, *4* (1), 133–143. <https://doi.org/10.1039/C2PY20576A>.
- (123) Huang, W.; Wu, X.; Gao, X.; Yu, Y.; Lei, H.; Zhu, Z.; Shi, Y.; Chen, Y.; Qin, M.; Wang, W.; Cao, Y. Maleimide–Thiol Adducts Stabilized through Stretching. *Nat. Chem.* **2019**, *11* (4), 310–319. <https://doi.org/10.1038/s41557-018-0209-2>.
- (124) Fontaine, S. D.; Reid, R.; Robinson, L.; Ashley, G. W.; Santi, D. V. Long-Term Stabilization of Maleimide–Thiol Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26* (1), 145–152. <https://doi.org/10.1021/bc5005262>.
- (125) Cha, T.; Guo, A.; Zhu, X.-Y. Enzymatic Activity on a Chip: The Critical Role of Protein Orientation. *PROTEOMICS* **2005**, *5* (2), 416–419. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400948>.
- (126) Rao, S. V.; Anderson, K. W.; Bachas, L. G. Oriented Immobilization of Proteins. *Microchim. Acta* **1998**, *128* (3), 127–143. <https://doi.org/10.1007/BF01243043>.
- (127) MacDonald, J. I.; Munch, H. K.; Moore, T.; Francis, M. B. One-Step Site-Specific Modification of Native Proteins with 2-Pyridinecarboxyaldehydes. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11* (5), 326–331. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1792>.
- (128) Zhang, X.; Duan, Y.; Zeng, X. Improved Performance of Recombinant Protein A Immobilized on Agarose Beads by Site-Specific Conjugation. *ACS Omega* **2017**, *2* (4), 1731–1737. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00362>.

- (129) Rashidian, M.; Song, J. M.; Pricer, R. E.; Distefano, M. D. Chemoenzymatic Reversible Immobilization and Labeling of Proteins without Prior Purification. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (20), 8455–8467. <https://doi.org/10.1021/ja211308s>.
- (130) Raliski, B. K.; Howard, C. A.; Young, D. D. Site-Specific Protein Immobilization Using Unnatural Amino Acids. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (11), 1916–1920. <https://doi.org/10.1021/bc500443h>.
- (131) Yang, E. Y.; Kronenfeld, J. P.; Gattás-Asfura, K. M.; Bayer, A. L.; Stabler, C. L. Engineering an “Infectious” Treg Biomimetic through Chemoselective Tethering of TGF- β 1 to PEG Brush Surfaces. *Biomaterials* **2015**, *67*, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.07.009>.
- (132) Yuan, Y.; Yin, M.; Qian, J.; Liu, C. Site-Directed Immobilization of Antibodies onto Blood Contacting Grafts for Enhanced Endothelial Cell Adhesion and Proliferation. *Soft Matter* **2011**, *7* (16), 7207–7216. <https://doi.org/10.1039/C1SM05086A>.
- (133) Hu, X.; Hortigüela, M. J.; Robin, S.; Lin, H.; Li, Y.; Moran, A. P.; Wang, W.; Wall, J. G. Covalent and Oriented Immobilization of scFv Antibody Fragments via an Engineered Glycan Moiety. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (1), 153–159. <https://doi.org/10.1021/bm301518p>.
- (134) Wang, S.; Ye, J.; Bie, Z.; Liu, Z. Affinity-Tunable Specific Recognition of Glycoproteins via Boronate Affinity-Based Controllable Oriented Surface Imprinting. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (3), 1135–1140. <https://doi.org/10.1039/C3SC52986J>.
- (135) Pinese, C.; Jebors, S.; Echaliier, C.; Licznar-Fajardo, P.; Garric, X.; Humblot, V.; Calers, C.; Martinez, J.; Mehdi, A.; Subra, G. Simple and Specific Grafting of Antibacterial Peptides on Silicone Catheters. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5* (23), 3067–3073. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600757>.
- (136) Motsa, M.; Mamba, P. P.; Ogola, H. J.; Msagati, T. A.; Mamba, B. B.; Nkambule, T. T. Laccase-Coated Polyethersulfone Membranes for Organic Matter Degradation and Removal. *J. Membr. Sci. Res.* **2022**, *8* (1). <https://doi.org/10.22079/jmsr.2021.139576.1418>.
- (137) Kasálková, N. S.; Slepíčka, P.; Kolská, Z.; Hodačová, P.; Kučková, Š.; Švorčík, V. Grafting of Bovine Serum Albumin Proteins on Plasma-Modified Polymers for Potential Application in Tissue Engineering. *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, *9* (1), 161. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-161>.
- (138) Khosravi, A.; Vossoughi, M.; Shahrokhian, S.; Alemzadeh, I. Nano Reengineering of Horseradish Peroxidase with Dendritic Macromolecules for Stability Enhancement. *Enzyme Microb. Technol.* **2012**, *50* (1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.09.004>.
- (139) Kamat, R. K.; Ma, W.; Yang, Y.; Zhang, Y.; Wang, C.; Kumar, C. V.; Lin, Y. Adsorption and Hydrolytic Activity of the Polycatalytic Cellulase Nanocomplex on Cellulose. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5* (17), 8486–8494. <https://doi.org/10.1021/am401916k>.
- (140) Caro, A.; Humblot, V.; Méthivier, C.; Minier, M.; Salmain, M.; Pradier, C.-M. Grafting of Lysozyme and/or Poly(Ethylene Glycol) to Prevent Biofilm Growth on Stainless Steel Surfaces. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (7), 2101–2109. <https://doi.org/10.1021/jp805284s>.
- (141) Vallières, K.; Chevallier, P.; Sarra-Bournet, C.; Turgeon, S.; Laroche, G. AFM Imaging of Immobilized Fibronectin: Does the Surface Conjugation Scheme Affect the Protein Orientation/Conformation? *Langmuir* **2007**, *23* (19), 9745–9751. <https://doi.org/10.1021/la701323q>.
- (142) Takatsuji, Y.; Yamasaki, R.; Iwanaga, A.; Lienemann, M.; Linder, M. B.; Haruyama, T. Solid-Support Immobilization of a “Swing” Fusion Protein for Enhanced Glucose Oxidase Catalytic Activity. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *112*, 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.07.051>.

- (143) Kim, Y.-P.; Hong, M.-Y.; Kim, J.; Oh, E.; Shon, H. K.; Moon, D. W.; Kim, H.-S.; Lee, T. G. Quantitative Analysis of Surface-Immobilized Protein by TOF-SIMS: Effects of Protein Orientation and Trehalose Additive. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (4), 1377–1385. <https://doi.org/10.1021/ac0616005>.
- (144) Dubey, M.; Emoto, K.; Takahashi, H.; Castner, D. G.; Grainger, D. W. Affinity-Based Protein Surface Pattern Formation by Ligand Self-Selection from Mixed Protein Solutions. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19* (19), 3046–3055. <https://doi.org/10.1002/adfm.200900809>.
- (145) Vermeer, A. W. P.; Norde, W. CD Spectroscopy of Proteins Adsorbed at Flat Hydrophilic Quartz and Hydrophobic Teflon Surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *225* (2), 394–397. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.6769>.
- (146) Ghasemi, M.; Minier, M. J. G.; Tatoulian, M.; Chehimi, M. M.; Arefi-Khonsari, F. Ammonia Plasma Treated Polyethylene Films for Adsorption or Covalent Immobilization of Trypsin: Quantitative Correlation between X-Ray Photoelectron Spectroscopy Data and Enzyme Activity. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (34), 10228–10238. <https://doi.org/10.1021/jp204097a>.
- (147) Loh, F. C.; Tan, K. L.; Kang, E. T.; Kato, K.; Uyama, Y.; Ikada, Y. XPS Characterization of Surface Functionalized Electroactive Polymers. *Surf. Interface Anal.* **1996**, *24* (9), 597–604. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9918\(19960916\)24:9<597::AID-SIA163>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9918(19960916)24:9<597::AID-SIA163>3.0.CO;2-2).
- (148) Zheng, M.; Griveau, S.; Dupont-Gillain, C.; Genet, M. J.; Jolival, C. Oxidation of Laccase for Improved Cathode Biofuel Cell Performances. *Bioelectrochemistry* **2015**, *106*, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.06.004>.
- (149) Cecchet, F.; Duwez, A.-S.; Gabriel, S.; Jérôme, C.; Jérôme, R.; Glinel, K.; Demoustier-Champagne, S.; Jonas, A. M.; Nysten, B. Atomic Force Microscopy Investigation of the Morphology and the Biological Activity of Protein-Modified Surfaces for Bio- and Immunosensors. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (17), 6488–6495. <https://doi.org/10.1021/ac070155q>.
- (150) Rijn, P. van; Böker, A. Bionanoparticles and Hybrid Materials: Tailored Structural Properties, Self-Assembly, Materials and Developments in the Field. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21* (42), 16735–16747. <https://doi.org/10.1039/C1JM11433F>.
- (151) Resnier, P.; Lepeltier, E.; Emina, A. L.; Galopin, N.; Bejaud, J.; David, S.; Ballet, C.; Benvegna, T.; Pecorari, F.; Chourpa, I.; Benoit, J.-P.; Passirani, C. Model Affitin and PEG Modifications onto siRNA Lipid Nanocapsules: Cell Uptake and in Vivo Biodistribution Improvements. *RSC Adv.* **2019**, *9* (47), 27264–27278. <https://doi.org/10.1039/C9RA03668G>.
- (152) Carano, M.; Lion, N.; Girault, H. H. Detection of Proteins on Membranes and in Microchannels Using Copper Staining Combined with Scanning Electrochemical Microscopy. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *599* (2), 349–355. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2006.06.019>.
- (153) Glidle, A.; Yasukawa, T.; Hadyoon, C. S.; Anicet, N.; Matsue, T.; Nomura, M.; Cooper, J. M. Analysis of Protein Adsorption and Binding at Biosensor Polymer Interfaces Using X-Ray Photon Spectroscopy and Scanning Electrochemical Microscopy. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (11), 2559–2570. <https://doi.org/10.1021/ac0261653>.
- (154) Shen, L.; Schroeder, M.; Ogorzalek, T. L.; Yang, P.; Wu, F.-G.; Marsh, E. N. G.; Chen, Z. Surface Orientation Control of Site-Specifically Immobilized Nitro-Reductase (NfsB). *Langmuir* **2014**, *30* (20), 5930–5938. <https://doi.org/10.1021/la5016862>.
- (155) Jasensky, J.; Ferguson, K.; Baria, M.; Zou, X.; McGinnis, R.; Kaneshiro, A.; Badiyan, S.; Wei, S.; Marsh, E. Neil. G.; Chen, Z. Simultaneous Observation of the Orientation and Activity of Surface-Immobilized Enzymes. *Langmuir* **2018**, *34* (31), 9133–9140. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01657>.

- (156) Amounas, M.; Innocent, C.; Cosnier, S.; Seta, P. A Membrane Based Reactor with an Enzyme Immobilized by an Avidin–Biotin Molecular Recognition in a Polymer Matrix. *J. Membr. Sci.* **2000**, *176* (2), 169–176. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(00\)00441-5](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)00441-5).
- (157) Grosjean, L.; Cherif, B.; Mercey, E.; Roget, A.; Levy, Y.; Marche, P. N.; Villiers, M.-B.; Livache, T. A Polypyrrole Protein Microarray for Antibody–Antigen Interaction Studies Using a Label-Free Detection Process. *Anal. Biochem.* **2005**, *347* (2), 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.09.033>.
- (158) Huan, L.; Shi, Q.-H. Increasing Immunoglobulin G Adsorption in Dextran-Grafted Protein A Gels. *Eng. Life Sci.* **2021**, *21* (6), 392–404. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000097>.
- (159) Kujawa, J.; Głodek, M.; Koter, I.; Ośmiałowski, B.; Knozowska, K.; Al-Gharabli, S.; Dumée, L. F.; Kujawski, W. Molecular Decoration of Ceramic Supports for Highly Effective Enzyme Immobilization—Material Approach. *Materials* **2021**, *14* (1), 201. <https://doi.org/10.3390/ma14010201>.
- (160) Leung, J. M.; Berry, L. R.; Chan, A. K. C.; Brash, J. L. Surface Modification of Polydimethylsiloxane with a Covalent Antithrombin–Heparin Complex to Prevent Thrombosis. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2014**, *25* (8), 786–801. <https://doi.org/10.1080/09205063.2014.907669>.
- (161) Chen, H.; Chen, Y.; Sheardown, H.; Brook, M. A. Immobilization of Heparin on a Silicone Surface through a Heterobifunctional PEG Spacer. *Biomaterials* **2005**, *26* (35), 7418–7424. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.053>.
- (162) Lane, S. M.; Kuang, Z.; Yom, J.; Arifuzzaman, S.; Genzer, J.; Farmer, B.; Naik, R.; Vaia, R. A. Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate) for Enzyme Immobilization: Impact on Activity and Stability of Horseradish Peroxidase. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (5), 1822–1830. <https://doi.org/10.1021/bm200173y>.
- (163) Thornton, E. L. Self-Assembling Protein Structures for Novel Applications in Synthetic Biology. **2022**. <https://doi.org/10.7488/era/2343>.
- (164) Zakeri, B.; Fierer, J. O.; Celik, E.; Chittock, E. C.; Schwarz-Linek, U.; Moy, V. T.; Howarth, M. Peptide Tag Forming a Rapid Covalent Bond to a Protein, through Engineering a Bacterial Adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (12), E690–E697. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115485109>.
- (165) Gao, X.; Wei, C.; Qi, H.; Li, C.; Lu, F.; Qin, H.-M. Directional Immobilization of D-Allulose 3-Epimerase Using SpyTag/SpyCatcher Strategy as a Robust Biocatalyst for Synthesizing D-Allulose. *Food Chem.* **2023**, *401*, 134199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134199>.
- (166) Zhang, W.-B.; Sun, F.; Tirrell, D. A.; Arnold, F. H. Controlling Macromolecular Topology with Genetically Encoded SpyTag–SpyCatcher Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (37), 13988–13997. <https://doi.org/10.1021/ja4076452>.
- (167) Tan, L. L.; Hoon, S. S.; Wong, F. T. Kinetic Controlled Tag-Catcher Interactions for Directed Covalent Protein Assembly. *PLOS ONE* **2016**, *11* (10), e0165074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165074>.
- (168) Keeble, A. H.; Yadav, V. K.; Ferla, M. P.; Bauer, C. C.; Chuntharpursat-Bon, E.; Huang, J.; Bon, R. S.; Howarth, M. DogCatcher Allows Loop-Friendly Protein-Protein Ligation. *Cell Chem. Biol.* **2022**, *29* (2), 339–350.e10. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.07.005>.
- (169) Bonnet, J.; Cartannaz, J.; Tourcier, G.; Contreras-Martel, C.; Kleman, J. P.; Morlot, C.; Vernet, T.; Di Guilmi, A. M. Autocatalytic Association of Proteins by Covalent Bond Formation: A Bio Molecular Welding Toolbox Derived from a Bacterial Adhesin. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 43564. <https://doi.org/10.1038/srep43564>.

- (170) Cox, N.; Charlier, C.; Vijayaraj, R.; De La Mare, M.; Barbe, S.; André, I.; Lippens, G.; Montanier, C. Y. The Covalent Complex of Jo-In Results from a Long-Lived, Non-Covalent Intermediate State with near-Native Structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, *589*, 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.12.028>.
- (171) Willemin, M.-E.; Desmots, S.; Le Grand, R.; Lestremau, F.; Zeman, F. A.; Leclerc, E.; Moesch, C.; Brochot, C. PBPK Modeling of the Cis- and Trans-Permethrin Isomers and Their Major Urinary Metabolites in Rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2016**, *294*, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.01.011>.
- (172) Atkins, G. L.; Nimmo, I. A. Current Trends in the Estimation of Michaelis-Menten Parameters. *Anal. Biochem.* **1980**, *104* (1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90268-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90268-7).
- (173) Grima, R.; Walter, N. G.; Schnell, S. Single-Molecule Enzymology à La Michaelis–Menten. *FEBS J.* **2014**, *281* (2), 518–530. <https://doi.org/10.1111/febs.12663>.
- (174) Srinivasan, B. A Guide to the Michaelis–Menten Equation: Steady State and Beyond. *FEBS J.* **2022**, *289* (20), 6086–6098. <https://doi.org/10.1111/febs.16124>.
- (175) Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G. Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* **2005**, *29* (1), 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>.
- (176) Chanda, S. K.; Hirst, E. L.; Jones, J. K. N.; Percival, E. G. V. 262. The Constitution of Xylan from Esparto Grass (*Stipa Tenacissima*, L.). *J. Chem. Soc. Resumed* **1950**, No. 0, 1289–1297. <https://doi.org/10.1039/JR9500001289>.
- (177) Kulkarni, N.; Shendye, A.; Rao, M. Molecular and Biotechnological Aspects of Xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* **1999**, *23* (4), 411–456. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407.x>.
- (178) Rennie, E. A.; Scheller, H. V. Xylan Biosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *26*, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.11.013>.
- (179) Oliveira, D. M.; Mota, T. R.; Salatta, F. V.; Marchiosi, R.; Gomez, L. D.; McQueen-Mason, S. J.; Ferrarese-Filho, O.; dos Santos, W. D. Designing Xylan for Improved Sustainable Biofuel Production. *Plant Biotechnol. J.* **2019**, *17* (12), 2225–2227. <https://doi.org/10.1111/pbi.13150>.
- (180) Wong, K. K.; Tan, L. U.; Saddler, J. N. Multiplicity of Beta-1,4-Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. *Microbiol. Rev.* **1988**, *52* (3), 305–317. <https://doi.org/10.1128/mr.52.3.305-317.1988>.
- (181) Henrissat, B.; Coutinho, P. M. Classification of Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases from Hyperthermophiles. In *Methods in Enzymology; Hyperthermophilic Enzymes Part A*; Academic Press, 2001; Vol. 330, pp 183–201. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)30375-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(01)30375-0).
- (182) Vardakou, M.; Dumon, C.; Murray, J. W.; Christakopoulos, P.; Weiner, D. P.; Juge, N.; Lewis, R. J.; Gilbert, H. J.; Flint, J. E. Understanding the Structural Basis for Substrate and Inhibitor Recognition in Eukaryotic GH11 Xylanases. *J. Mol. Biol.* **2008**, *375* (5), 1293–1305. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.11.007>.
- (183) Törrönen, A.; Harkki, A.; Rouvinen, J. Three-Dimensional Structure of Endo-1,4-Beta-Xylanase II from *Trichoderma Reesei*: Two Conformational States in the Active Site. *EMBO J.* **1994**, *13* (11), 2493–2501. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06536.x>.
- (184) Jeffries, T. W. Biochemistry and Genetics of Microbial Xylanases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7* (3), 337–342. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80041-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80041-3).
- (185) Muilu, J.; Törrönen, A.; Peräkylä, M.; Rouvinen, J. Functional Conformational Changes of Endo-1,4-Xylanase II from *Trichoderma Reesei*: A Molecular Dynamics Study. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **1998**, *31* (4), 434–444. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(19980601\)31:4<434::AID-PROT9>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19980601)31:4<434::AID-PROT9>3.0.CO;2-H).

- (186) Cortés, J.; Siméon, T.; Ruiz de Angulo, V.; Guieysse, D.; Remaud-Siméon, M.; Tran, V. A Path Planning Approach for Computing Large-Amplitude Motions of Flexible Molecules. *Bioinformatics* **2005**, *21* (suppl_1), i116–i125. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti1017>.
- (187) Badruna, L.; Burlat, V.; Roblin, P.; Enjalbert, T.; Lippens, G.; Venditto, I.; O'Donohue, M. J.; Montanier, C. Y. The Jo-In Protein Welding System Is a Relevant Tool to Create CBM-Containing Plant Cell Wall Degrading Enzymes. *New Biotechnol.* **2021**, *65*, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.07.004>.
- (188) Alatawi, F. S.; Monier, M.; Elsayed, N. H. Amino Functionalization of Carboxymethyl Cellulose for Efficient Immobilization of Urease. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *114*, 1018–1025. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.142>.
- (189) Malpass, C. A.; Millsap, K. W.; Sidhu, H.; Gower, L. B. Immobilization of an Oxalate-Degrading Enzyme on Silicone Elastomer. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *63* (6), 822–829. <https://doi.org/10.1002/jbm.10410>.
- (190) Poglazov, B. F.; Samokhin, G. P.; Klibanov, A. M.; Levitsky, D. I.; Martinek, K.; Berezin, I. V. The Effect of Mechanical Stretching of the Myosin Rod Component (Fragment LMM + HMM S-2) on the ATPase Activity of Myosin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol.* **1978**, *524* (2), 245–253. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(78\)90161-4](https://doi.org/10.1016/0005-2744(78)90161-4).
- (191) Ishimori, Y.; Karube, I.; Suzuki, S. Mechanical Control of the Activity of Glucose Oxidase Immobilized on Porous Polyvinylchloride Membrane. *Biotechnol. Bioeng.* **1981**, *23* (11), 2601–2608. <https://doi.org/10.1002/bit.260231116>.
- (192) Klibanov, A. M.; Samokhin, G. P.; Martinek, K.; Berezin, I. V. Enzymatic Mechanochemistry: A New Approach to Studying the Mechanism of Enzyme Action. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol.* **1976**, *438* (1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(76\)90218-7](https://doi.org/10.1016/0005-2744(76)90218-7).
- (193) Teixeira, R. S. S.; da Silva, A. S.; Ferreira-Leitão, V. S.; Bon, E. P. da S. Amino Acids Interference on the Quantification of Reducing Sugars by the 3,5-Dinitrosalicylic Acid Assay Mislead Carbohydrase Activity Measurements. *Carbohydr. Res.* **2012**, *363*, 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.09.024>.
- (194) Orozco, F.; Li, J.; Ezekiel, U.; Niyazov, Z.; Floyd, L.; Lima, G. M. R.; Winkelman, J. G. M.; Moreno-Villoslada, I.; Picchioni, F.; Bose, R. K. Diels-Alder-Based Thermo-Reversibly Crosslinked Polymers: Interplay of Crosslinking Density, Network Mobility, Kinetics and Stereoisomerism. *Eur. Polym. J.* **2020**, *135*, 109882. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109882>.
- (195) Tanner, D.; Gautun, O. R. Studies of Regio- and Stereoselectivity in Some Nucleophilic Ring Opening Reactions of N-Tosyl-3-Phenyl-2-Aziridinemethanols and Derivatives. *Tetrahedron* **1995**, *51* (30), 8279–8288. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(95\)00429-C](https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)00429-C).
- (196) Tanner, D.; He, H. M.; Somfai, P. Regioselective Nucleophilic Ring Opening of 2,3-Aziridino Alcohols. *Tetrahedron* **1992**, *48* (29), 6069–6078. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)89855-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)89855-0).
- (197) BERTO, P. Synthèse et étude de réseaux élastomères réticulés réversiblement, Bordeaux.
- (198) Zhu, J.; Abeykoon, C.; Karim, N. Investigation into the Effects of Fillers in Polymer Processing. *Int. J. Lightweight Mater. Manuf.* **2021**, *4* (3), 370–382. <https://doi.org/10.1016/j.ijlmm.2021.04.003>.
- (199) Rebocho, A. T.; Pereira, J. R.; Freitas, F.; Neves, L. A.; Alves, V. D.; Sevrin, C.; Grandfils, C.; Reis, M. A. M. Production of Medium-Chain Length Polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas Citronellolis* Grown in Apple Pulp Waste. *Appl. Food Biotechnol.* **2019**, *6* (1), 71–82. <https://doi.org/10.22037/afb.v6i1.21793>.

- (200) Bouteau, M.; Cantin, S.; Fichet, O.; Perrot, F.; Teyssié, D. Contribution Toward Comprehension of Contact Angle Values on Single Polydimethylsiloxane and Poly(Ethylene Oxide) Polymer Networks. *Langmuir* **2010**, *26* (22), 17427–17434. <https://doi.org/10.1021/la102384s>.
- (201) Extrand, C. W.; Kumagai, Y. Contact Angles and Hysteresis on Soft Surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *184* (1), 191–200. <https://doi.org/10.1006/jcis.1996.0611>.
- (202) David, C.; Foley, S.; Enescu, M. Protein S–S Bridge Reduction: A Raman and Computational Study of Lysozyme Interaction with TCEP. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (14), 2532–2542. <https://doi.org/10.1039/B815492A>.
- (203) Enjalbert, T.; De La Mare, M.; Roblin, P.; Badruna, L.; Vernet, T.; Dumon, C.; Montanier, C. Y. Characterisation of the Effect of the Spatial Organisation of Hemicellulases on the Hydrolysis of Plant Biomass Polymer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (12), 4360. <https://doi.org/10.3390/ijms21124360>.
- (204) Suzuki, M.; Kishida, A.; Iwata, H.; Ikada, Y. Graft Copolymerization of Acrylamide onto a Polyethylene Surface Pretreated with Glow Discharge. *Macromolecules* **1986**, *19* (7), 1804–1808. <https://doi.org/10.1021/ma00161a005>.
- (205) Sabharwal, H. S.; Denes, Ferencz.; Nielsen, Lynette.; Young, R. A. Free-Radical Formation in Jute from Argon Plasma Treatment. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41* (11), 2202–2207. <https://doi.org/10.1021/jf00035a072>.
- (206) Takamatsu, T.; Uehara, K.; Sasaki, Y.; Miyahara, H.; Matsumura, Y.; Iwasawa, A.; Ito, N.; Azuma, T.; Kohno, M.; Okino, A. Investigation of Reactive Species Using Various Gas Plasmas. *RSC Adv.* **2014**, *4* (75), 39901–39905. <https://doi.org/10.1039/C4RA05936K>.
- (207) Mendez-Linan, J. I.; Ortiz-Ortega, E.; Jimenez-Moreno, M. F.; Mendivil-Palma, M. I.; Martínez-Guerra, E.; Aguirre-Tostado, F. S.; Martinez-Chapa, S. O.; Hosseini, S.; Madou, M. J. Aging Effect of Plasma-Treated Carbon Surfaces: An Overlooked Phenomenon. *Carbon* **2020**, *169*, 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.06.085>.
- (208) Wang, C.; Chen, J.-R. Studies on Surface Graft Polymerization of Acrylic Acid onto PTFE Film by Remote Argon Plasma Initiation. *Sci. Direct* **2006**, No. 253, 8. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2006.10.014>.
- (209) Keating, J. J. I.; Plawsky, J. L. Radical Lifetimes in Atom Transfer Radical Polymerization: A Monte Carlo and Deterministic Investigation. *Macromolecules* **2020**, *53* (17), 7224–7238. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.0c01263>.
- (210) Hao, Z.; Ghanekarade, A.; Zhu, N.; Randazzo, K.; Kawaguchi, D.; Tanaka, K.; Wang, X.; Simmons, D. S.; Priestley, R. D.; Zuo, B. Mobility Gradients Yield Rubbery Surfaces on Top of Polymer Glasses. *Nature* **2021**, *596* (7872), 372–376. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03733-7>.
- (211) Lawson, D. F. Corona Discharge Activation and Reconstruction of Elastomer Surfaces. *Rubber Chem. Technol.* **1987**, *60* (1), 102–110. <https://doi.org/10.5254/1.3536111>.
- (212) Patil, A. O.; Coolbaugh, T. S. Elastomers: A Literature Review with Emphasis on Oil Resistance. *Rubber Chem. Technol.* **2005**, *78* (3), 516–535. <https://doi.org/10.5254/1.3547894>.
- (213) Osterholtz, F. D.; Pohl, E. R. Kinetics of the Hydrolysis and Condensation of Organofunctional Alkoxysilanes: A Review. *J. Adhes. Sci. Technol.* **1992**, *6* (1), 127–149. <https://doi.org/10.1163/156856192X00106>.
- (214) Yates, Keith.; McClelland, R. A. Mechanisms of Ester Hydrolysis in Aqueous Sulfuric Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89* (11), 2686–2692. <https://doi.org/10.1021/ja00987a033>.
- (215) Poole, L. B. The Basics of Thiols and Cysteines in Redox Biology and Chemistry. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *0*, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.013>.
- (216) Northrop, B. H.; Frayne, S. H.; Choudhary, U. Thiol–Maleimide “Click” Chemistry: Evaluating the Influence of Solvent, Initiator, and Thiol on the Reaction Mechanism,

- Kinetics, and Selectivity. *Polym. Chem.* **2015**, *6* (18), 3415–3430. <https://doi.org/10.1039/C5PY00168D>.
- (217) Martínez-Jothar, L.; Doulkeridou, S.; Schiffelers, R. M.; Sastre Torano, J.; Oliveira, S.; van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E. Insights into Maleimide-Thiol Conjugation Chemistry: Conditions for Efficient Surface Functionalization of Nanoparticles for Receptor Targeting. *J. Controlled Release* **2018**, *282*, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.03.002>.
- (218) Xue, B.; Tang, D.; Wu, X.; Xu, Z.; Gu, J.; Han, Y.; Zhu, Z.; Qin, M.; Zou, X.; Wang, W.; Cao, Y. Engineering Hydrogels with Homogeneous Mechanical Properties for Controlling Stem Cell Lineage Specification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2021**, *118* (37), e2110961118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2110961118>.
- (219) Zhang, Y.; Zhou, X.; Xie, Y.; Greenberg, M. M.; Xi, Z.; Zhou, C. Thiol Specific and Tracelessly Removable Bioconjugation via Michael Addition to 5-Methylene Pyrrolones. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (17), 6146–6151. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b00670>.
- (220) Wall, M. A.; Socolich, M.; Ranganathan, R. The Structural Basis for Red Fluorescence in the Tetrameric GFP Homolog DsRed. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7* (12), 1133–1138. <https://doi.org/10.1038/81992>.
- (221) Zimmer, M. Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (3), 759–782. <https://doi.org/10.1021/cr010142r>.
- (222) Sathish, S.; Ishizu, N.; Shen, A. Q. Air Plasma-Enhanced Covalent Functionalization of Poly(Methyl Methacrylate): High-Throughput Protein Immobilization for Miniaturized Bioassays. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (49), 46350–46360. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b14631>.
- (223) Chutipongtanate, S.; Watcharatanyatip, K.; Homvises, T.; Jaturongkakul, K.; Thongboonkerd, V. Systematic Comparisons of Various Spectrophotometric and Colorimetric Methods to Measure Concentrations of Protein, Peptide and Amino Acid: Detectable Limits, Linear Dynamic Ranges, Interferences, Practicality and Unit Costs. *Talanta* **2012**, *98*, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.058>.
- (224) Battu, S.; Rabinovitch-Chable, H.; Beneytout, J.-L. Effectiveness of Talc as Adsorbent for Purification and Immobilization of Plant Lipooxygenases. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42* (10), 2115–2119. <https://doi.org/10.1021/jf00046a008>.
- (225) Aoun, S.; Chebli, C.; Baboulène, M. Noncovalent Immobilization of Chloroperoxidase onto Talc: Catalytic Properties of a New Biocatalyst. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *23* (6), 380–385. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00061-1).
- (226) Arseguel, D.; Baboulène, M. Adsorption of Various Enzymes Onto Talcs Scope and Limitations of This New Immobilization System. *Biocatal. Biotransformation* **1995**, *12* (4), 267–279. <https://doi.org/10.3109/10242429509003189>.
- (227) Zhou; Wang, X.; Birch, L.; Rayment, T.; Abell, C. AFM Study on Protein Immobilization on Charged Surfaces at the Nanoscale: Toward the Fabrication of Three-Dimensional Protein Nanostructures. *Langmuir* **2003**, *19* (25), 10557–10562. <https://doi.org/10.1021/la035491q>.
- (228) Martin, L. J.; Akhavan, B.; Bilek, M. M. M. Electric Fields Control the Orientation of Peptides Irreversibly Immobilized on Radical-Functionalized Surfaces. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 357. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02545-6>.
- (229) Wang, R. Performance and Structure Evaluation of Gln-Lys Isopeptide Bond Crosslinked USYK-SPI Bioplastic Film Derived from Discarded Yak Hair. *Polymers* **2022**, *14* (12), 2471. <https://doi.org/10.3390/polym14122471>.
- (230) Demir-Yilmaz, I.; Guiraud, P.; Formosa-Dague, C. The Contribution of Atomic Force Microscopy (AFM) in Microalgae Studies: A Review. *Algal Res.* **2021**, *60*, 102506. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102506>.

- (231) Libertino, S.; Giannazzo, F.; Aiello, V.; Scandurra, A.; Sinatra, F.; Renis, M.; Fichera, M. XPS and AFM Characterization of the Enzyme Glucose Oxidase Immobilized on SiO₂ Surfaces. *Langmuir* **2008**, *24* (5), 1965–1972. <https://doi.org/10.1021/la7029664>.
- (232) Adema, K. N. S.; Makki, H.; Peters, E. A. J. F.; Laven, J.; van der Ven, L. G. J.; van Bentem, R. A. T. M.; de With, G. The Influence of the Exposure Conditions on the Chemical and Physical Changes of Polyester–Urethane Coatings during Photodegradation. *Polym. Degrad. Stab.* **2016**, *123*, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2015.09.026>.
- (233) Brunelle, J. L.; Green, R. Chapter Thirteen - Coomassie Blue Staining. In *Methods in Enzymology*; Lorsch, J., Ed.; Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C; Academic Press, 2014; Vol. 541, pp 161–167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00013-6>.
- (234) Micheletti, C.; Marenduzzo, D.; Orlandini, E. Polymers with Spatial or Topological Constraints: Theoretical and Computational Results. *Phys. Rep.* **2011**, *504* (1), 1–73. <https://doi.org/10.1016/j.physrep.2011.03.003>.
- (235) Diani, J.; Gall, K. Molecular Dynamics Simulations of the Shape-Memory Behaviour of Polyisoprene. *Smart Mater. Struct.* **2007**, *16* (5), 1575. <https://doi.org/10.1088/0964-1726/16/5/011>.
- (236) Mertz, D.; Vogt, C.; Hemmerlé, J.; Mutterer, J.; Ball, V.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P.; Lavallo, P. Mechanotransductive Surfaces for Reversible Biocatalysis Activation. *Nat. Mater.* **2009**, *8* (9), 731–735. <https://doi.org/10.1038/nmat2504>.
- (237) Sabat, K. C.; Rajput, P.; Paramguru, R. K.; Bhoi, B.; Mishra, B. K. Reduction of Oxide Minerals by Hydrogen Plasma: An Overview. *Plasma Chem. Plasma Process.* **2014**, *34* (1), 1–23. <https://doi.org/10.1007/s11090-013-9484-2>.
- (238) May, F.; Hamann, S.; Quade, A.; Brüser, V. Study on Cu₂S Mineral Surface Modification by Low Temperature Ar/O₂ Plasmas. *Miner. Eng.* **2013**, *50–51*, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2013.06.001>.