

**Interactions et propriétés physico-chimiques de surfaces
modèles de biomatériaux**

par
Lucie Giraud

Faculté de Pharmacie
Université de Montréal

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.)
en Sciences Pharmaceutiques, option Chimie Médicinale

Décembre 2016

© Lucie Giraud, 2016
Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Interactions et propriétés physico-chimiques de surfaces
modèles de biomatériaux**

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.)
en Sciences Pharmaceutiques, option Chimie Médicinale

Présentée par :

Lucie Giraud

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Prof. V. Gaëlle Roullin, président-rapporteur

Prof. Suzanne Giasson, directrice de recherche

Prof. Michel Lafleur, membre du jury

Prof. Joyce Y. Wong, examinatrice externe

Prof. Karen Waldron, représentante du doyen

Résumé

La surface d'un implant ou d'un système à libération contrôlée de médicament est la première zone en contact avec les systèmes physiologiques. Les propriétés de surface vont alors définir le devenir à court et long termes de ces biomatériaux dans l'organisme. Pour améliorer la biointégration mais aussi l'efficacité des matériaux en contact avec les fluides et tissus biologiques, un fin contrôle des phénomènes se produisant à l'interface biologique est nécessaire. Cette thèse s'intéresse à l'étude de trois types de surfaces pouvant modéliser celles de biomatériaux couramment employés.

Dans un premier temps, la stabilité hydrolytique de surface amino-fonctionnalisée a été investiguée. L' amino-fonctionnalisation de surface via l'emploi de monocouche auto-assemblée rencontre un intérêt certain pour l'ancrage de diverses molécules, macromolécules, systèmes colloïdaux et cellules. Cependant, le manque de stabilité en milieu aqueux limite grandement leurs perspectives d'utilisation pour la fonctionnalisation de surface de biomatériaux. Dans ce manuscrit, une monocouche amino-fonctionnalisée à base d' aminoalkylsilane a été greffée sur des substrats de silicate (silice et mica). L'extrême stabilité hydrolytique rapportée pour cette monocouche permet une immersion prolongée en milieu aqueux et sur une large gamme de pH. Les paramètres ayant été identifiés comme impactant cette stabilité sont l'organisation de la monocouche, la densité de greffage et la longueur de la chaîne carbonée de l' aminoalkylsilane.

Dans un second temps, les propriétés lubrifiantes en milieu aqueux de surfaces structurées sont rapportées. Le besoin en surface autolubrifiante couvre une large variété de biomatériaux tels que les substituts cartilagineux, les dispositifs oculaires ou bien les cathéters. Des structures dômes ont été produites sur des surfaces via l'immobilisation de particules. Des particules polymériques à base de polyélectrolytes sensibles aux variations de pH ont permis l'obtention de structures molles et déformables alors que l'immobilisation de particules de silice a permis la formation de structures dures. Deux mécanismes majeurs contrôlant les propriétés de frottement ont été mis en évidence. Les surfaces structurées à partir de polyélectrolytes présentent des propriétés de frottement directement corrélées au gonflement et donc à la teneur en eau de ces structures. Ce

gonflement peut être contrôlé par le pH du milieu aqueux. Plus les structures sont gonflées, plus le coefficient de frottement est faible. En revanche, avec des structures dures obtenues par l'immobilisation de particules de silice, le roulement de ces particules permet d'obtenir sous certaines conditions des coefficients de frottement extrêmement faibles. Dans ce cas, la nature du lien entre la particule et le substrat importe peu et un dégreffage systématique de certaines particules est observé pour permettre le mouvement des surfaces tout en limitant les forces de frottement.

Dans un troisième temps, la complexation de simples brins de siARN via différentes natures d'interactions a été étudiée à l'aide de surfaces modèles de chimie variable. Cette étude a permis de démontrer la possibilité d'adsorber des simples brins de siARN via des interactions non-électrostatiques sur des surfaces planes. Des interactions hydrophobes et les liaisons hydrogène ont par la suite pu être employées pour complexer cet acide nucléique avec des formulations micellaires et liposomales non-cationiques. Cette étude permet d'envisager la conception de nanovecteurs non-cationiques et donc moins toxiques pour la délivrance de simples brins de siARN.

Les travaux présentés dans ce manuscrit contribuent à l'élargissement des connaissances en matière de propriétés physico-chimiques de surface aux interfaces biologiques.

Mots-clés : *Biomatériaux, Appareil de mesure de Forces de Surface, amino-fonctionnalisation, stabilité hydrolytique, surfaces structurées, nanoparticules, nanogels, frottement, polyélectrolytes, interactions moléculaires, systèmes à libération de médicament.*

Abstract

The surface of an implant or a drug delivery system is the first area of contact with biological environment. The surface properties of these biomaterials will define the short and long term behavior in the organism. To improve biointegration and efficiency, a fine control of the biological interface is required. This thesis investigates three different kind of surfaces modelling commonly used biomaterials.

First, the hydrolytic stability of amino-functionalized surfaces was investigated. The amino-functionalization using self-assembled monolayers is required for the anchorage of molecules, macromolecules, colloidal systems and cells onto biomaterials. However, the lack of stability in aqueous media limits their use. In this manuscript, an amino-functionalized self-assembled monolayer made of aminoalkylsilane was grafted onto silicate substrates (silica and mica). The extreme robustness that we reported for this monolayer allows immersion into aqueous media for a wide range of pH and over long periods of time. The most important parameters that were identified that significantly impact the hydrolytic stability are the order of the monolayers, the grafting density and the length of the alkyl chain of the aminoalkylsilane.

Second, the lubricant properties in aqueous media of structured surfaces are reported. The need in self-lubricant surfaces is required in a wide variety of biomaterials such as the cartilage substitute, ocular medical device or catheters. Domed structures were produced on surfaces through immobilization of particles. Polymeric nanoparticles composed of pH-sensitive polyelectrolytes were used to prepared soft and deformable structures while the immobilization of silica particles allows hard structures to be created. Two main mechanisms controlling friction properties were identified. Friction properties of structured surfaces made of polyelectrolytes were controlled by the swelling and the water content of the particles. This swelling can be tuned by changing the pH of the aqueous media. An increase in particle swelling leads to a decrease in the friction coefficient. However, with the hard structures, the rolling of the particles in some cases can also lead to extremely low friction coefficient. In that case, the nature of the attachment of

the particle to the surface does not matter and systematic degrafting of some particles was observed which allows surfaces to slide with small friction forces.

Third, the complexation of a single-stranded siRNA through different interactions was investigated with model surfaces of various chemistry. The results show that ss-siRNA can adsorb onto hydrophilic (positively and negatively charged) as well as on hydrophobic substrates suggesting that the complexation can occur through hydrophobic interactions and hydrogen bonding in addition to electrostatic interactions. This study suggests that non-electrostatic interactions could be exploited to complement electrostatic interactions in the design of less toxic nanocarriers and that non-cationic nanovectors can be employed as a potential single-stranded siRNA delivery systems.

The results presented in this thesis contribute to increase the knowledge in the field of physico-chemistry surface properties of biological interfaces.

Keywords: *Biomaterials, Surface Forces Apparatus, amino-functionalization, hydrolytic stability, structured surfaces, nanoparticles, nanogels, friction, polyelectrolytes, molecular interactions, drug delivery systems.*

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Liste des tables	x
Liste des figures	xi
Liste des sigles, acronymes et abréviations utilisés	xvii
Contribution des auteurs	xxii
Remerciements	xxiv
Chapitre 1 : Introduction Générale	1
1.1 Les biomatériaux : Définitions et Concepts.....	2
1.2 Biomatériaux amino-fonctionnalisés	5
1.2.1 Applications biologiques des biomatériaux amino-fonctionnalisés	5
1.2.2 Amino-fonctionnalisation de surface	6
1.2.3 Structure d'une monocouche auto-assemblée amino-fonctionnalisée	7
1.2.4 Dépôt de monocouches amino-fonctionnalisées.....	8
1.2.5 Techniques de déposition.....	9
1.2.6 Les substrats de silicate.....	11
1.2.7 Les aminoalkylsilanes	13
1.2.8 Les besoins actuels en SAMs amino-fonctionnalisées	16
1.3 Biomatériaux autolubrifiants	19
1.3.1 Biomatériaux lubrifiants inspirés du vivant.....	20
1.3.2 Nanomatériaux autolubrifiants à base de polyélectrolytes	21
1.3.2.1 Les revêtements homogènes à base de polyélectrolytes	23
1.3.2.2 Les revêtements avec nano- ou micro-structures à motifs à base de polyélectrolytes.....	25
1.3.3 Modulations des propriétés physico-chimiques de surface des revêtements à base de polyélectrolytes	27
1.4 Biomatériaux pour la complexation d'oligonucléotides	38
1.4.1 La thérapie génique.....	38
1.4.2 Obstacles actuels à la délivrance d'ARNi.....	41
1.4.3 Les systèmes de vectorisation de siARN	43

1.4.3.1	Les vecteurs cationiques	44
1.4.3.2	Les nanovecteurs non-cationiques	46
1.4.4	Interactions non-électrostatiques des oligonucléotides.....	47
1.5	Objectifs et structure de la thèse	50
1.6	Références.....	52
Chapitre 2 : Technique expérimentale principale utilisée		68
2.1	L'appareil de mesure de forces de surface (SFA).....	69
2.1.1	Considérations générales	69
2.1.2	Mesure de la distance de séparation.....	71
2.1.3	Mesure de la force normale.....	73
2.1.4	Profil de forces.....	73
2.1.5	Mesure de la force latérale.....	75
2.1.6	Analyse des franges FECO	75
2.2	Références.....	76
Chapitre 3 : Amino-functionalized Monolayers Covalently Grafted to Silica-Based Substrates as a Robust Primer Anchorage in Aqueous Media.....		78
3.1	Contexte et résumé.....	79
3.2	Abstract.....	81
3.3	Introduction.....	82
3.4	Materials and Methods.....	84
3.4.1	Carboxyl-functionalized nanoparticle synthesis.	85
3.4.2	Self-assembled monolayers preparation.	85
3.4.2.1	Aminoalkylsilane grafting via vapor phase.	86
3.4.2.2	Aminoalkylsilane grafting via self-adsorption from solution.....	86
3.4.3	Nanoparticles deposition.....	87
3.4.3.1	Carboxyl-functionalized nanoparticle deposition on amino-functionalized mica.....	87
3.4.3.2	Sulfate-modified polystyrene nanoparticle deposition on surface.....	88
3.4.4	Surface characterization.....	88
3.5	Results and Discussion	91
3.5.1	Amino-functionalization of substrates.....	91

3.5.2	Surface charge of AUTES SAMs on mica.	95
3.5.3	Hydrolytic stability of amino SAMs on mica.	96
3.5.4	Reactivity of amino SAMs and subsequent hydrolytic stability of the immobilized system.	98
3.6	Conclusion	100
3.7	Acknowledgements.....	100
3.8	Supplementary material	101
3.8.1	X-Ray Photoelectron Spectrometry (XPS)	101
3.8.2	Hydrophobically-modified silica substrate	101
	103
3.9	References.....	104
Chapitre 4 : Lubrication with Soft and Hard Two-Dimensional Colloidal Arrays		
	107
4.1	Contexte et résumé.....	108
4.2	Abstract	109
4.3	Introduction.....	110
4.4	Experimental Section	112
4.4.1	Materials	112
4.4.2	Methodology.....	112
4.4.2.1	Polystyrene-poly(acrylic acid) (PS-PAA) Core:shell Nanoparticles (NP) Synthesis.	112
4.4.2.2	Size and Zeta Potential of Dispersed PS-PAA NPs.....	113
4.4.2.3	Structured Surfaces	113
4.4.2.4	Surface Characterization.....	115
4.5	Results and Discussion	117
4.5.1	Soft Nanodomed Surfaces.....	117
4.5.1.1	Characterization of NP Suspension	117
4.5.1.2	Surface Characterization.....	118
4.5.1.3	Normal Forces.....	120
4.5.1.4	Friction Forces	124
4.5.2	Hard Domed Structured Surfaces	129

4.5.2.1	Surface Characterization.....	129
4.5.2.2	Normal Forces.....	130
4.5.2.3	Friction Forces	133
4.6	Conclusion	137
4.7	Acknowledgements.....	138
4.8	Supporting Information.....	138
4.9	References.....	147
Chapitre 5 : Single Stranded siRNA Complexation through Non-electrostatic Interactions.....		151
5.1	Contexte et résumé.....	152
5.2	Abstract.....	153
5.3	Introduction.....	154
5.4	Materials and Methods.....	156
5.4.1	Liposome preparation	156
5.4.2	Micelle preparation	157
5.4.3	DDS characterization	157
5.4.4	ss-siRNA complexation with DDS and encapsulation efficiency	157
5.4.5	Surface preparation	159
5.4.6	Surface characterization.....	160
5.4.6.1	Atomic Force Microscopy (AFM)	160
5.4.6.2	Contact angle measurement	160
5.4.6.3	Zeta potential measurements on planar surfaces	161
5.4.6.4	Force-Distance measurements	161
5.5	Results and Discussion	162
5.5.1	Substrate characterization.....	162
5.5.2	ss-siRNA interactions with the surfaces	163
5.5.2.1	Mica surface.....	163
5.5.2.2	Hydrophobized-mica surface	166
5.5.2.3	Amino-functionalized mica surface	168
5.5.3	ss-siRNA interactions with DDS	170
5.6	Conclusion	177

5.7	Acknowledgements.....	178
5.8	Supplementary data.....	178
5.9	References.....	184
Chapitre 6 : Discussion Générale et Perspectives		189
6.1	Biomatériaux amino-fonctionnalisés	190
6.1.1	Caractérisation des SAMs amino-fonctionnalisées	190
6.1.2	Stabilité hydrolytique des SAMs amino-fonctionnalisées.....	192
6.1.3	Les SAMs amino-fonctionnalisées comme couche d’ancrage	193
6.2	Biomatériaux autolubrifiants	194
6.2.1	Préparation de surfaces structurées.....	195
6.2.2	Frottement entre deux surfaces structurées.....	196
6.2.3	Les biomatériaux lubrifiants et leurs perspectives pharmaceutiques.....	198
6.3	Biomatériaux pour la complexation d’oligonucléotide.....	200
6.3.1	Délivrance d’acides nucléiques simples brins vs doubles brins	200
6.3.2	Limites de la quantification d’oligonucléotides à l’aide de sonde fluorescente	201
6.3.3	Avantages et perspectives des vecteurs médicamenteux non-cationiques pour la délivrance d’acides nucléiques.....	202
6.4	Références.....	205
7	Chapitre 7 : Conclusion.....	208

Liste des tables

Table 1.1 : Structure chimique et abréviation de différents aminoalkylsilanes.	16
Table 1.2 : Polyélectrolytes utilisés pour le développement de biomatériaux.	22
Table 2.1 : Contrôleurs de distance du SFA 2000 et ses spécifications.....	71
Table 3.1 : Characterization of bare and amino-functionalized substrates	92
Table 5.1 : Characterization of the substrates.	163
Table 5.2 : Characterization of DDS formulations before and after ss-siRNA complexation in Milli-Q water	171
Table 5.S.1 : HPLC methods used for the quantification of the different lipids used in liposomal formulations.	183
Table 5.S.2 : Liposomal formulations.....	184

Liste des figures

Figure 1.1 : Représentation schématique de modifications chimiques de surface d'un système à libération contrôlée de médicaments.....	4
Figure 1.2 : Représentation schématique d'une monocouche auto-assemblée sur une surface plane.	8
Figure 1.3 : Représentation schématique de la formation par îlots et homogène d'une monocouche hautement ordonnée.....	8
Figure 1.4 : Diverses techniques de déposition d'une monocouche.....	10
Figure 1.5 : Représentation schématique d'un greffage chimique homogène d'alkylsilanes avec des groupements silanes trifonctionnalisés, monofonctionnalisés et agrégation d'alkylsilane trifonctionnalisés à la surface. Monocouche d'alkylsilanes trifonctionnalisés réticulée et partiellement greffée à la surface.	14
Figure 1.6 : Représentation de l'hydrolyse amino-catalysée intra- et inter-moléculaire pour trois types de SAMs composées d'aminoalkylsilanes aux structures différentes.....	18
Figure 1.7 : Représentation schématique de l'évolution de l'arthrose.....	19
Figure 1.8 : Représentation schématique des structures macromoléculaires « goupillon » de la lubricine, un protéoglycane et un agrécane.....	20
Figure 1.9 : Diverses conformation de brosses de polyélectrolytes greffés à la surface	20
Figure 1.10 : Différentes nanostructures rencontrées dans la nature.....	26
Figure 1.11 : Surface non structurée lisse et rugueuse et surface structurée.	27
Figure 1.12 : Représentation schématique du changement de conformation d'un polyélectrolyte avec le pH (cas d'un polyanion).	28
Figure 1.13 : Représentation schématique des conformations de polymères neutres greffés en bouts de chaîne à la surface en fonction de la densité de greffage. et des conformations adoptées par des polyélectrolytes greffés en bout de chaînes en fonction du pH pour une densité de greffage fixe (cas d'un polyanion).....	30
Figure 1.14 : Représentation schématique de revêtements structurés via l'immobilisation de micelles polymériques et de nanogels polymériques.....	32
Figure 1.15 : Représentation schématique de l'angle de contact d'une goutte d'eau sur un substrat plat.	33

Figure 1.16 : Représentation schématique de l'étalement d'une goutte d'eau sur une surface rugueuse selon le modèle de Cassie-Baxter et Wenzel.	34
Figure 1.17 : Représentation schématique de la force de cisaillement F_s au cours du glissement. Représentation schématique de deux surfaces lisses en contact et de deux surfaces structurées non-déformables et déformables..	35
Figure 1.18 : Brosses de polymères neutres et chargés sous l'effet d'une charge appliquée et d'un glissement.....	37
Figure 1.19 : Mécanismes de silençage génétique initié par les ARNi.....	40
Figure 1.20 : Représentation schématique des différents mécanismes de charge d'un nanovecteurs en acides nucléiques.....	44
Figure 2.1 : Représentation schématique de l'appareil de mesure de forces de surface. .	69
Figure 2.2 : Géométrie cylindres croisés et équivalence géométrique et mathématique.	70
Figure 2.3 : Principe de la mesure de distance à l'aide des franges FECO	72
Figure 2.4 : Principe de la mesure de la force normale (F_N). Dans cette représentation une force répulsive entre les deux surfaces est illustrée.	73
Figure 2.5 : Différentes natures d'interactions et leurs profils force-distance caractéristiques.....	74
Figure 2.6 : Principe de la mesure de la force latérale (de frottement), F_s	75
Figure 2.7 : Représentation schématique de la corrélation entre la forme des franges FECO observées SFA et la géométrie ou la topographie du contact.	76
Figure 3.1 : Schematic representation of APTES SAMs, AUTES SAMs and carboxyl-functionalized NPs covalently attached to amino SAMs immersed in water.	84
Figure 3.2 : AFM images in air of bare mica, APTES SAMs, AUTES SAMs and immobilized carboxyl-functionalized NPs	93
Figure 3.3 : Variation of θ_{water} on AUTES SAMs on mica prepared via self-assembling from solution as a function of AUTES concentration and immersion time	94
Figure 3.4 : Surface density of physisorbed sulfate-modified polystyrene NPs on AUTES SAMs from aqueous solution as a function of pH.	96

Figure 3.5 : Variation of θ_{water} on amino-functionalized mica substrates as a function of immersion time in water of various pH levels.	98
Figure 3.6 : Change in surface density of carboxyl-functionalized NPs attached on AUTES SAMs before immersion (initial) and after 7 days of immersion in pH 2, 6 and 10.	99
Figure 3.S.1 : AFM images in air of AUTES SAMs on mica prepared from vapor phase and with 1 mM AUTES solution and an immersion time of 6 hours	102
Figure 3.S.2 : AFM images in air of sulfate-modified polystyrene NPs physisorbed on: hydrophobized silica at pH 3, bare silica at pH 3, hydrophobized silica at pH 11, bare silica at pH 11 and AUTES SAMs at pH 5.	102
Figure 3.S.3 : AFM images in air of immobilized carboxyl-functionalized NPs on AUTES SAMs obtained using horizontal convective evaporation method	103
Figure 3.S.4 : AFM images in air of immobilized carboxyl-functionalized NPs before immersion, and after 72 h of immersion in aqueous solution at pH 4, pH 6 and pH 8. .	103
Figure 4.1 : Surface potential and size of dispersed and chemisorbed soft NPs as a function of pH for PAA-25% and PAA-80%.	118
Figure 4.2 : Surface topography of immobilized soft NPs.	119
Figure 4.3 : Force profiles, measured on the first compression between two identical soft NPs layers across water at different pH levels and AFM images in air of a reference surface used in SFA measurement prior to any experiment.	122
Figure 4.4 : Friction behavior between identical PAA-25% layers done at a sliding velocity of 1.6 $\mu\text{m/s}$	125
Figure 4.5 : Friction behavior between identical PAA-80% layers done at a sliding velocity of 1.6 $\mu\text{m/s}$ and Friction coefficient as a function of swelling ratio between two apposing soft NPs layers	126
Figure 4.6 : Elastic modulus (E) as a function of swelling ratio (Q) and friction coefficient (μ) between two identical apposing soft NPs layers.	128
Figure 4.7 : Force profiles, measured on the first and second compression between two identical chemisorbed hard particle layers across water and microscopic images in air of a reference surface used in SFA measurement prior to any experiment	131

Figure 4.8 : Friction force, F_s , as a function of the normal force, F_N across water between two identical surfaces of soft surface-immobilized layers of PAA and hard chemisorbed particle layers made of Si-8 and Si-07 134

Figure 4.S.1 : Hydrodynamic diameter distribution of dispersed PAA-25% and PAA-80% at pH 5 and 20 °C. 139

Figure 4.S.2 : AFM images in air of chemisorbed PAA-25% and PAA-80% for various NPs suspension from a NPs suspension..... 139

Figure 4.S.3 : Force profiles, measured on the first surface compression and decompression across water between two identical apposing soft NPs layers. Force profiles, measured on the first compression between two identical chemisorbed PAA-80% layers, 3.7 ± 0.4 NPs/ μm^2 , across water at different pH levels and AFM images in air of a reference surface used in SFA measurement prior to force measurements. 140

Figure 4.S.4 : Optical microscopy images in air of chemisorbed PAA-80% layers at a grafting density of 26 ± 2 NPs/ μm^2 before and after immersion in positively charged Si-8 aqueous suspension at pH 4 and pH 9. 141

Figure 4.S.5 : Images of mica FECO fringes in water after friction measurements between two apposing chemisorbed soft NPs layers 141

Figure 4.S.6 : Phase AFM images in air of chemisorbed PAA-25% after friction measurements. Phase and height AFM images in air of chemisorbed PAA-25% after 24 h of immersion in pH 11 and 10. 142

Figure 4.S.7 : Force profiles, measured on the first compression and after friction measurements between two identical soft NPs layers across water at different pH levels. 143

Figure 4.S.8 : Optical microscopy images in air of chemisorbed Si-8 using a solution of NHS/EDC at pH 7, a solution of TEA at pH 10 and of physisorbed Si-8 particles using a solution of NaOH at pH 7. Physisorbed Si-8 particles onto bare mica..... 144

Figure 4.S.9 : Force profiles, measured on the first compression and after friction measurements across water and microscopic and AFM images in air of a reference surface used in SFA measurement prior to force measurements.. 145

Figure 4.S.10 : Images of mica FECO fringes and microscopic images of surfaces with chemisorbed Si-8 layers before and after surface damaged caused by friction measurement

at sliding velocity of 20 $\mu\text{m/s}$. Friction force, F_s , between two apposing supported Si-8 layers as a function of sliding velocity and of normal load 146

Figure 5.1 : Normalized force profiles between two mica surfaces measured on the very first approach, across Milli-Q water and across the ss-siRNA solution and AFM images in air of mica before and mica after 20 h of immersion in the ss-siRNA solution followed by water rinsing..... 164

Figure 5.2 : Schematic representations of the conformation of adsorbed ss-siRNA on amino-functionalized mica, hydrophobized mica and bare mica deduced from surface force measurements and AFM images. 166

Figure 5.3 : Normalized force profiles between two hydrophobized mica surfaces, measured on the very first approach, across Milli-Q water and across the ss-siRNA solution after 2 h of immersion and AFM images in air of hydrophobized mica before and hydrophobized mica after 2 h of immersion in the ss-siRNA solution followed by water rinsing, 167

Figure 5.4 : Normalized force profiles between two amino-functionalized mica surfaces, measured on the very first approach, across Milli-Q water and across the ss-siRNA solution after 2 h of immersion and AFM images in air of amino-functionalized mica before and amino-functionalized mica after 2 h of immersion in the ss-siRNA solution following by water rinsing..... 169

Figure 5.5 : Normalized fluorescence intensity (%) of the dye/ss-siRNA system in Milli-Q water with DDS as a function of the lipid and copolymer concentrations for liposomes and micelles, respectively with their schematic representations. 172

Figure 5.6 : Normalized fluorescence emission spectra resulting from dye/ss-siRNA system in Milli-Q water in the presence of anionic liposomes, anionic micelles and uncharged micelles and fluorescence anisotropy (r) of the dye/ss-siRNA system without and with DDS..... 176

Figure 5.S.1 : Chemical structure and schematic illustration of ss-siRNA..... 179

Figure 5.S.2 : Variation of static water contact angle on hydrophobized-mica as a function of immersion time in Milli-Q water..... 179

Figure 5.S.3 : Normalized force profiles, measured on the first separation between two mica substrates, hydrophobized mica substrates and amino-functionalized mica substrates across Milli-Q water and across the ss-siRNA.	180
Figure 5.S.4 : Surface potential and hydrodynamic diameter of cationic micelles before and after complexation with ss-siRNA as a function of N/P ratio.....	181
Figure 5.S.5 : Fluorescence intensity spectra resulting from the dye alone, the dye/anionic liposomes mixture and the dye/ss-siRNA/anionic liposomes mixture	182
Figure 6.1 : Représentation schématique des propriétés tribologiques de surfaces molles et dures structurées et non structurées.	197
Figure 6.2 : Représentation schématique de surfaces composites à base silice et de PAA.	198
Figure 6.3 : Monocouche bimodale de PEG partiellement fonctionnalisée.	204
Figure 6.4 : Adsorption de NPs aux revêtements polymériques monomodals et bimodals fonctionnalisés avec un ligand sur des surfaces à diverses densités de récepteurs.....	204

Liste des sigles, acronymes et abréviations utilisés

α	Longueur de Kuhn
γ	Tension interfaciale
σ	Contrainte de cisaillement
ζ	Potentiel zêta de surface (<i>Surface zeta potential</i>)
κ^{-1}	Longueur de Debye (<i>Debye length</i>)
$\lambda_{\text{ex/em}}$	Longueur d'onde d'excitation et d'émission
μ	Coefficient de frottement
v	Volume exclu
θ_{eau}	Angle de contact de l'eau
ρ	Densité
ψ_0	Potentiel de surface
4-NBA	4-nitrobenzaldéhyde
AA	Acide acrylique (<i>Acrylic acid</i>)
ADN	Acide désoxyribonucléique (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
AEAPTES	N-(2-aminoéthyl)-3-aminopropyltriéthoxysilane
AEAPTMS	N-(2-aminoéthyl)-3-aminopropyltriméthoxysilane
AFM	Microscope à Force Atomique (<i>Atomic Force Microscope</i>)
AHAMTES	N-(6-aminohexyl)aminométhyltriéthoxysilane
ALG	Alginate
APDIPES	3-aminopropyldiisopropyléthoxysilane
APDMES	3-aminopropylméthyléthoxysilane
APTES	3-aminopropyltriéthoxysilane (<i>3-aminopropyltriethoxysilane</i>)
APTMS	3-aminopropyltriméthoxysilane
ARN	Acide ribonucléique (<i>Ribonucleic acid</i>)
AUTES	11-aminoundécyltriéthoxysilane (<i>11-aminoundecyltriethoxysilane</i>)
AUTMS	11-aminoundécyltriméthoxysilane
CSA	Chondroïtine sulfate A

d	Densité de greffage de brosses de polymères
D	Distance de séparation absolue
DAG	1-2-dioléoyl-sn-glycérol
DDS	Système à libération de médicaments (<i>Drug delivery systems</i>)
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMPG	1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phospho-(1-rac-glycérol) (sodium salt)
DNA	Acide désoxyribonucléique (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DOTAP	1,2-dioléoyl-3-triméthylammonium-propane (chloride salt)
DVB	Divinylbenzène
E	Module élastique (<i>Elastic modulus</i>)
E_{flat}	Énergie libre d'interaction par unité de surface entre deux surfaces planes (<i>Free energy of interaction per unit area between two infinite flat surfaces</i>)
EDC	N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthyl-carbodiimide
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EE (%)	Efficacité d'encapsulation (<i>Encapsulation efficiency</i>)
FDA	Administration de l'alimentation et des médicaments (<i>Food and drug administration</i>)
FECO	Franges d'ordre chromatique égal (<i>Fringes of Equal Chromatic Order</i>)
F_N	Force normale
F_S	Force de frottement
G	Facteur de correction de la fluorescence polarisée (<i>Correction factor of polarized fluorescence</i>)
Gel	Gélatine
HA	Acide hyaluronique
HCEM	Méthode d'évaporation par convection horizontale (<i>Horizontal convective evaporation method</i>)

l_B	Longueur de Bjerrum
KPS	Potassium persulfate
MEMS	Microsystème électromécanique (<i>Microelectromechanical systems</i>)
n	Indice de réfraction
NHS	N-hydroxysuccinimide
NPs	Nanoparticules (<i>Nanoparticles</i>)
PAA	Poly (acide acrylique) (<i>Poly (acrylic acid)</i>)
pb	Paire de nucléobase
PB	Polybétaine
PDI	Indice de polydispersité (<i>Polydispersity index</i>)
PDMAEA	Poly (2-[diméthylamine]éthyl méthacrylate)
PEG	Polyéthylène glycol (<i>Poly (ethylene glycol)</i>)
PEI	Polyéthylènimine
PLGA	Poly (acide glycolique co acide lactique)
PLL	Poly (L-lysine)
PNIPAM	Poly (N-isopropylacrylamide)
PM4VPI	Poly (N-méthyl-4-vinyl pyridinium iodide)
PMAA	Poly (méthylméthacrylate)
PS	Polystyrène
PTFE	Poly (tétrafluoroéthylène)
PVP	Poly (2-vinylpyridine)
Q	Ratio de gonflement (<i>Swelling ratio</i>)
r	Anisotropie de fluorescence (<i>Fluorescence anisotropy</i>)
r_f	Paramètre de rugosité de la surface mouillée
r_{rug}	Ratio de rugosité
R_F	Rayon de Flory
RISC	Complexe induisant le silençage
RMS	Écart quadratique moyenne (<i>Root Mean Square</i>)
RNA	Acide ribonucléique (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNaseP	Ribonucléase P

SAMs	Monocouches auto-assemblées (<i>Self-Assembled Monolayers</i>)
SFA	Appareil de mesure de forces de surface (<i>Surface Forces Apparatus</i>)
Si-07	Particules de silice de 700 nm de diamètre (<i>Silica particles of 700 nm diameter</i>)
Si-8	Particules de silice de 8 μm de diamètre (<i>Silica particles of 8 μm diameter</i>)
v	Vitesse de cisaillement (<i>Sliding velocity</i>)
TEA	Triéthanolamine
TOC	Carbone organique total (<i>Total Organic Carbon</i>)
XPS	Spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (<i>X-Ray Photoelectron Spectrometry</i>)

À ma mère, À Tifoise,

Contribution des auteurs

Cette thèse se base sur trois articles dont deux publiés et un en cours de révision. La contribution de chaque auteur est présentée ci-dessous :

Chapitre 3 : Amino-functionalized Monolayers Covalently Grafted to Silica-Based Substrates as a Robust Primer Anchorage in Aqueous Media

Lucie Giraud*, Rakini Nadarajah, Yasmine Matar, Gwénaëlle Bazin, Jing Sun, X.X. Zhu, Suzanne Giasson, *Applied Surface Science*, **2016**, 370C, 476-485.

La préparation des surfaces et leur caractérisation ont principalement été réalisées par Lucie Giraud avec l'aide de Rakini Nadarajah et Yasmine Matar (sous l'encadrement de Lucie Giraud). Jing Sun a préparé et caractérisé les surfaces d'APTES aux Figures 3.5 et 3.S.4. Gwénaëlle Bazin (sous la direction du Pr X.X Zhu) a synthétisé les NPs polymériques immobilisées sur les surfaces amino-fonctionnalisées. Le manuscrit a été préparé par Lucie Giraud et le Pr. Suzanne Giasson avec l'aide du Pr. X.X Zhu.

Chapitre 4 : Lubrication with Soft and Hard Two-Dimensional Colloidal Arrays

Lucie Giraud*, Gwénaëlle Bazin and Suzanne Giasson. Cette étude fait l'objet d'une publication en cour de révision pour publication dans *Langmuir*.

La préparation des surfaces et leur caractérisation ont été réalisées par Lucie Giraud. Gwénaëlle Bazin (sous la direction du Pr X.X Zhu) a synthétisé les NPs polymériques immobilisées sur les surfaces amino-fonctionnalisées. Le manuscrit a été préparé par Lucie Giraud et le Pr. Suzanne Giasson.

Chapitre 5 : Single Stranded siRNA Complexation through Non-Electrostatic Interactions

Lucie Giraud*, Warren Viricel, Jeanne Leblond, Suzanne Giasson, *Biomaterials*, **2017**, 113, 230–242.

La préparation des surfaces planes et leur caractérisation ont été réalisées par Lucie Giraud. La préparation des liposomes et leur caractérisation ont été réalisées par Warren Viricel (sous la direction de Jeanne Leblond-Chain) avec l'aide de Lucie Giraud. La préparation des micelles et leur caractérisation ont été réalisées par Lucie Giraud. Les mesures d'anisotropie de fluorescence ont été réalisées par Lucie Giraud. Le manuscrit a été préparé par Lucie Giraud et le Pr. Suzanne Giasson avec l'aide du Pr. Jeanne Chain-Leblond.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier ma directrice de recherche, la Professeure Suzanne Giasson de m'avoir accueillie et encadrée durant ces cinq années. Merci pour l'autonomie qu'elle a m'accordée ainsi que son enseignement. Je voudrais également souligner les formidables opportunités qu'elle m'a offertes de participer à de nombreux congrès me permettant d'élargir ma culture scientifique ainsi que mon réseau.

Je voudrais également remercier mon comité consultatif composé du Professeur Michel Lafleur et de la Professeure Jeanne Leblond-Chain pour nos rencontres annuelles. Ces moments ont été pour moi l'occasion de prendre le recul nécessaire et leurs conseils et encouragements m'ont permis d'envisager le travail restant avec enthousiasme. En dehors, de ces rencontres je tiens à les remercier tous deux pour leur disponibilité à discuter de mes résultats et pour leurs précieuses analyses.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres de mon jury de thèse ; la Professeure V. Gaëlle Roullin, le Professeur Michel Lafleur et la Professeure. Joyce Y. Wong pour avoir accepté d'évaluer ce manuscrit.

Je souhaite également souligner l'aide précieuse des co-auteurs des publications présentées dans ce manuscrit. Tout d'abord je tiens à remercier les Professeurs Jeanne Leblond-Chain et Julian Zhu pour leur implication. Je remercie également les Docteurs Gwénaëlle Bazin, Jing Sun et Warren Viricel. Je voudrais souligner aussi la contribution précieuse de Rakini Nadarajah et Yasmine Matar, deux stagiaires qui ont passé un été au laboratoire.

Bien sûr, je voudrais remercier l'ensemble des membres du groupe du Professeure Suzanne Giasson qui ont fait partie de ma vie durant ces années, en particulier Vivian Machado-Romero pour son infaillible bonne humeur qui m'a aidé plusieurs fois à retrouver le sourire, Olga Borozenko pour ses sages conseils, ainsi que Pierre Vialar-Trarieux et le Docteur Maxime Romain pour avoir apporté un peu d'animation dans les deux dernières années. Je tiens également à remercier tous les stagiaires d'été qui ont passé quelques mois à nos côtés.

Je voudrais aussi souligner l'aide inestimable des agents de recherche, en particulier Pierre Ménard-Tremblay et Patricia Moraille pour leurs formations sur les équipements du département de chimie. Leur disponibilité et leur soutien quotidien m'ont permis de travailler dans des conditions optimales.

L'excellence de l'atelier mécanique du département de chimie est le reflet de la disponibilité et la générosité des gens y travaillant. Yves Tesadale, Martin Lambert, Jean-François Myre et Louis Beaumont je tiens à vous remercier pour avoir réparé, construit et remplacé l'ensemble des appareils que je vous ai amené (et il y en a eu...).

Merci à ma famille et en particulier à ma mère qui m'a toujours encouragée et soutenue dans ce projet depuis le début. Je connais les sacrifices qu'elle a fait pour moi et je l'en remercie.

Enfin je finis en remerciant mon meilleur soutien de l'ombre, celui qui sait toujours comment m'encourager, me rassurer ou me changer les idées. Henri, merci d'avoir été là et merci pour la suite qui s'offre à nous.

Chapitre 1

Introduction Générale

1.1 Les biomatériaux : Définitions et Concepts

Cette thèse s'intéresse aux propriétés physico-chimiques de surface en milieu aqueux de substrats modélisant des surfaces de biomatériaux pour des applications variées. Les dernières générations de biomatériaux développées ne sont plus de simples dispositifs médicaux implantables aux propriétés inertes mais des matériaux complexes aux fonctionnalités multiples permettant de commander les interactions avec les milieux physiologiques. La surface d'un biomatériau étant la première zone de contact avec les milieux physiologiques, il est primordial de contrôler ses propriétés physico-chimiques à l'interface biologique.¹ Plusieurs surfaces modèles préparées et étudiées seront présentées tout au long de ce manuscrit.

Une des seules définitions existantes d'un biomatériau est celle adoptée lors de « *La Conférence de Chester de la Société Européenne des Biomateriaux* », dite conférence du consensus (1986). La définition retenue pour décrire les biomatériaux fut la suivante : "matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques". Ce concept semblait à l'époque se limiter aux matériaux implantables, les avancées en bio- et nanotechnologies ont forcé la définition à évoluer. Même si aucune définition formelle n'existe, il est largement admis que tout matériau mis en contact de manière prolongée ou non avec des tissus, fluides biologiques ou simulés à l'intérieur, à la surface ou à l'extérieur du corps peut être considéré comme un biomatériau. Ainsi, pourra être considéré comme biomatériau toute substance ou combinaison de substances synthétiques ou naturelles structurée ou non utilisée pour diagnostiquer, traiter, augmenter ou remplacer des tissus, organes ou une fonction de l'organisme. Cette définition élargie inclut donc : les dispositifs médicaux implantables, les matrices pour l'ingénierie tissulaire, les systèmes de diagnostics *in vitro* et *in vivo*, les matériaux pour la culture cellulaire, les systèmes à libération contrôlée de médicaments, les matériaux pour la biodétection *in vitro*.

L'efficacité d'un biomatériau implantable ou injectable est directement liée à la notion de biocompatibilité.¹ Au-delà de l'absence évidente de toxicité, pour être biocompatible un biomatériau doit interférer positivement avec le milieu biologique dans

lequel il se trouve. Aujourd'hui les propriétés des biomatériaux sont multiples et de nouvelles définitions telles que la bioactivité et la biointégration émergent. La biointégration se définit par une interaction forte entre le biomatériau implantable et le tissu hôte,¹ à l'opposé de la bioinertie qui tente de minimiser toute interaction. Pour être bioactif, un biomatériau doit de plus supplémenter des propriétés mécaniques et fonctions biologiques défaillantes, simuler la régénération du tissu hôte, libérer des actifs pharmaceutiques, permettre la visualisation de tissus ou cellules par imagerie médicale ou s'autodégrader sous l'action d'un stimulus ou non.

Les biomatériaux peuvent être préparés à partir d'une grande variété de composés, dépendamment de l'application envisagée. Les métaux et alliages métalliques sont très utilisés dans les matériaux implantables orthopédiques du fait de leurs bonnes propriétés mécaniques.^{2, 3} Les céramiques et amalgames (mercure lié à un autre métal) sont quant à eux couramment employés en odontologie.⁴ Certains tissus d'origine animale (valves porcines, carotides bovines, substituts osseux) peuvent également être implantés chez l'être humain pour substituer un tissu défaillant ou manquant.⁵ Actuellement, un grand nombre de biomatériaux sont développés à partir de polymères,^{6, 7} pouvant ainsi trouver des applications dans des domaines très variés (galénique,⁸ ophtalmologie,⁹ neurologie,¹⁰ cardiologie,¹¹ ingénierie tissulaire^{7, 12}). Les polymères employés peuvent être d'origine (i) naturelle et végétale (carraghénane,¹³ collagène,¹⁴ cellulose¹⁵) ou animale (soie d'araignée,¹⁶ gélatine,¹⁷ chitosane¹⁸) et (ii) synthétique (polyester,¹⁹ polytétrafluoroéthylène²⁰ polylactide²¹). Selon le polymère choisi, sa formulation et l'environnement physiologique dans lequel il se retrouve, le biomatériau implanté conservera ses fonctions pour une durée prolongée, on parle alors de bio-stabilité. Un biomatériau peut aussi se dégrader sous l'effet du temps ou d'un stimulus et sera alors dit bio-résorbable.

La surface des biomatériaux. L'ingénierie de nouveaux biomatériaux aux propriétés de surface contrôlées permet la création de matériaux hautement efficaces sans altérer leurs propriétés de cœur. Ainsi, la surface de matériaux implantables peut être modifiée de manière à moduler la mouillabilité, la lubrification, les propriétés mécaniques ou bien l'adhésion cellulaire.^{22, 23} De la même manière, la surface de systèmes à libération

contrôlée de médicaments peut être modifiée de manière à diminuer l'adhésion protéique^{24, 25} ou augmenter l'interaction avec des récepteurs extracellulaires membranaires.²⁸ Les modifications de surface peuvent être de deux types ; (i) chimiques avec l'ajout de groupements fonctionnels (NH₂, COOH, SH), de macromolécules polymériques ou bien via l'immobilisation de systèmes bioactifs (anticorps enzymes, ligands cellulaires, oligonucléotides)²⁶⁻²⁹ tels que présentés à la **Figure 1.1** et (ii) physiques comme les variations topographiques. Les modifications topographiques les plus étudiées actuellement visent à contrôler la rugosité de surface ainsi qu'à générer des nano-, micro-voire macrostructures de formes variées.^{22, 29-31} Les dernières générations de biomatériaux dites « intelligentes » possèdent des surfaces aux propriétés physico-chimiques modulables en réponse à un ou plusieurs stimuli extérieurs.³² Les stimuli utilisés peuvent être de nature chimique (enzyme, pH, force ionique, CO₂) ou bien physique (température, pression

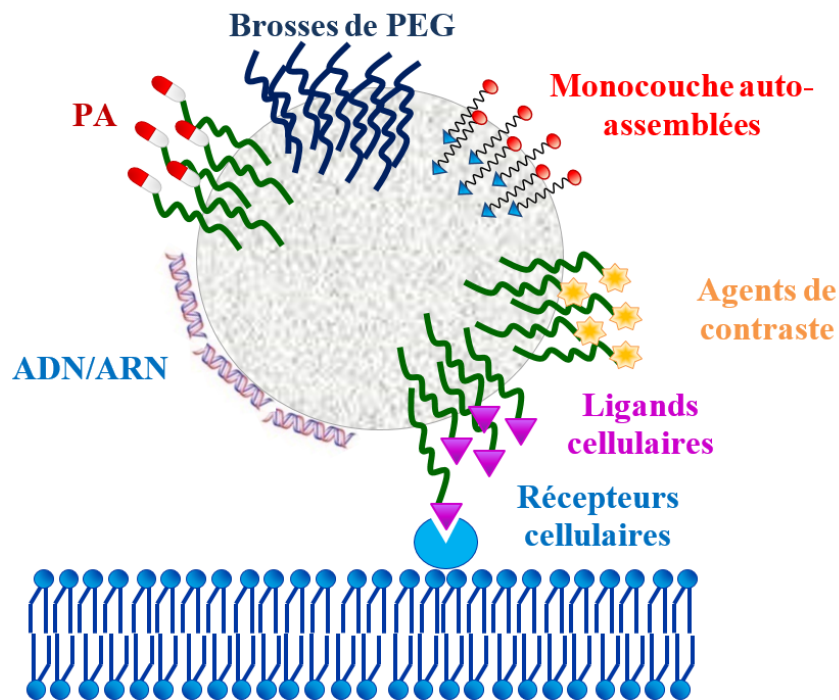


Figure 1.1 : Représentation schématique de modifications chimiques de surface d'un système à libération contrôlée de médicaments. (osmotique, champ magnétique).

Les interactions à l'échelle nanométrique. Le contrôle des propriétés de surface d'un biomatériau à l'interface biologique dépend des interactions du biomatériau avec les

systèmes physiologiques à l'échelle nanométrique.³³⁻³⁸ Le biomatériau peut interagir avec divers composés biologiques environnants, tels que les protéines, récepteurs membranaires, phospholipides, organelles, acide(*désoxy*)ribonucléiques (ADN, ARN) ou encore les fluides biologiques.^{36, 34} À l'échelle nanométrique, les interactions sont gouvernées par :³⁴ les forces de van der Waals et de déplétion; les interactions électrostatiques, hydrophobes et stériques ; les phénomènes de pontage hydrodynamique et de solvation; les liaisons hydrogène et les liaisons spécifiques ligand/récepteur. L'ensemble de ces interactions sont de portées variables mais majoritairement inférieures au micromètre.

1.2 Biomatériaux amino-fonctionnalisés

La fonctionnalisation de surface permet de modifier chimiquement la surface des matériaux sans altérer les propriétés de cœur de ceux-ci. Ce procédé est employé dans de nombreux domaines technologiques tels que l'ingénierie tissulaire,²⁸ l'électronique³⁹ ou bien le biomédical.⁴⁰⁻⁴² Dans le domaine biomédical, la fonctionnalisation et en particulier l' amino-fonctionnalisation, sont particulièrement étudiées pour l'investigation et le développement de biomatériaux implantables,⁴² de biosenseurs^{41, 43-45} ou de systèmes à libération contrôlée de médicaments.⁴⁶

1.2.1 Applications biologiques des biomatériaux amino-fonctionnalisés

La modification de la composition chimique de surface permet de moduler de nombreuses propriétés physico-chimiques de surface²³ parmi lesquelles : la réactivité chimique, la mouillabilité, la charge électrique de surface et l'adhésion.

Immobilisation de molécules et macromolécules. La réactivité chimique conférée par la présence de groupements aminés peut être une étape préalable à l'immobilisation de molécules, macromolécules ou systèmes bioactifs sur les biomatériaux implantables et injectables. Cette immobilisation peut être chimique ou bien physique. Le greffage covalent (via la création de liaisons amides⁴⁷ ou imines⁴⁸) est largement utilisé pour l'immobilisation de protéines,^{49,47} oligonucléotides,^{26, 27} cellules,^{42, 50} polymères^{51, 52} ou nanoparticules (NPs).⁵³⁻⁵⁵

L'immobilisation physique est largement utilisée pour la complexation de principe actif sur des biomatériaux implantables ou injectables (de type colloïdal).^{26, 27, 46} La possibilité d'ionisation des amines en milieu physiologiques permet la complexation de molécules anioniques via des interactions électrostatiques.^{26, 27} Ce type de complexation a été et est encore largement employé en thérapie génique pour charger des vecteurs médicamenteux colloïdaux en oligonucléotides de nature variée (plasmide, ARN, fragment d'ADN).^{26, 27} L'ionisation de la fonction amine permet de contrôler la charge et la délivrance du principe actif anionique complexé.⁵⁶ En effet, la forme protonée de l'amine permet de maintenir le principe actif complexé alors que la forme non protonée entraîne sa décomplexation. Les variations de pH au sein de l'organisme permettent alors de moduler l'ionisation du complexe, de manière à contrôler localement la libération du principe actif.

Biocompatibilité et biointégration. La biocompatibilité et la biointégration des matériaux implantables et injectables dépendent inévitablement des interactions avec les tissus avoisinants. La chimie de surface et en particulier l'enrichissement en groupements aminés, ont démontré la capacité de promouvoir l'adhésion cellulaire.⁵⁷⁻⁵⁹ Dans un second temps, l'amino-fonctionnalisation de surface permet d'influencer d'autres mécanismes cellulaires tels que la migration, la prolifération ou bien la différenciation cellulaire.⁵⁸ Cette colonisation cellulaire est mise à profit dans le développement de dispositifs médicaux implantables pour la régénération tissulaire ou pour les dispositifs de culture cellulaire.

Biodétection. Les surfaces amino-fonctionnalisées sont très largement développées pour la biodétection rapide de biomolécules.^{41, 43, 45, 47, 60} De faibles quantités de biomolécules peuvent être détectées à partir d'échantillons biologiques. Il a été rapporté que la sensibilité de détection dépendait de plusieurs facteurs tels que la densité en groupements aminés, la topographie, ou la charge de surface.^{45, 60}

1.2.2 Amino-fonctionnalisation de surface

L'amino-fonctionnalisation de surface peut être réalisée à partir de différentes stratégies comme le traitement au plasma d'azote,⁶¹⁻⁶³ la réaction chimique d'une fonction préexistante⁶⁴ et le dépôt de macromolécules polymériques amino-fonctionnalisées⁶⁵ ou de monocouche amino-fonctionnalisée.^{41, 48, 66, 67} La technique employée doit être sélectionnée

en fonction du matériau à fonctionnaliser (nature chimique et stabilité au traitement employé), de la densité en groupements aminés souhaitée (homogénéité et gradient), de la topographie de surface souhaitée (rugosité, porosité, nanostructure) et de l'utilisation envisagée (stabilité dans le temps, accessibilité des groupements aminés). Actuellement, l'amino-fonctionnalisation de surface via la déposition de monocouche est grandement employée.^{41, 48, 66, 67} Ce choix se justifie par sa facilité de préparation, la faible modification topographique apportée, ainsi que la possibilité de contrôler l'homogénéité et la densité en groupements aminés.⁶⁸

1.2.3 Structure d'une monocouche auto-assemblée amino-fonctionnalisée

L'auto-assemblage d'adsorbats sur des surfaces a été rapporté pour la première fois en 1946 par Zisman et *al.*⁶⁹ De cette étude, les auteurs ont montré la formation de films monomoléculaires à base de tensioactifs à longues chaînes alkyles sur différents types de surfaces. De nos jours, les monocouches auto-assemblées sont largement étudiées et peuvent se définir comme des structures bidimensionnelles hautement organisées qui se forment spontanément sur une surface, telles que présentées à la **Figure 1.2**. Les adsorbats formant les monocouches fonctionnalisées peuvent être linéaires^{26, 47, 48, 66, 70} ou aromatiques⁶⁸ et possèdent au minimum : (i) une extrémité avec une affinité spécifique pour la surface (groupe d'ancrage), (ii) une chaîne alkyle de longueur variable permettant l'organisation de la structure par interactions hydrophobes et de van der Waals et ayant le rôle d'espaceur entre la surface et le groupement terminal fonctionnel de surface (espaceur, **Figure 1.2**) et (iii) un groupement terminal fonctionnel exposé à la surface (**Figure 1.2**). Les longues chaînes alkyles (entre 10 et 18 carbones) permettent la formation de monocouches plus organisées et compactes que celles à chaînes plus courtes (de 3 à 6 carbones).⁷¹⁻⁷⁴ Les monocouches ayant des chaînes hydrocarbonées sous forme de cycles aromatiques peuvent également présenter des structures hautement ordonnées dû aux interactions de type empilement π entre les molécules voisines.⁶⁸

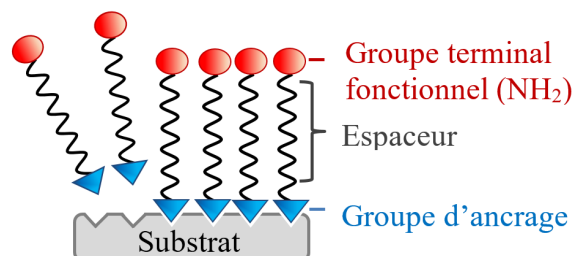


Figure 1.2 : Représentation schématique d'une monocouche auto-assemblée sur une surface plane.

L'étude cinétique du greffage de molécules à la surface a permis de mettre en évidence deux théories concernant la formation de monocouches auto-assemblées.^{75, 76} La première suggère qu'une monocouche se construit par germination via le greffage d'adsorbats regroupés formant des îlots (**Figure 1.3a**) jusqu'à recouvrement total de la surface (**Figure 1.3c**). La seconde théorie décrit un greffage relativement homogène mais désordonné (**Figure 1.3b**). La structure ordonnée se construit au fur et à mesure que la surface se recouvre en adsorbats (**Figure 1.3c**). Si ces deux théories s'opposent grandement, il semblerait qu'elles puissent se vérifier toutes les deux selon la nature de l'adsorbat, du substrat et des conditions de déposition.⁷⁵

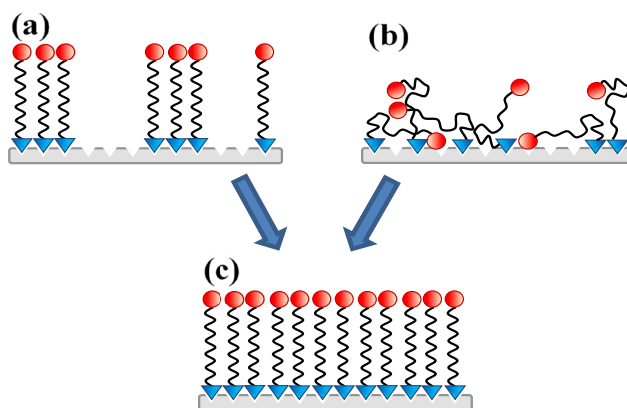


Figure 1.3 : Représentation schématique de la (a) formation par îlots et (b) de la formation homogène d'une (c) monocouche hautement ordonnée.

1.2.4 Dépôt de monocouches amino-fonctionnalisées

Dépôt physique. Le greffage d'une monocouche fonctionnalisée sur un substrat peut se faire via des interactions moléculaires de faible énergie ; on parle alors de physisorption.^{77, 78} Les interactions moléculaires les plus couramment employées sont les

interactions électrostatiques et hydrophobes. L'inconvénient majeur de ce type de déposition est le risque de dégreffage partiel ou total de la monocouche en fonction des conditions environnementales. Ceci peut alors entraîner le déplacement de la monocouche ou une variation de la densité de greffage sur le substrat. Cependant, cette instabilité a été mise à profit dans certaines applications spécifiques où l'auto-régénération de la monocouche permet de prolonger son temps de vie.⁷⁹

Dépôt chimique. Le greffage d'une monocouche fonctionnalisée sur un substrat peut également se réaliser via une liaison covalente.⁵³ Pour cela, la fonction d'ancrage de l'adsorbat réagit chimiquement avec un site réactionnel préexistant sur le substrat, on parle alors de chimisorption. La cinétique de réaction de cette liaison covalente guidera la cinétique d'adsorption de la monocouche à la surface.⁶⁶ Avec ce type de greffage, la densité maximale en adsorbats à la surface est plus ou moins limitée par le nombre de sites réactionnels présents sur le substrat. L'avantage de cette technique est que la liaison entre l'adsorbat et la surface est plus forte, permettant une immobilisation plus robuste. Cette stabilité d'ancrage peut s'avérer essentielle selon les conditions environnementales d'utilisation (solvant, température, pH, charges appliquées, forces de cisaillement).

1.2.5 Techniques de déposition

Plusieurs techniques de déposition peuvent être employées pour greffer des monocouches sur des substrats plats. L'ensemble des techniques présentées ci-après conviennent pour l'immobilisation d'aminoalkylsilanes sur des substrats de silicate et sont également appropriées pour une très large gamme de couples adsorbat/substrat, que ce soit pour des greffages chimiques ou physiques.

Déposition par transfert. Les dépositions par transfert de films telles que les techniques Langmuir/Blodgett ou Langmuir/Schaeffer permettent la formation d'une monocouche par transfert d'un film monomoléculaire se formant à l'interface eau/air (**Figure 1.4a et b**).⁸⁰ Ce film monomoléculaire peut être comprimé à la densité souhaitée avant d'être transféré sur le substrat permettant un fin contrôle de la densité en adsorbats. Ces techniques présentent l'avantage de former des monocouches très homogènes de densité variable et contrôlable. Cependant, ces techniques sont limitées à la formation de

monocouches de molécules amphiphiles et nécessitent une forte affinité entre le groupement d'ancrage et la surface lors du transfert. Si la densité de recouvrement peut être aisément contrôlée, les couches produites à l'aide de ces techniques peuvent présenter des agrégats.⁸¹

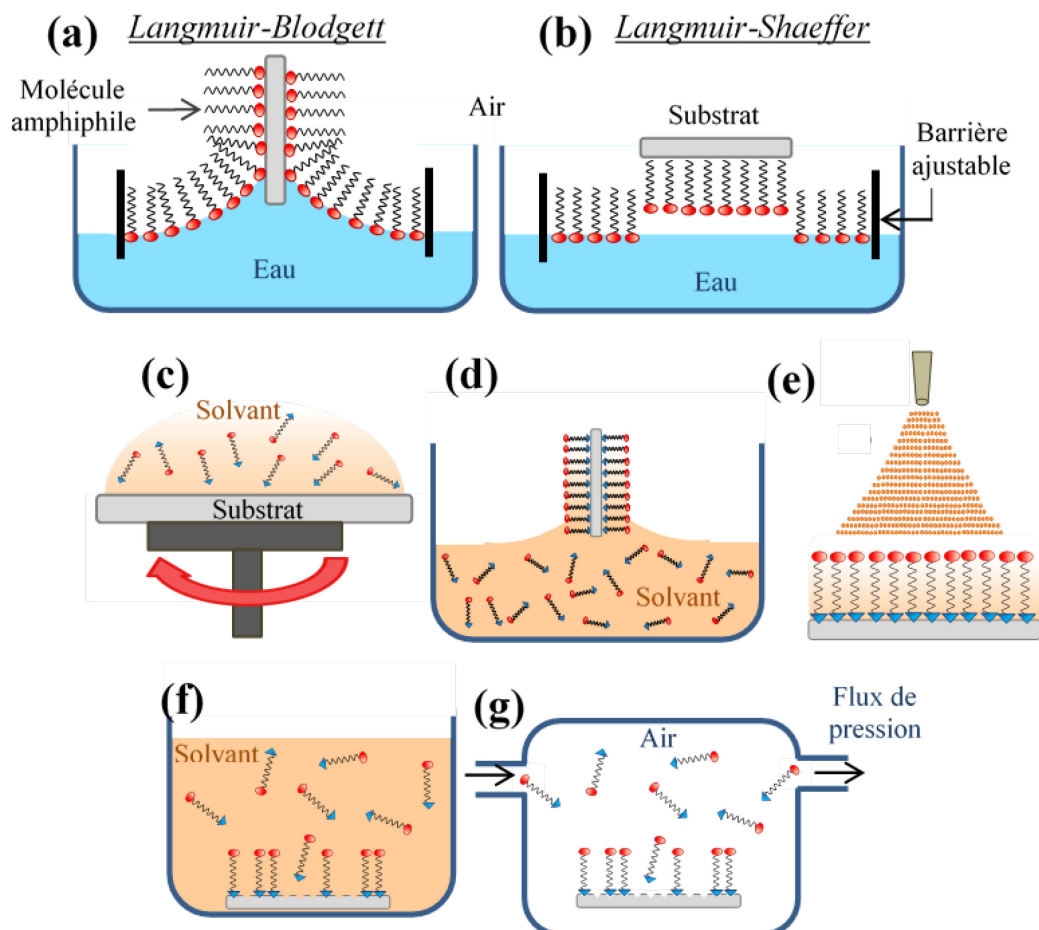


Figure 1.4 : Déposition d'une monocouche par transfert (a) Langmuir-Blodgett et (b) Langmuir-Schaeffer et via évaporation de solvant par (c) rotation, (d) trempage, (e) pulvérisation ainsi qu'auto-assemblage en phase (f) liquide et (g) vapeur.

Déposition par évaporation de solvant. Les techniques de déposition par évaporation de solvant reposent sur le greffage d'adsorbats à partir d'une solution, suivi de l'évaporation rapide du solvant. Dans l'ensemble, elles nécessitent toutes la solubilisation de l'adsorbat dans un solvant relativement volatil. La technique de déposition par rotation rapide (dépôt à la tournette, *spin coating*) consiste à déposer une solution d'adsorbat sur un substrat plat, avant d'en évaporer le solvant par rotation rapide (**Figure 1.4c**).⁸² La technique de déposition par trempage (*dip coating*), consiste à immerger le substrat dans

une solution d'adsorbat et de le retirer à vitesse et angle contrôlés avant d'évaporer le solvant par séchage (**Figure 1.4d**).⁸³ Enfin, la technique de déposition par pulvérisation (*spray drying*) consiste à pulvériser une solution d'adsorbats en finissant par l'évaporation du solvant par séchage (**Figure 1.4e**). Ces techniques par évaporation de solvant sont très largement utilisées car elles sont faciles à mettre en place. Cependant, les monocouches obtenues sont généralement moins homogènes et des agrégats peuvent facilement être observés.⁸³

Déposition par auto-assemblage en phase liquide et vapeur. Les techniques de déposition par auto-assemblage en phase liquide ou vapeur sont les techniques les plus utilisées pour former des films minces et homogènes sur des substrats plats, on parle alors de monocouches auto-assemblées (*Self-Assembled Monolayer*, SAMs).^{48, 66, 67, 70, 84, 85} L'auto-assemblage en phase liquide consiste à immerger le substrat dans une solution d'adsorbats à une concentration et pour un temps donnés. (**Figure 1.4f**). En plus d'être simple à mettre en œuvre, cette technique peut être avantageuse dans les cas où la cinétique d'adsorption de l'adsorbat est lente. En effet, cette technique permet des temps d'immersion prolongés et n'est donc pas limitée aux adsorbats présentant des cinétiques d'adsorption rapides, comme il est nécessaire pour les techniques de déposition par transfert ou évaporation de solvant. De plus, un certain contrôle dans la densité de greffage peut être obtenu en modulant la concentration de la solution d'immersion⁸³ ainsi que le temps d'immersion.⁸⁴ L'auto-assemblage en phase vapeur, en revanche, nécessite obligatoirement la présence de l'adsorbat en phase gazeuse pour pouvoir être greffé sur le substrat (**Figure 1.4g**). Pour atteindre la pression de vapeur saturante, cette technique peut nécessiter des conditions extrêmes de pression et de température pouvant être difficilement atteignables en pratique. C'est pourquoi elle est souvent limitée aux molécules possédant des pressions de vapeur saturante faibles sous conditions ambiantes (25 °C, 1 bar). L'avantage majeur du dépôt par auto-assemblage en phase vapeur est qu'il permet l'obtention de monocouches extrêmement homogènes avec peu d'agrégats.⁸⁴

1.2.6 Les substrats de silicate

L'adsorption de molécules amino-fonctionnalisées peut théoriquement être réalisée sur tout type de surface, à la condition que l'adsorbat possède une extrémité avec une haute

affinité pour la surface receveuse. Les combinaisons adsorbat/surface les plus utilisées et étudiées sont les alkylsilanes sur des surfaces de silicate oxydées^{48, 66, 67, 70, 71, 86-91} et les alkylthiols sur de l'or^{41, 91-93}. Les alkylsilanes et les alkylthiolates possèdent une très grande affinité pour les substrats de silicate et d'or respectivement, facilitant leur immobilisation.

L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit utilise des substrats de silicate, plus spécifiquement de mica et de silice, pour l'immobilisation de monocouches auto-assemblées d'aminoalkylsilanes. Les substrats de silicate sont très utilisés dans le domaine biomédical en tant que substrats de biosenseurs^{43, 47} ou systèmes à libération contrôlée de médicaments.^{46, 56, 94} De plus, ces types de substrats sont aussi grandement employés pour l'étude fondamentale des interactions de surface de biomatériaux modélisés.

Les gaufres de silicium. Les gaufres de silicium sont des plaques de silicium rigides et opaques de faible rugosité, présentant à leur surface une couche d'oxyde de silicium, SiO₂. En l'absence de traitement spécifique, la silice présente des groupements silanols (5 Si-OH/100 Å²)^{95, 96} relativement stables sous conditions ambiantes, rendant la surface parfaitement mouillable à l'eau.⁹⁷ Les silanols sont des sites réactionnels potentiels permettant d'établir des liaisons covalentes avec des adsorbats capables de réagir avec ces derniers. Les silanols peuvent réagir chimiquement avec une grande variété de groupements, parmi lesquels les alcoxysilanes,^{48, 68, 85} chlorosilanes⁷¹ ou hydroxyles⁹⁸ et acides organophosphoniques.⁹⁹ Les silanols peuvent également s'ioniser totalement ou partiellement à des pH ≥ pKa conférant ainsi une charge négative au substrat.¹⁰⁰ Dans l'eau (à pH 5), le potentiel zêta de surface de NPs de silice non modifiée a été rapporté être proche de -45 mV.¹⁰¹ Cette charge de surface est également grandement employée pour l'immobilisation de molécules ou systèmes cationiques via des interactions électrostatiques fortes. La densité de surface des groupements silanols peut également être augmentée via l'utilisation de traitements appropriés, tel qu'une solution de Piranha⁹⁹ ou un plasma Ar/O₂.¹⁰²

Le mica. Le mica est un aluminosilicate naturel dont la structure en feuillets permet un clivage des différentes couches jusqu'à l'obtention de substrats transparents. Le mica est conventionnellement considéré comme relativement inerte. Cependant, tout comme

pour les gaufres de silicium, des groupements SiOH sont naturellement présents à la surface du mica, mais en plus faible quantité que sur les gaufres de silicium. On estime à 11% la proportion d'atomes de silice porteurs d'un groupement hydroxyle sur des substrats de mica fraîchement clivés.⁷¹ Il est également possible d'augmenter la proportion de groupements silanols à la surface du mica, de manière à maximiser le greffage physique ou chimique de molécules. Une technique utilisée pour générer ces groupements est un traitement plasma d'un mélange eau/Ag.⁷¹ Cette technique permet de tripler la quantité de silanols à la surface. Cependant, ces groupements Si-OH additionnels sont très instables et disparaissent rapidement dans le temps. Il est donc primordial de les faire réagir rapidement. Clivés en fins feuillets, les substrats de mica sont transparents et malléables et leur rugosité est quasiment lisse à l'échelle atomique (l'écart quadratique moyenne, RMS, est inférieure 0.2 nm).^{103, 104} Cette faible rugosité peut même être maintenue après un traitement au plasma sous certaines conditions contrôlées.¹⁰⁴ L'ensemble de ces propriétés en fait le matériau de choix pour les mesures de forces de surface à l'aide d'un appareil de mesure de forces de surface (*Surface Forces Apparatus*, SFA) et sera discuté au **Chapitre 2**.

1.2.7 Les aminoalkylsilanes

Groupement d'ancrage. Pour greffer chimiquement des monocouches auto-assemblées sur des substrats d'oxyde de silice, les molécules fonctionnalisées en bout de chaîne avec des groupements alcoxysilanes et chlorosilanes sont les plus couramment utilisées^{48, 68, 85, 71} Ces molécules créent une liaison siloxane ($\text{Si}_{\text{substrat}}\text{-O-Si}_{\text{adsorbat}}$) avec la surface. La nature chimique des groupements d'ancrage peut légèrement influencer la cinétique de greffage ainsi que la solubilité de l'alkylsilane ou aminoalkylsilane dans un solvant donné.⁶⁶ De plus, les groupements alcoxysilanes volumineux auront tendance à légèrement diminuer la densité de greffage des SAMs formées par rapport à des alkylsilanes aux groupements terminaux moins encombrants.⁷⁰

Les extrémités d'ancrage (groupement silanes) peuvent être également mono- ou plurifonctionnelles (bi- ou tri-fonctionnelles).^{66, 67, 70, 84, 86} Dépendamment de la fonctionnalité de l'adsorbat, la liaison covalente entre l'adsorbat et la surface peut alors

être unique ou multiple. Dans le cas d'un adsorbat au groupement silane trifonctionnel (triéthoxysilane ou triméthoxysilane, **Table 1.1**), des liaisons chimiques peuvent également se faire avec les molécules voisines adjacentes, formant ainsi un réseau réticulé bidimensionnel (**Figure 1.5a**) contrairement à une monocouche d'adsorbats aux groupements silanes monofonctionnels (**Figure 1.5b**). Ce réseau bidimensionnel a également été rapporté pour être très faiblement dépendant de la concentration en groupement Si-OH à la surface.⁹⁶ Dans le cas d'un greffage maximal, la quantité d'alkylsilanes aux groupements d'ancrage monofonctionnalisés greffés peut se rapprocher de la quantité de silanols présents à la surface tels que présentés à la **Figure 1.5b**. En revanche, dans le cas d'un silane au groupement d'ancrage trifonctionnalisés le nombre d'alkylsilanes greffés peut dépasser la quantité de silanols présents à la surface. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire, pour obtenir une monocouche stable, de lier chimiquement toutes les molécules à la surface, tel que présenté à la **Figure 1.5c**. En revanche, les

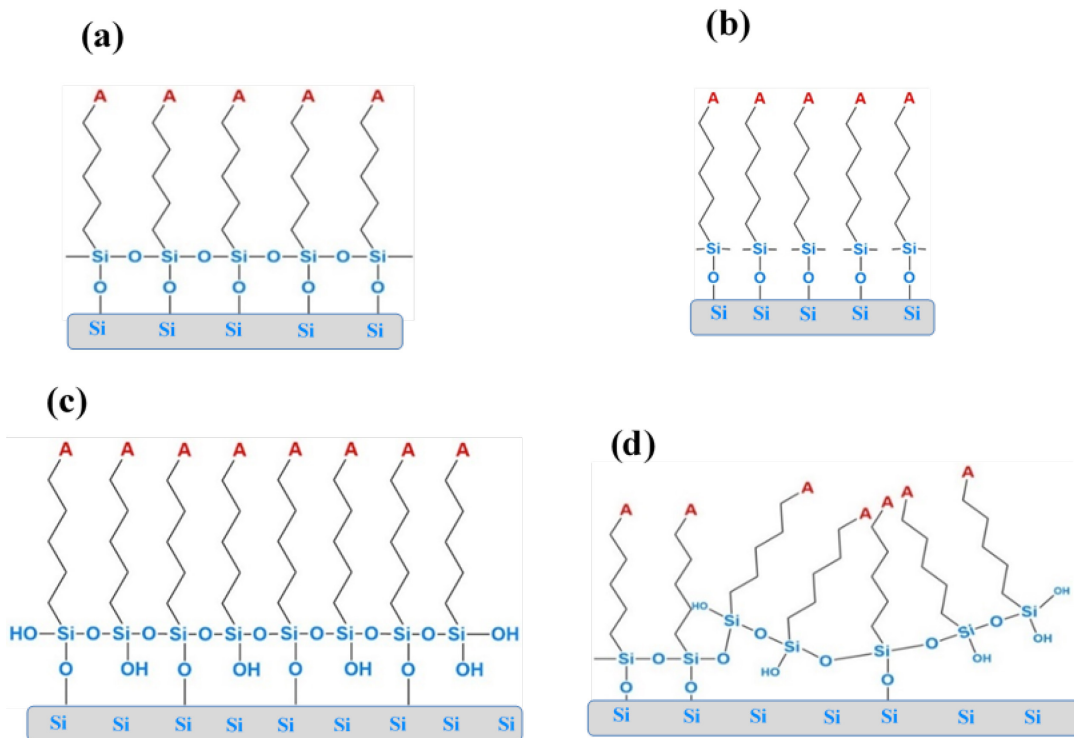


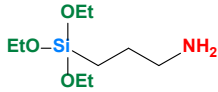
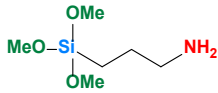
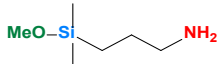
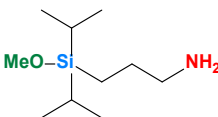
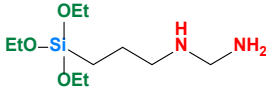
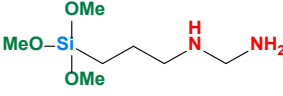
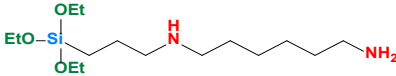
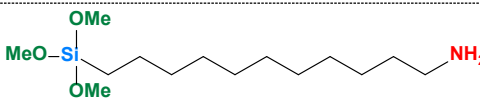
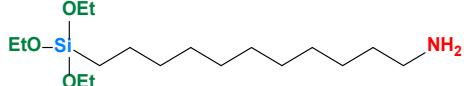
Figure 1.5 : Représentation schématique d'un greffage chimique homogène d'alkylsilanes avec des groupements silanes **(a)** trifonctionnalisés (ex : triéthoxysilane) et **(b)** monofonctionnalisés (ex : diméthyléthoxysilane). **(c)** Monocouche d'alkylsilanes trifonctionnalisés réticulée et partiellement greffée à la surface. **(d)** Agrégation d'alkylsilanes trifonctionnalisés à la surface.

alkylsilanes et aminoalkylsilanes aux groupements d'ancrage trifonctionnels peuvent induire des réactions de polymérisation, en particulier en solution, provoquant la formation d'imperfections et d'agrégats à la surface des substrats⁶⁶ tels que représentés à la **Figure 1.5d**.

Groupements aminés terminaux. Pour obtenir des SAMs amino-fonctionnalisées, deux approches peuvent être employées. La première consiste à greffer des SAMs composées d'adsorbats bifonctionnels avec un groupement fonctionnel terminal et un groupement d'ancrage au substrat. Le groupement fonctionnel terminal pourra ensuite réagir pour former une amine.^{64, 105} Cette stratégie présente l'avantage de pouvoir greffer par exemple des alkylsilanes bifonctionnels avec des espaceurs aux structures plus complexes. Dans un second temps, il est possible de faire réagir le groupement terminal pour obtenir une amine. Cette approche a pour principale limite des taux de conversion inférieurs à 100%, exposant à la surface des groupements fonctionnels autres qu'aminés. La deuxième approche consiste à greffer directement un aminoalkylsilane préalablement synthétisé. Cette approche est beaucoup plus simple et est significativement plus employée que la première et sera utilisée dans ce manuscrit pour former des monocouches d'aminoalkylsilanes.^{66, 70}

Aminoalkylsilanes courants. A l'heure actuelle, les aminoalkylsilanes les plus couramment employés possèdent des chaînes alkyles relativement courtes, le plus souvent à trois carbones, voire six carbones plus exceptionnellement.^{49, 67, 70, 84, 89, 91} Ces molécules peuvent posséder des groupements d'ancrage mono-, bi- ou tri-fonctionnels avec des groupements alcoxysilanes (éthoxy- ou méthoxy-silanes). Plus récemment, l'emploi d'aminoalkylsilanes à base de longues chaînes carbonées (10-11 carbones) a été rapportés mais leur utilisation reste encore marginale.^{47, 106} Quelques exemples de ces aminoalkylsilanes précédemment décrits sont présentés à la **Table 1.1**.

Table 1.1 : Structure chimique et abréviation de différents aminoalkylsilanes.

Nom chimique	Acronyme	Structure
3-aminopropyl triéthoxysilane	APTES	
3-aminopropyl triméthoxysilane	APTMS	
3-aminopropyl diméthyléthoxysilane	APDMES	
3-aminopropyl diisopropyléthoxysilane	APDIPES	
N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltriéthoxysilane	AEAPTES	
N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltriméthoxysilane	AEAPTMS	
N-(6-aminohexyl) aminomethyltriéthoxysilane	AHAMTES	
11-aminoundecyl triméthoxysilane	AUTMS	
11-aminoundecyl triéthoxysilane	AUTES	

1.2.8 Les besoins actuels en SAMs amino-fonctionnalisées

La stabilité en milieux biologiques : En milieu physiologiques, les SAMs amino-fonctionnalisées sont exposées à un milieu aqueux de pH et de force ionique variables à une température fixe de 37 °C. Si les SAMs composées d'alkylsilanes et d'aminoalkylsilanes sont parmi les plus thermostables,^{87, 107} leur stabilité hydrolytique est cependant plus contraignante.^{47, 66, 67, 71, 108} En effet, la liaison $\text{Si}_{\text{substrat}}-\text{O}-\text{Si}_{\text{adsorbat}}$ est facilement hydrolysable, limitant considérablement la durée de vie de la SAMs en milieu aqueux. En conditions extrêmes de pH, et plus particulièrement pour les pH acides, l'hydrolyse des liaisons $\text{Si}_{\text{substrat}}-\text{O}-\text{Si}_{\text{adsorbat}}$ est plus rapide. Ainsi, les SAMs à base d'alkylsilanes et d'aminoalkylsilanes greffées sur des substrats d'oxyde de silice peuvent se dégreffer en quelques heures une fois immergées dans l'eau.

La fonction amine des aminoalkylsilanes peut également influencer la cinétique d'hydrolyse de la liaison de surface $\text{Si}_{\text{substrat}}\text{-O-Si}_{\text{adsorbat}}$.^{67-68, 107} En effet, il a été démontré à plusieurs reprises que les groupements aminés peuvent catalyser de manière intra- et intermoléculaire la formation de la liaison Si-O-Si (réaction de silanisation) mais aussi l'hydrolyse de cette même liaison. La catalyse de la réaction de silanisation facilite l'attachement des aminoalkylsilanes à la surface comparativement à leurs homologues non-fonctionnels.¹⁰⁹ En revanche, la catalyse de l'hydrolyse de la liaison siloxane rend ces amino-SAMs plus sensibles au dégreffage que lorsque composées uniquement d'alkylsilanes. De plus, la longueur de la chaîne alkyle des aminoalkylsilanes peut s'avérer essentielle dans la mesure où la formation d'un cycle stable à cinq atomes favorisera l'hydrolyse intramoléculaire de la liaison Si-O-Si,⁶⁶ telle que présentée à la **Figure 1.6**. La majorité des aminoalkylsilanes utilisés actuellement possèdent des chaînes alkyles de trois à six atomes de carbone pouvant favoriser la formation de ce cycle à cinq et justifiant ainsi la faible stabilité en milieu aqueux largement rapportée.⁶⁶

La pénétration de l'eau au sein de la monocouche est directement corrélée à la longueur de la chaîne alkyle des alkylsilanes composant la SAMs.^{47, 71, 91} Plus la longueur de la chaîne sera élevée, plus la structure sera ordonnée et plus les interactions hydrophobes entre molécules adjacentes seront favorisées. Cette barrière hydrophobe minimise alors la pénétration de la monocouche par l'eau, protégeant la liaison $\text{Si}_{\text{substrat}}\text{-O-Si}_{\text{adsorbat}}$ de l'hydrolyse. De plus, il a été rapporté que la fonctionnalité de surface des SAMs pouvait diminuer l'ordre de compaction des adsorbats composant ces SAMs par rapport à des SAMs non-fonctionnalisées.¹⁰⁹ Ceci provient de la présence de groupements hydrophiles terminaux diminuant les interactions hydrophobes.

La réticulation des SAMs permet également d'augmenter la stabilité en milieu aqueux.⁶⁶ En effet, comme énoncé précédemment, la réticulation via des liaisons $\text{Si}_{\text{adsorbat}}\text{-O-Si}_{\text{adsorbat}}$ entre molécules adjacentes permet d'assurer le maintien de l'ensemble de la couche et ce, même si toutes les molécules ne sont pas reliées au substrat.

Contrôle de la densité de greffage. La densité de surface en groupements aminés est un paramètre clef dans la mesure où elle impacte directement la quantité, la

conformation et les propriétés physico-chimiques des systèmes subséquemment immobilisés (molécule, polymère, colloïdes ou cellules).^{52, 86} Selon les applications envisagées, cette densité doit être homogène à l'échelle nano-, micro- voire macroscopique de manière à obtenir des propriétés physico-chimiques similaires sur l'ensemble de la surface. Dans le cadre des applications de détection de biomolécules, des densités de surface élevées en groupements aminés permettent une haute sensibilité des systèmes de détection.⁴⁷ Les densités de surface maximales rapportées pour des amino-SAMs ne dépassent généralement pas les 3-6 molécules/nm²^{48, 68, 85, 86, 110} et des densités plus élevées sont rarement atteignables.²⁶ De plus, les difficultés à mesurer cette densité de manière fiable ne permet pas de comparaison entre les différentes études. Au cours des travaux de cette thèse, une méthode indirecte de quantification des aminoalkylsilanes immobilisés sur des substrats de mica a été utilisée et a permis de mettre en évidence les conditions optimales de préparation permettant un contrôle de la densité de greffage.

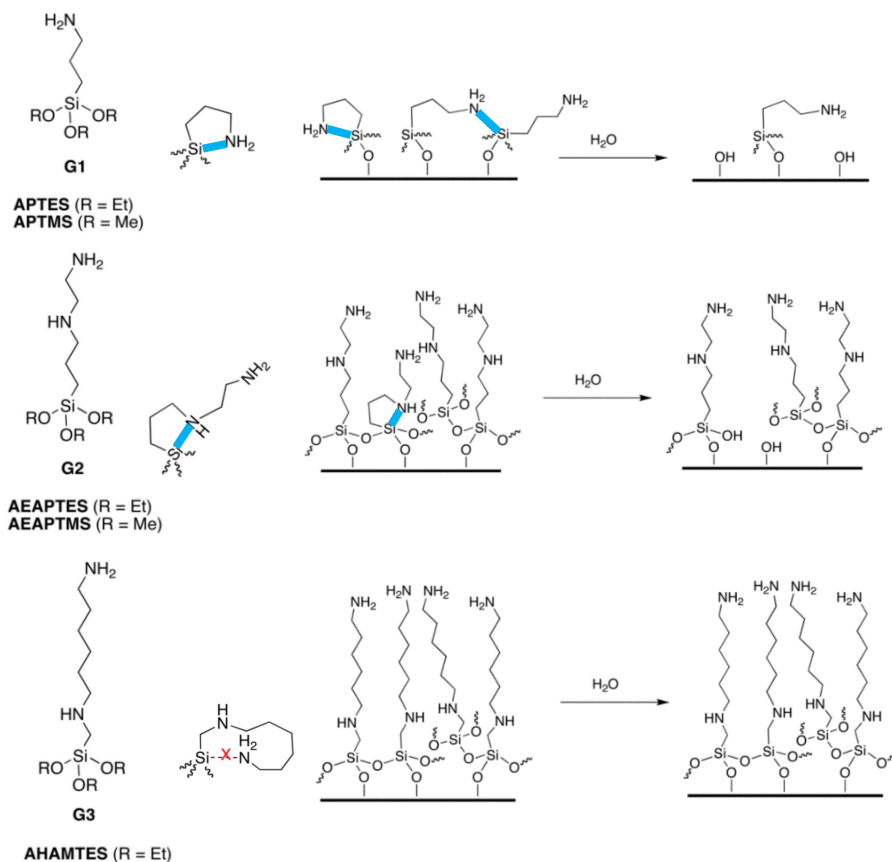


Figure 1.6 : Représentation de l'hydrolyse amino-catalysée intra- et inter-moléculaire pour trois types de SAMs composées d' aminoalkylsilanes aux structures différentes. (Figure reproduite avec permission à partir de la référence 67, Copyright © 2008, American Chemical Society).

1.3 Biomatériaux autolubrifiants

En milieu biologiques, la biolubrification s'opère entre deux surfaces en mouvement au travers de l'eau. Le besoin en surfaces autolubrifiantes est entre autres nécessaire dans le développement de lentilles cornéennes¹¹¹ et de revêtements pour cathéters et autres dispositifs tubulaires.¹¹² Cependant, la grande majorité des études concernant les surfaces autolubrifiantes vise à remplacer ou supplémer les tissus lésés par des pathologies telles que l'arthrose pour développer de nouveaux revêtements pour implants articulaires,^{40, 113} substituts cartilagineux^{112, 114} et substituts injectables de liquide synovial.¹¹⁵

L'arthrose est une inflammation aiguë ou chronique des articulations. Les articulations humaines saines présentent des propriétés lubrifiantes exceptionnelles. En mouvement, les surfaces cartilagineuses articulaires présentent un coefficient de frottement (μ) extrêmement faible ($0.001 < \mu < 0.03$) avec peu d'endommagement, même sous des charges appliquées élevées ($\sim 135 \text{ MPa}$ ¹¹⁶) et ce même après plusieurs cycles de charge/décharge ($\leq 10^8$).^{117, 118} Le liquide synovial présent entre les deux surfaces cartilagineuses assure la bonne lubrification des surfaces en mouvement perpétuel. Lorsque la quantité de liquide synovial s'amointrit ou bien que sa composition varie, la lubrification n'est plus assurée et les cartilages articulaires s'endommagent, engendrant l'inflammation de la capsule articulaire (**Figure 1.7**).

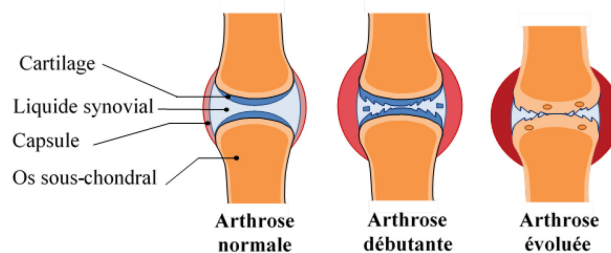


Figure 1.7 : Représentation schématique de l'évolution de l'arthrose.

1.3.1 Biomatériaux lubrifiants inspirés du vivant

La grande majorité des nano-biomatériaux autolubrifiants développés s'inspire de la structure cartilagineuse des articulations humaines et de la composition du liquide synovial.^{113-115, 118-121} Le cartilage sain est un tissu s'apparentant à un hydrogel multifonctionnel.¹¹⁴ Cet hydrogel permet la rétention d'une grande quantité d'eau, aidant la lubrification et supplémentant les propriétés du liquide synovial. Le liquide synovial quant à lui est un milieu aqueux dans lequel sont suspendus des chondrocytes mais aussi des macromolécules telles que la lubricine, les protéoglycane et l'acide hyaluronique qui peuvent former des architectures complexes en s'associant (agrécane).¹¹⁹ Ces macromolécules hautement chargées négativement possèdent une architecture polymérique de type « goupillon » (*bottle brush*), tel que représenté à la **Figure 1.8**.¹²² L'architecture « goupillon » des macromolécules du liquide synovial semble jouer un rôle sur les propriétés lubrifiantes des articulations humaines¹²² grâce à la haute viscosité due au haut poids moléculaire de ces macromolécules, les répulsions électrostatiques entre les charges négatives supportées par les polysaccharides et les répulsions stériques liées à la conformation brosse des polysaccharides branchés.

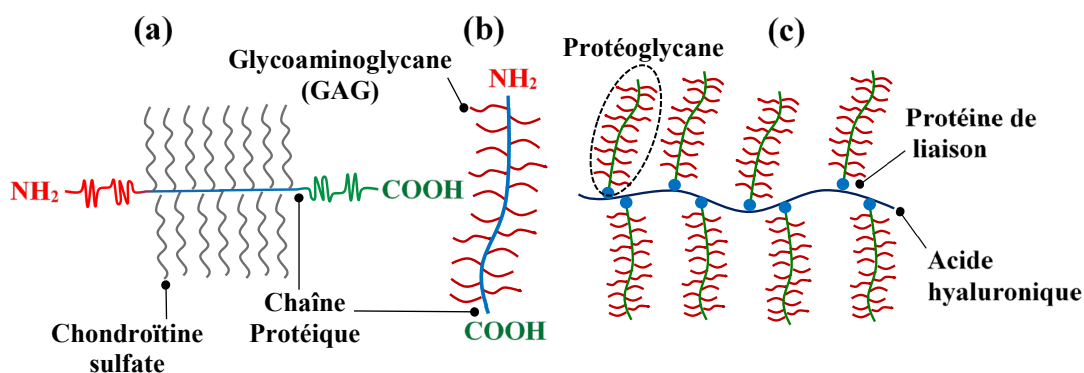


Figure 1.8 : Représentation schématique des structures macromoléculaires « goupillon » de (a) la lubricine, (b) un protéoglycane et (c) un agrécane.

La composition du liquide synovial a inspiré le développement de nombreux hydrogels synthétiques, composés principalement de polyélectrolytes, pour la lubrification en milieu aqueux de composés injectables intra-articulaire ou le revêtement de biomatériaux.^{113, 115, 118-121, 123} Ces gels de polyélectrolytes synthétiques tentent de reproduire l'architecture « goupillon » observée chez les macromolécules du liquide

synovial. Ces hydrogels peuvent également être chargés avec des principes actifs tels que des agents anti-inflammatoires pour une libération dans la cavité articulaire, ajoutant une fonctionnalité supplémentaire à ce type de nano-biomatériaux.¹²⁴

Pour contrôler les propriétés lubrifiantes des biomatériaux, une autre stratégie consiste à structurer les surfaces en mouvement.¹²⁵⁻¹²⁷ La nature est là encore une grande source d'inspiration et recense une grande variété de nano- et microstructures.¹²⁶⁻¹³⁰ Certaines de ces structures ont démontré une activité lubrifiante dans l'eau ou l'air. Néanmoins, elles peuvent également être à l'origine de bien d'autres modifications physico-chimiques de surface telle que la mouillabilité et l'adhésion. Malheureusement, les nano- et microstructures développées concernent le plus souvent des surfaces dures (métalliques) et sont destinées à être utilisées dans l'air et en milieux humides. De manière surprenante, peu d'études se sont intéressées à étudier l'effet d'un revêtement structuré tridimensionnel à base de polyélectrolytes sur les propriétés lubrifiantes en immersion en milieu aqueux. Ce type de revêtement pourrait combiner l'effet lubrifiant des polyélectrolytes associé à celui de la structuration pour créer des surfaces superlubrifiantes.

1.3.2 Nanomatériaux autolubrifiants à base de polyélectrolytes

Les polymères stimulables présentent la possibilité d'adapter leur conformation et leurs propriétés avec une grande sensibilité en réponse à une pathologie, à leur localisation dans l'organisme ou à un temps donné. Les polyélectrolytes employés dans le domaine biomédical (ou autre) peuvent avoir des compositions chimiques et architectures extrêmement variables.^{115, 131-134} D'origine naturelle (polysaccharides,^{135, 136} polypeptides¹⁷ et polynucléotides¹³⁷) ou synthétique, les polyélectrolytes peuvent être chargés positivement (polycations) ou négativement (polyanions). Les polyélectrolytes présentant un caractère zwitterionique sont nommés polyampholytes.^{17, 138, 139} Le caractère zwitterionique peut être entièrement supporté par le monomère (tels que les polybétaines,¹³⁸ **Table 1.2**) ou peut provenir de la copolymérisation d'un monomère acide avec un monomère basique (tel que le poly(acide acrylique-b-vinylpyridine),¹³⁹ **Table 1.2**).

Table 1.2 : Polyélectrolytes utilisés pour le développement de biomatériaux.

Nom chimique	Acronyme	Applications	Réf
Polyanions			
Poly(acide acrylique)	PAA	Lubrification	138-142
Poly(méthylméthacrylate)	PMAA	Lubrification Biointerface fonctionnelle	142-143
Alginate	ALG	Délivrance de médicaments	133
Acide Hyaluronique	HA	Adhésion cellulaire Biointerface fonctionnelle	144-145
Chondroïtine sulfate A	CSA	Matériaux stimulables Membrane	134
Poly(acide acrylique)-b-poly(N-isopropylacrylamide)	PAA-b-PNIPAM	Biodétection	146
Polycations			
Poly(2-vinylpyridine)	PVP	Délivrance de médicaments	147
Polyéthylénimine	PEI	Délivrance de gènes	148-149
Poly(2-[diméthylamine]éthyl méthacrylate)	PDMAEA	Délivrance de médicaments	150
Poly(L-lysine)	PLL	Adhésion cellulaire Lubrification Matériaux stimulables	139, 144-145
Polyamphophyles			
Polybétaine	PB	Lubrification Anti-protéine adsorption	136
Gélatine	Gel	Substitut osseux	17
Poly(acide acrylique)-b-poly(vinyl pyridine)	PAA-b-PVP	Biointerface fonctionnelle Matériaux stimulables	137

Un grand nombre de nanostructures pH-stimulables à base de polyélectrolytes a été investiguée pour le développement de revêtements autolubrifiants,^{119, 139-144} mais aussi pour la délivrance contrôlée de principe actif.¹²³ Les polyélectrolytes utilisés pour le développement de nanomatériaux intra-articulaires injectables peuvent être formulés sous forme libre ou sous forme de micro- et nano-hydrogels dans l'eau,

directement injectables dans la capsule articulaire.^{123, 145} Cependant, ces systèmes confinés entre deux surfaces en mouvement peuvent être expulsés de la zone de contact lorsque la charge appliquée augmente. C'est pour cette raison que les systèmes autolubrifiants les plus prometteurs favorisent l'adsorption des polyélectrolytes à la surface.^{119, 122, 142, 144, 146, 147} Pour supporter les forces de cisaillement à de hautes charges appliquées, un fort ancrage de ces revêtements polymériques est nécessaire.¹²⁰ Le greffage chimique (chimisorption) de ces couches de polyélectrolytes augmente la stabilité du revêtement.^{143, 148}

1.3.2.1 Les revêtements homogènes à base de polyélectrolytes

Les films de polymères non-fonctionnalisés en bout de chaîne sont adsorbés à la surface via l'ensemble du squelette polymérique donnant lieu à une conformation « aplatie ».¹⁴⁰ Dans l'eau, ces polymères peuvent former des films minces d'hydrogels d'épaisseurs variables (de quelques nanomètres à près d'un micromètre).¹⁴¹ L'épaisseur de ces films de polyélectrolytes et les propriétés physico-chimiques de surface dépendent de plusieurs paramètres tels que la masse molaire du polyélectrolyte, le degré d'ionisation, le degré de réticulation et le nombre de couches adsorbées.

Les brosses de polymères sont obtenues via l'attachement en bout de chaînes de la macromolécule à la surface.¹⁴²⁻¹⁴⁷ Les propriétés lubrifiantes remarquables rapportées pour des brosses de polyélectrolytes greffés en bout de chaînes en font les revêtements lubrifiants les plus investigués à ce jour.^{120, 123, 143-150} Le greffage en bouts de chaînes des polymères peut être réalisé en utilisant le greffage « sur », (« *to* ») et « à partir de la solution », (« *from solution* »). Le greffage « sur » permet l'attachement par auto-assemblage en phase liquide de polymères fonctionnalisés préalablement synthétisés.^{151, 152} Avec cette technique, la densité de greffage peut être contrôlée via la taille du polymère en solution, dépendant du solvant utilisé lors de l'auto-assemblage, ainsi que par la densité de surface en sites réactionnels d'ancrage. Le greffage « à partir de la solution » est plus complexe à mettre en œuvre mais permet le plus souvent d'atteindre des densités de greffage plus élevées.^{143, 146, 148} Elle consiste à synthétiser le polymère directement à partir de la surface en y immobilisant préalablement l'amorceur à une densité contrôlée.

L'engouement pour les brosses de polyélectrolytes a poussé les chercheurs à étudier des revêtements d'architectures polymériques très variées.^{25, 124, 132, 134, 138, 139, 142-150, 152-155} Certaines de ces structures obtenues à partir d'homopolyélectrolytes et de copolyélectrolytes sont présentées à la **Figure 1.9**. Des brosses de copolyélectrolytes aléatoires présentent la possibilité d'adapter l'amplitude de la réponse mais peuvent également répondre à plusieurs stimuli externes, permettant d'alterner les propriétés de surface de ce type de revêtement. L'alternance des propriétés de surface, en réponse à plusieurs stimuli externes, peut également être obtenue avec des brosses mixtes d'homopolymères. Ces dernières sont formées par le greffage en bout de chaîne de deux polymères aux compositions chimiques différentes (un polyélectrolyte/un polymère ou deux polyélectrolytes). Les polyélectrolytes employés ne sont pas toujours linéaires et des polymères branchés à la structure « goupillon » peuvent également être utilisés pour former des brosses à la surface.¹²³ D'autres structures utilisant des polymères linéaires bifonctionnels, triblocs ou cycliques peuvent être utilisés pour créer des architectures de type « brosses bouclées » pouvant s'apparenter à la conformation brosse (**Figure 1.9i et j**) et présentant des propriétés très semblables.^{121, 156, 157}

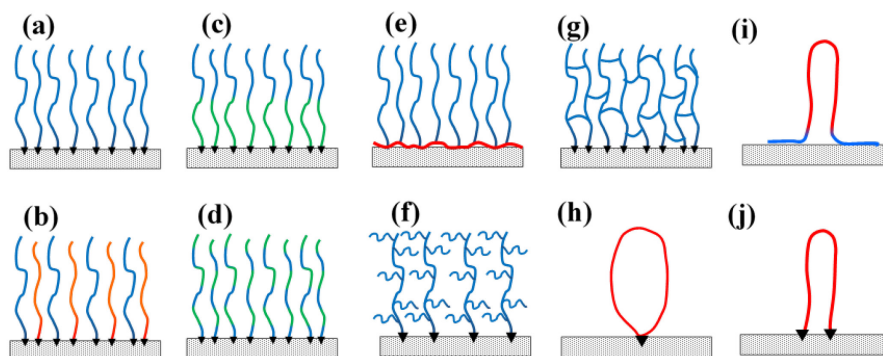


Figure 1.9 : Brosses de polyélectrolytes greffés en bout de chaînes à partir de (a) homopolymères, (b) deux homopolymères et (c) copolymères blocs et (d) copolymères aléatoires. Brosses de polyélectrolytes en « goupillon » adsorbés à la surface par (e) le squelette polymérique et (f) greffés en bout de chaîne. (g) Brosses d'homopolyélectrolytes réticulées. Structures boucles à partir de (h) polymères circulaires greffés par un seul point d'ancrage et de polymères linéaires (i) physisorbés et (j) greffés en bouts de chaîne.

1.3.2.2 Les revêtements avec nano- ou micro-structures à motifs à base de polyélectrolytes

La quasi-totalité des revêtements biolubrifiants développés est constituée de brosses de polyélectrolytes.¹⁴²⁻¹⁵⁰ Cependant, la complexité, le coût de production et la faible résistance de ce type de revêtement limitent leurs applications biomédicales. Une autre stratégie pour contrôler les propriétés physico-chimiques des surfaces consiste à structurer la surface. La structuration crée des motifs spécifiques répétés, en relief ou en creux, disposés de manière périodique ou aléatoire à la surface. La structuration doit se différencier de la rugosité de surface. La rugosité de surface correspond quant à elle à une topographie de surface sans motif ou fréquence identifiable, formée d'aspérités dont les dimensions s'écartent plus ou moins d'une valeur moyenne. Plusieurs paramètres mathématiques peuvent décrire la rugosité de surface, le plus couramment utilisé étant le RMS (écart quadratique moyenne), appelé aussi R_q , et calculé à partir de l'**Equation 1.1**,

$$RMS (R_q) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2} \quad (1.1)$$

avec y la hauteur de l'aspérité et n le nombre d'aspérités. Le RMS (ou tout autre paramètre de rugosité) ne permet pas de décrire la structure de surface car il ne peut rendre compte de la fréquence des motifs ni de leur géométrie.

La nature a développé une quantité importante de surface nano- et micro-structurées hautement adhésives, autonettoyantes ou autolubrifiantes optimisées pour fonctionner en conditions aqueuses ou dans l'air (**Figure 1.10**).¹²⁶⁻¹³⁰ De nombreux matériaux synthétiques tentent de recréer ces structures, on parle alors de surfaces biomimétiques.^{126, 127, 158, 159} Des exemples de nano- ou micro-structures naturelles souvent imitées sont : la peau des pattes de gecko qui présente une adhésivité élevée et réversible sur une grande variété de surface,^{160, 161} la peau de requin qui réduit la traînée de frottement liée à l'écoulement des fluides turbulents¹⁵⁸ et les feuilles de lotus¹⁶²⁻¹⁶⁵ ou les pétales de rose¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ qui toutes deux ont des propriétés superhydrophobes. Si les feuilles de lotus possèdent des propriétés autonettoyantes liées à la déperlance des gouttes d'eau, les pétales de rose, elles, possèdent une microstructure permettant au contraire la rétention de l'eau sur ces surfaces très hydrophobes.

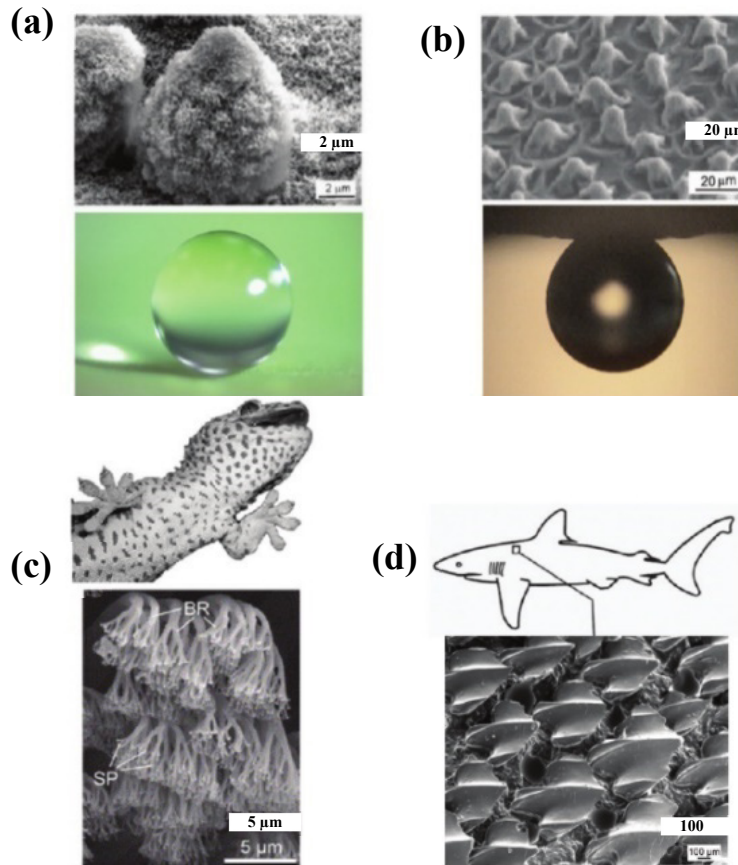


Figure 1.10 : Différentes nanostructures rencontrées dans la nature. Microstructures (a) d’une feuille de Lotus, (b) d’un pétale de Rose, (c) d’une peau de patte de Gecko, et (d) d’une peau de Requin. (Figure reproduite avec la permission à partir de la référence 159, Copyright © 2012, American Chemical Society).

De nombreuses structures inspirées par le vivant ont été préparées de manière à contrôler spécifiquement l’adhésion, la mouillabilité et les propriétés tribologiques.¹²⁶⁻¹³⁰ Des motifs nano-, micro- ou macroscopiques de formes variées (dômes,^{54, 149, 169, 170} carrés,¹⁷¹ piliers¹⁷²) creusés ou en relief peuvent être formés sur divers types de surfaces tels que représentés à la **Figure 1.11**. Ces structures peuvent être produites par différentes techniques dont les plus courantes sont la nanolithographie,¹⁷³ le moulage,¹²⁷ la gravure,¹⁷³ la déposition par rotation,¹⁷⁴ le frittage¹⁴⁹ et l’auto-assemblage.^{55,175} Les techniques de nanolithographie, gravure et frittage sont principalement utilisées pour structurer les surfaces dures. Pour générer des nano- et microstructures molles à base de polyélectrolytes (ou de polymères), trois approches peuvent être envisagées : (i) la structuration directe des surfaces molles,^{126, 127, 176-178} (ii) le greffage d’un film ou de brosses de polyélectrolytes sur

des surfaces structurées dures,^{149, 179} (iii) l'immobilisation de nanostructures colloïdales molles (micelles, NPs) sur des surfaces dures.^{54, 149, 170}

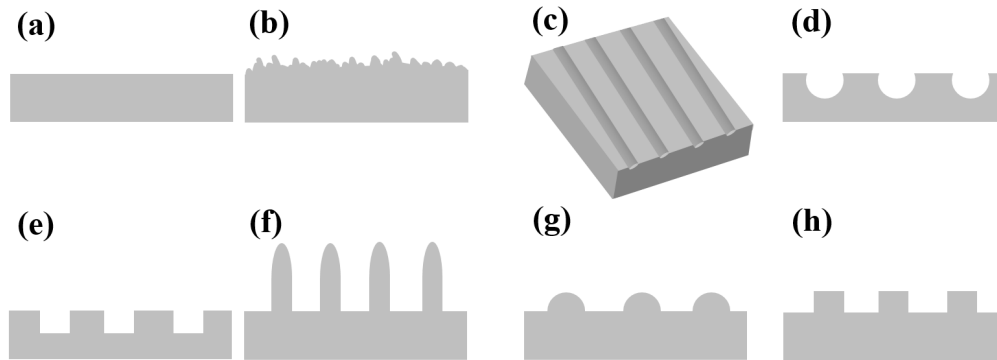


Figure 1.11 : Surfaces non structurées (a) lisse et (b) rugueuse. Surfaces structurées négativement avec des (c) rainures et des puits (d) ronds et (e) carrés. Surfaces structurées positivement avec des (f) piliers, (g) dômes, (h) carrés.

1.3.3 Modulations des propriétés physico-chimiques de surface des revêtements à base de polyelectrolytes

En solution, des changements de conformation d'une chaîne polymérique peuvent s'observer pour des polymères neutres ou chargés et sont dus à des modifications de solubilité du polymère. Pour un polymère neutre, le gonflement est directement dépendant du volume de la chaîne de polymère, qui dépend de la qualité du solvant. Pour un polymère neutre en bon solvant, la taille d'une chaîne unique de polymère est bien décrite par le rayon de Flory (R_F) calculé à partir de :¹⁷⁸

$$R_F \approx a \left(\frac{v}{a^3} \right)^{1/5} N^{3/5} \quad (1.2)$$

avec a la taille d'un monomère, v le volume exclu et N le nombre de monomères. Le volume exclu v rend compte des interactions entre monomères dans le solvant. Lorsque les interactions entre les monomères sont répulsives ($v > 0$), il y a gonflement de la chaîne et lorsqu'elles sont attractives ($v < 0$), il y a effondrement de la chaîne.

Avec des polymères chargés, l'Equation 1.2 peut être corrigée pour tenir compte de répulsions électrostatiques entre les monomères sur le gonflement de la chaîne :¹⁸⁰

$$R_F \approx N f^{2/3} (l_B a^2)^{1/3} \quad (1.3)$$

avec f la fraction de monomères ionisés, l_B la longueur de Bjerrum. La longueur de Bjerrum définit la portée des interactions électrostatiques et correspond à la distance pour laquelle l'énergie d'interaction électrostatique entre deux charges élémentaires non-écrantées est égale à celle de l'énergie d'agitation thermique. Dans l'eau à 37 °C, $l_B \approx 0,7$ nm.¹⁸¹ Ainsi, la taille d'un polyélectrolyte dans l'eau peut varier avec le pH et la force ionique du milieu. Les polyélectrolytes peuvent être divisés en deux catégories, les fortement et les faiblement chargés. Les polyélectrolytes fortement chargés ont un degré d'ionisation très peu dépendant du pH mais leur conformation est sensible à la force ionique du milieu, qui peut écranter ces charges.¹⁸² Les polyélectrolytes faiblement chargés, possèdent quant à eux un degré d'ionisation (α) modulable et répondent aux variations même faibles de forces ioniques et de pH. Pour un polyanion faiblement chargé, l'augmentation du pH tend à augmenter les charges de la chaîne polymérique. A l'inverse, la diminution du pH diminuera les charges d'une chaîne polycationique. Cette augmentation de charge engendre des répulsions électrostatiques entre les unités monomériques et une plus grande affinité avec les molécules d'eau provoquant le gonflement de la pelote polymérique (Figure 1.12).¹⁸³

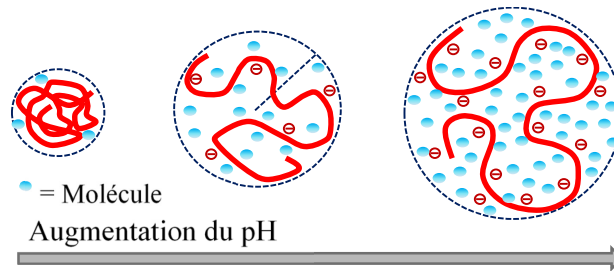


Figure 1.12 : Représentation schématique du changement de conformation d'un polyélectrolyte avec le pH (cas d'un polyanion).

Expérimentalement le gonflement volumique (Q_v) d'un gel polymérique peut être mesuré et décrit¹⁸⁴ comme :

$$Q_v^{-1} = \frac{V_p}{V_g} = \frac{1/\rho_p}{Q_m/\rho_{eau} + 1/\rho_p} \quad (1.4)$$

avec V_p le volume massique du polymère, V_g le volume massique du gel polymérique, ρ_p la densité du polymère, ρ_{eau} la densité de l'eau et Q_m le gonflement massique (défini comme le rapport de la masse de polymère mouillé sur la masse de polymère sec). L'**Equation 1.3** peut être facilement utilisée pour déterminer le taux de gonflement d'un polymère en solution, elle est en revanche plus difficile à appliquer pour évaluer le taux de gonflement d'un polymère composant un revêtement mince (structuré avec motif ou homogène). Dans ce cas, le taux de gonflement d'un revêtement Q_{surf} est le plus souvent déterminé à partir des variations de l'épaisseur du film polymérique et peut être décrit comme :

$$Q_{surf} = \frac{T}{h} \quad (1.5)$$

avec T l'épaisseur du film à sec et h l'épaisseur du film gonflé.

La théorie de Flory précédemment décrite suppose un polymère soluble et idéalement dilué en bon solvant. Cependant, pour des réseaux polymériques plus concentrés, réticulés ou attachés à la surface, la détermination de R_F ou bien de tout autre paramètre conformationnel peut s'avérer plus délicate. Le comportement des polymères greffés en bout de chaîne formant des revêtements homogènes a été initialement décrit pour des polymères neutres. Les polymères neutres adoptent une conformation dépendante de leur densité de greffage (d).^{151, 153, 185, 186} L'ensemble de ces conformations est présenté à la **Figure 1.13a**. À de faibles densités de greffage, quand $d \gg 2R_F$ (avec d , la distance entre deux sites d'ancrage), la conformation « crêpe » est favorisée. En augmentant la densité de greffage jusqu'à $d \sim 2R_F$, la conformation « champignon » est alors favorisée. Pour des hautes densités de greffage, correspondant à une distance $d \ll 2R_F$ les polymères s'étirent verticalement, ce qui est dû à une forte répulsion entre les segments adjacents. La conformation brosse est alors thermodynamiquement favorisée. La conformation brosse peut s'observer pour des polymères neutres¹²³ et chargés.^{143-148, 150} En effet, si pour adopter une conformation brosse les polymères neutres doivent respecter la condition $d \ll 2R_F$, cette condition n'est plus nécessaire avec des polyélectrolytes où les répulsions électrostatiques entre les chaînes adjacentes peuvent causer leur étirement et ce même quand $d > 2R_F$.

Dans le cas de polyélectrolytes greffés en bout de chaîne, les conformations adoptées à la surface dépendent de la masse moléculaire du polyélectrolyte et de son degré d'ionisation mais peu de la densité de greffage.^{148, 151, 153, 185, 186} En effet, la répulsion entre les chaînes polymériques due à la présence de charges sur les monomères suffit à étirer la chaîne. Ce comportement permet donc de moduler la conformation adoptée par ce type de brosses à partir des changements environnementaux (pH et force ionique) de manière réversible et pour une densité de greffage fixe (**Figure 1.13b**).¹⁴³

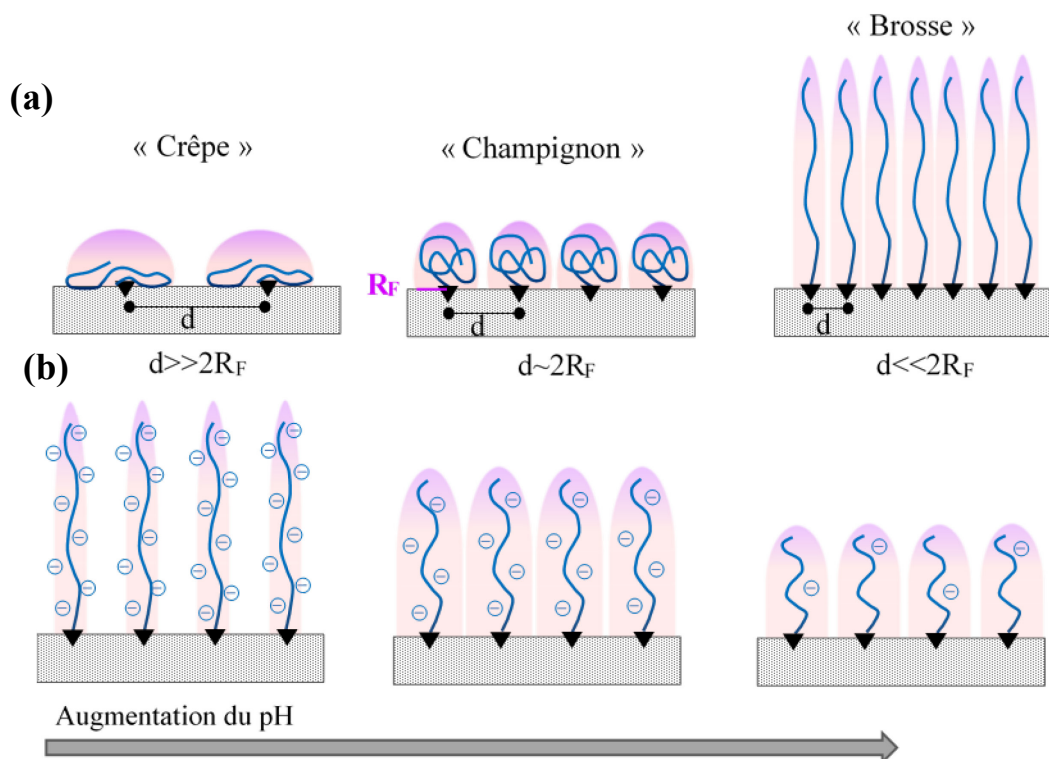


Figure 1.13 : Représentation schématique (a) des conformations crêpe, champignon et brosse pour des polymères neutres greffés en bout de chaîne à la surface en fonction de la densité de greffage. Avec d étant la distance entre deux sites d'ancrage et R_F le rayon de Flory et (b) des conformations adoptées par des polyélectrolytes greffés en bout de chaîne en fonction du pH pour une densité de greffage fixe (cas d'un polyanion).

Certaines théories permettent de décrire l'étirement des brosses de polymères. Celle d'Alexander-de Gennes permet de prévoir théoriquement l'étirement d'une brosse polymérique neutre attachée en bout de chaîne en fonction de la densité de greffage.^{185, 187} Les théories développées par Pincus¹⁸⁸ et Zhulina¹⁸⁹ modélisent quant à elles les comportements de brosses de polyélectrolytes et tiennent compte de la densité de greffage,

du degré d'ionisation du polyélectrolyte et de la concentration en sel dans la solution. Le modèle de Pincus décrit l'étirement des brosses de polyélectrolytes chargés immergées dans une solution aqueuse en absence de sel selon deux régimes.¹⁸⁸ Dans le premier régime, les charges des polyélectrolytes sont neutralisées par des contre-ions piégés à l'intérieur des brosses, considérées comme localement neutres. Dans ce régime dit « osmotique » l'étirement des brosses résulte principalement de la pression osmotique des contre-ions. Dans le régime osmotique, les brosses de polyélectrolytes sont fortement étirées et leur épaisseur est indépendante de la densité de greffage. Dans le second régime dit de « Pincus », les contre-ions sont localisés bien au-delà des brosses et les charges de celles-ci ne sont pas parfaitement neutralisées localement. Dans ce cas, la contribution osmotique à l'étirement des brosses est minime et l'augmentation d'épaisseur est principalement due aux répulsions électrostatiques entre les monomères chargés. Ce régime décrit des brosses de polyélectrolytes faiblement chargées et peu denses, dont l'épaisseur de la brosse dépend fortement du degré d'ionisation des chaînes et de la densité de greffage.

Les modifications conformationnelles des chaînes de polyélectrolytes engendrées par des changements de pH ou de forces ioniques peuvent également entraîner des modifications des propriétés de surface. Les propriétés les plus couramment impactées sont la conformation, la mouillabilité, l'adhésion et le frottement. La modulation de la charge de surface des revêtements de polyélectrolytes mène habituellement à un changement de conformation à l'échelle macromoléculaire d'un état étiré à un état collapsé.^{141, 148, 150} Ces changements conformationnels peuvent entraîner des modifications significatives de l'épaisseur et du contenu en eau du revêtement modifiant aussi de la topographie de surface de celui-ci. Les films homogènes de polyélectrolytes (comme les brosses) présentent une prise de volume principalement anisotropique se traduisant par une augmentation d'épaisseur (de 2 à 4 fois)^{148, 190} directement associée à l'augmentation du degré d'ionisation de la chaîne. Les changements topographiques des surfaces non structurées se limitent le plus souvent à des modifications de la rugosité. En ce qui concerne les revêtements structurés, l'augmentation du degré d'ionisation est en revanche généralement associée à un étirement isotropique du réseau de polyélectrolytes et une modification majeure du motif structural peut alors être observée (**Figure 1.14**).^{54, 126, 127, 149, 170, 176-179,}

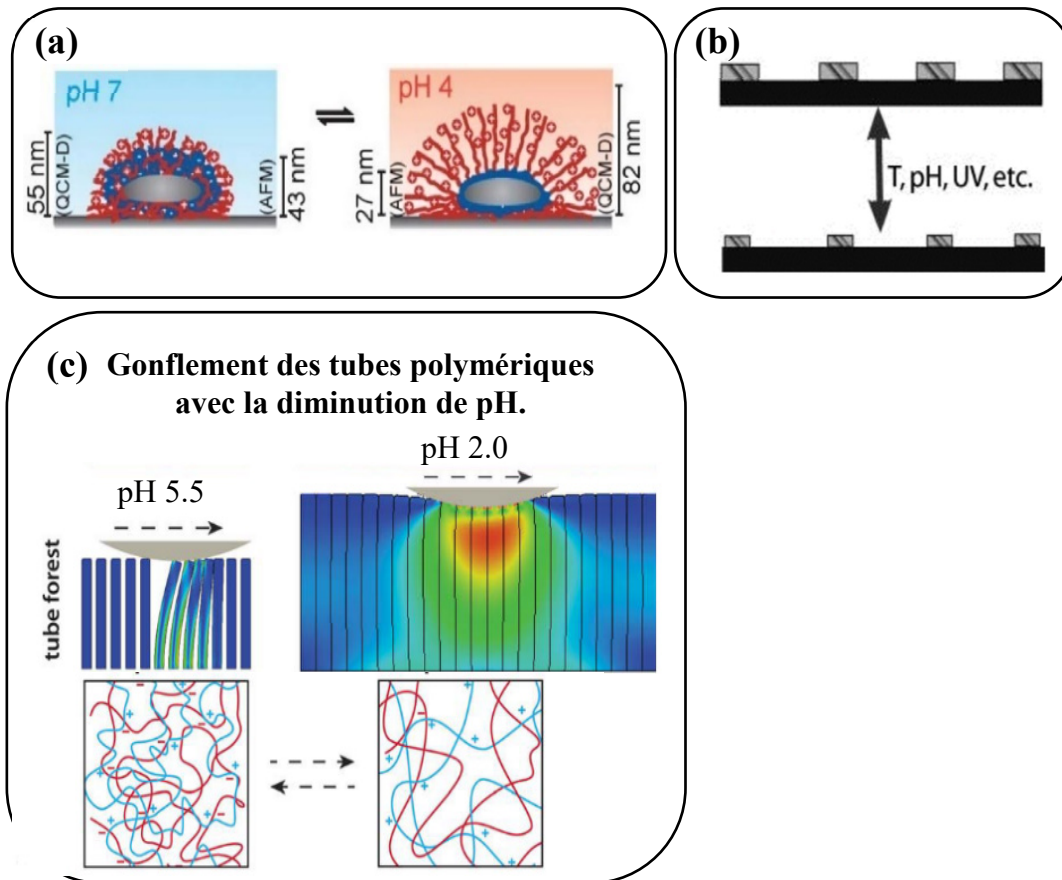


Figure 1.14 : Représentation schématique de revêtements structurés à base de polyélectrolytes. **(a)** Micelles polymériques pH-stimulables immobilisées à la surface. **(b)** Motifs d’hydrogels polymériques stimulables immobilisés à la surface. **(c)** Forêt de tubes polymériques pH-stimulables auto-assemblés à la surface. (Figures reproduites de la référence 191 avec la permission de la Royal Society of Chemistry (a), 178 avec la permission de l’AIP Publishing LLC (b) et 176 avec la permission de la Royal Society of Chemistry (c)).

Les théories décrivant les comportements de revêtements de brosses de polymères supposent un greffage continu et homogène. Actuellement, les théories décrivant le gonflement de revêtements de polymères ou de polyélectrolytes structurés avec des motifs sont encore inexistantes. Cette difficulté provient du gonflement inhomogène et anisotropique de ce type de revêtement. Le manque d’homogénéité du gonflement peut être dû à des contraintes mécaniques, un confinement géométrique (compression latérale) ou bien des contraintes liées à l’ancrage du polymère au substrat¹⁹² et sera plus largement discuté au **Chapitre 4**.

Les changements de conformation et d'hydratation de la chaîne de polyélectrolyte associés aux changements de degré d'ionisation engendrent également une variation de la mouillabilité à l'eau des revêtements. La mesure de l'angle de contact est la plus souvent utilisée pour rapporter et comparer la mouillabilité de différents systèmes.¹⁹³ L'angle de contact à l'eau (θ_{Eau}) peut être déterminé expérimentalement à partir de l'angle formé entre une goutte d'eau et un substrat plat comme schématisé à la **Figure 1.15**. Cet angle est décrit par l'équation de Young :

$$\gamma_{sg} = \gamma_{ls} - \gamma_{lg} \cos \theta \quad (1.6)$$

avec γ_{sg} la tension à l'interface solide/air, γ_{ls} la tension à l'interface liquide/solide et γ_{lg} la tension à l'interface liquide/air.

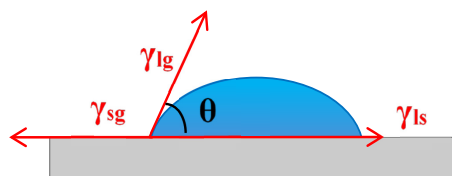


Figure 1.15 : Représentation schématique de l'angle de contact (θ) d'une goutte d'eau sur un substrat plat.

Dans le cas de surfaces chimiquement homogènes, l'augmentation du degré d'ionisation est généralement associée à une augmentation de la mouillabilité à l'eau due à la diminution de la tension de surface du solide.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ Une courbe de titrage rapportant les variations de θ_{eau} en fonction du pH du liquide sondeur peut ainsi permettre la détermination du pKa de surface ou apparent ($\text{pK}_{a\text{surf}}$).^{197, 198} Le $\text{pK}_{a\text{surf}}$ correspond au pKa des groupements ionisables exposés directement à l'interface solide/air. Le $\text{pK}_{a\text{surf}}$ observé d'un polyélectrolyte composant un revêtement de surface peut s'écarter de plusieurs unités (de 1 à 2) de la valeur de pKa de ce même polymère solubilisé en solution.¹⁴² Ceci peut s'expliquer par une variation du pH à l'interface solide/liquide par rapport au pH en solution, due à une concentration sélective d'ions (H^+ ou OH^-) à cette interface, favorisant ou défavorisant l'ionisation des monomères.¹⁴²

L'angle de contact est grandement dépendant de la composition chimique et de la structure de la surface investiguée. Le modèle de Cassie-Baxter (**Equation 1.7**) décrit l'angle de contact à l'équilibre (θ_{app}), pour un liquide déposé sur une surface chimiquement hétérogène (formée de domaines distincts à l'échelle macroscopique) composée de groupes chimiques de type 1 avec une fraction f_1 et un angle de contact (θ_1) et de groupes chimiques de type 2 avec une fraction f_2 et un angle de contact (θ_2).¹⁹⁹

$$\cos \theta_{app} = f_1 \cos \theta_1 + f_2 \cos \theta_2 \text{ et } (f_1 + f_2 = 1) \quad (1.7)$$

Pour décrire les surfaces rugueuses et structurées, les modèles de Cassie-Baxter et Wenzel sont les plus employés.²⁰⁰ Le modèle de Cassie-Baxter décrit un mouillage hétérogène où le liquide sonde est « supporté » sur une distribution d'aspérités et de poches d'air formant une surface composite (air/eau), tel que représenté à la **Figure 1.16a**.²⁰¹ L'équation 1.7 peut être légèrement adaptée (**Equation 1.8**) pour inclure un paramètre de rugosité de la surface mouillée (r_f) rendant compte de la structure de surface :

$$\cos \theta_{app} = r_f f_s \cos \theta - f_v \text{ et } (f_s + f_v = 1) \quad (1.8)$$

avec f_s la fraction d'air en contact avec le solide et f_v la fraction d'air en contact avec le liquide. Le modèle de Wenzel quant à lui décrit des surfaces structurées dont le liquide sonde pénètre entièrement la structure, tel que représenté à la **Figure 1.16b**.²⁰² Ce modèle exprime un angle de contact apparent (θ_{app}) de surface rugueuse et structurée à partir d'un paramètre r_{rug} , le ratio de rugosité rapportant l'aire réelle de contact ($A_{réelle}$) entre le liquide et la surface (**Equation 1.9**).

$$\cos \theta_{app} = r_{rug} \cos \theta \text{ et } \left(r_{rug} = \frac{A_{réelle}}{A_{app}} \right) \quad (1.9)$$

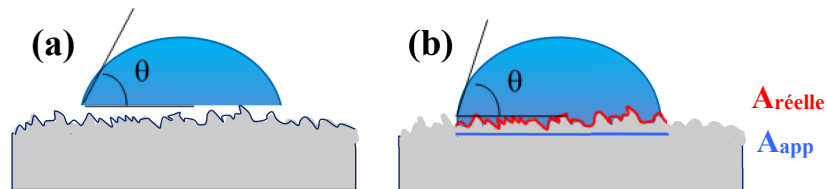


Figure 1.16 : Représentation schématique de l'étalement d'une goutte d'eau sur une surface rugueuse selon le modèle de (a) Cassie-Baxter et (b) Wenzel.

La modulation des propriétés structurales et de mouillabilité des surfaces recouvertes de polymères stimulables entraîne également la modulation des propriétés d'adhésion et tribologiques. La tribologie, définie comme l'étude des phénomènes se produisant quand deux surfaces en contact subissent un mouvement relatif, couvre les phénomènes de frottement, d'adhésion, d'usure et de lubrification. Les forces de frottement (F_S) sont les forces opposant une résistance lors du déplacement de deux surfaces en contact. Le frottement entre deux surfaces peut généralement être décrit par la force requise pour initier le glissement (force de frottement statique, F_{Stat}) et celle nécessaire pour le

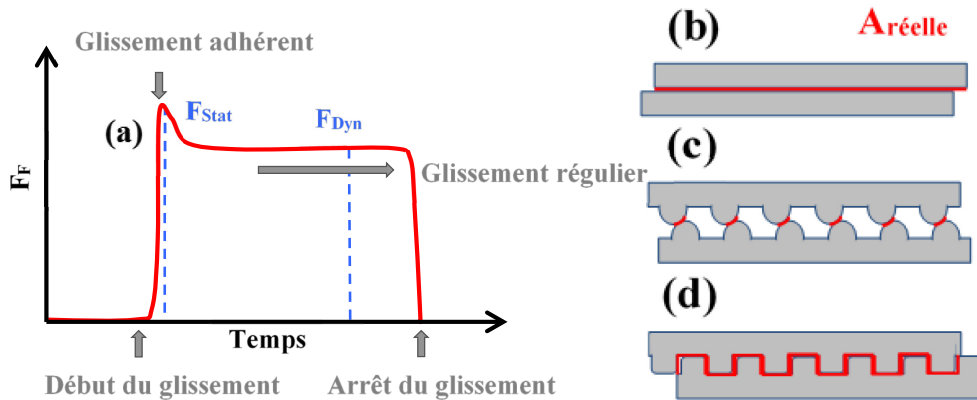


Figure 1.17 : (a) Représentation schématique de la force de cisaillement F_S au cours du glissement. Représentation schématique de deux surfaces (b) lisses en contact et de deux surfaces structurées (c) non-déformables et (d) déformables. Les tracés rouges représentent les aires de contact réelles.

maintenir à vitesse constante (force de frottement dynamique, F_{Dyn}). F_{Stat} est généralement plus élevée que F_{Dyn} telle que représenté à la **Figure 1.17a**. De la même manière, les coefficients de frottement statiques (μ_{Stat}) sont généralement plus élevés que les coefficients dynamiques (μ_{Dyn}).

L'étude du frottement cherche à établir une corrélation entre les différentes variables expérimentales (telles que la charge appliquée, la vitesse de cisaillement, l'aire de contact) et les forces de frottement résultantes. La force de frottement F_S peut être quantifiée par le coefficient de frottement (μ), exprimé selon la loi d'Amontons.

$$F_S = \mu F_N \quad (1.10)$$

où F_N est la force normale appliquée. La loi d'Amontons décrit un frottement contrôlé par la charge et n'exprime pas la dépendance à l'aire de contact (qui est proportionnelle à la

charge appliquée) et la vitesse de cisaillement.¹⁸⁶ Si la loi d'Amontons est souvent vérifiée et même pour des surfaces rugueuses et texturées, certaines exceptions peuvent néanmoins être observées. Certaines exceptions à la loi de d'Amontons peuvent néanmoins être décrites par l'ajout d'un terme décrivant les forces supplémentaires nécessaires pour initier un glissement dû à l'adhésion entre les deux surfaces :

$$F_S = \mu F_N - \sigma A \quad (1.11)$$

où σ est la contrainte de cisaillement nécessaire pour initier le mouvement et A l'aire réelle de contact entre les deux surfaces. Le frottement contrôlé par l'adhésion est quant à lui dépendant de l'aire de contact et résulte en une F_S non-nulle pour une charge appliquée de zéro, contrairement au frottement contrôlé par la charge. La dépendance de l'aire de contact dans le cas de frottement contrôlé par l'adhésion oblige à prendre en considération l'aire réelle de contact pouvant s'écarter largement de l'aire apparente. En effet pour deux surfaces idéalement lisses en contact, les aires de contact réelle et apparente sont identiques (**Figure 1.17b**). En revanche, pour des surfaces rugueuses ou structurées, l'aire réelle de contact peut être largement inférieure à l'aire de contact apparente dans le cas de matériaux non-déformables (**Figure 1.17c**).¹⁸⁶ En réduisant significativement l'aire de contact, il est alors possible de diminuer la contribution adhésive à la force de frottement. La structuration de substrats initialement lisses est largement utilisée pour contrôler l'adhésion entre deux surfaces ainsi que les forces de frottement. Dans le cas des surfaces structurées déformables (tels que les revêtements polymériques) ou bien parfaitement commensurables (**Figure 1.17d**), l'aire de contact réelle peut s'avérer nettement supérieure à celle apparente, ce qui augmente ainsi significativement la contribution adhésive.

Les forces de frottement ne sont pas des forces fondamentales mais résultent de plusieurs phénomènes. Un phénomène générant particulièrement peu d'énergie dissipative est le roulement provenant de « billes » ou particules roulantes permettant le déplacement d'une surface, sans engendrer de glissement.^{203, 204} De ce roulement résulte une faible dissipation d'énergie, se traduisant par de faibles F_S et μ . Ce mécanisme à l'origine des roulements à billes s'avère extrêmement lubrifiant. Ces phénomènes peuvent grandement dépendre de la topographie de surface (structure et rugosité), de l'hydratation de la surface, l'homogénéité chimique mais aussi des propriétés élastiques de la surface.¹⁸⁶

Les revêtements de polyélectrolytes utilisés comme lubrifiants en milieu aqueux peuvent présenter des propriétés autolubrifiantes exceptionnelles ($\mu \approx 10^{-3}$). Ces performances lubrifiantes proviennent principalement des répulsions électrostatiques entre les surfaces dues à la double couche électronique des polyélectrolytes, à la couche d'hydratation fortement liée aux polyélectrolytes entourant la charge des monomères permettant de maintenir l'eau au sein du plan de cisaillement^{205, 206} et des répulsions stériques entre les segments polymériques. Dans le cas des brosses de polyélectrolytes, la conformation totalement étirée ajoutée aux phénomènes précédemment énoncés permet une très faible interpénétration des revêtements (**Figure 1.18**).²⁰⁷ En comparaison avec des brosses neutres, la faible interpénétration des brosses hydratées de polyélectrolytes entraîne une très faible résistance aux frottements et donc des coefficients de frottement faibles. Si les brosses sont le revêtement à base de polyélectrolytes ayant démontré les meilleures propriétés lubrifiantes en milieux aqueux, il semblerait néanmoins que ce délicat revêtement ne puisse supporter des charges appliquées de plus de quelques atmosphères. Cette sensibilité à l'endommagement et à l'usure, comparée à des revêtements de polyélectrolytes enchevêtrés ou nanostructurés, limite les applications en milieux biologiques, en particulier pour les revêtements d'implants articulaires.^{170, 208} Une lubrification hydrodynamique associée à de faibles μ en milieu aqueux a également été rapportée pour des surfaces structurées (de type alvéolées). En effet, chaque alvéole sert de microréservoir permettant à l'eau d'être expulsée sous l'effet de la charge, provoquant ainsi une pression hydrodynamique qui maintient les surfaces séparées. Les motifs générés par la structuration de surface permettent également de piéger les débris issus de l'usure des

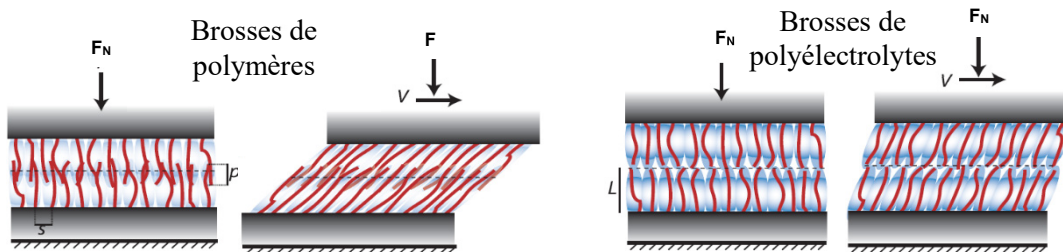


Figure 1.18 : Brosses de polymères neutres et chargés sous l'effet d'une charge appliquée (F_N) et d'un glissement. Avec L , longueur de la brosse, s , la distance de greffage entre deux chaînes de polymère ; p , la longueur des brosses interpénétrées et v , la vitesse de glissement. (Figure reproduite avec permission à partir de la référence 207, Copyright ©2012, Yale Journal of Biology and Medicine).

surfaces, minimisant leur endommagement. Les propriétés lubrifiantes des surfaces structurées à l'aide de particules molles et dures sont décrites au **Chapitre 4**. Différents mécanismes de frottement ont été identifiés pour des structures molles et dures permettant toutes deux d'obtenir des surfaces hautement lubrifiantes.

1.4 Biomatériaux pour la complexation d'oligonucléotides

Les biomolécules sont de plus en plus utilisées pour remplacer ou compléter les petites molécules thérapeutiques synthétiques.²⁰⁹ Ainsi, des biomolécules telles que les protéines²¹⁰ ou les acides nucléiques²¹¹⁻²¹³ peuvent être utilisées à des fins médicales. Elles présentent l'avantage d'être biocompatibles et biodégradables tout en ayant une activité hautement spécifique, elles induisent une réponse immunitaire moindre.²⁰⁹ Cependant, l'administration directe de ces entités est difficile car elles sont rapidement dégradées (par des nucléases ou protéases) et éliminées des fluides biologiques réduisant nettement leur efficacité.²⁰⁹ De plus, dans la majorité des cas, et en particulier avec les acides nucléiques, ces biomolécules sont trop hydrophiles pour traverser les membranes biologiques.²⁰⁹ Par conséquent, la biodistribution de ce type d'actif thérapeutique est faible et nécessite l'utilisation de nanovecteurs protecteurs et/ou ciblés, permettant leur transport et leur délivrance au niveau des cellules cibles.

1.4.1 La thérapie génique

La délivrance de gènes est particulièrement prometteuse car elle permet le traitement de maladies héréditaires,²¹⁴ génétiques,²¹⁵ cancéreuses²¹⁶ et infectieuses.²¹⁷ Ainsi, de nombreuses stratégies de thérapie génique s'intéressent à la délivrance d'acides nucléiques exogènes afin de réparer ou moduler l'expression du patrimoine génétique.^{211-213, 218-225}

Les premières études conduites visaient à délivrer de l'ADN codant circulaire d'origine bactérienne (plasmide) pour compléter ou amplifier l'expression de gènes défectueux.²²⁶ À l'opposé, les thérapies géniques de silençage visent à diminuer ou supprimer l'expression génique. Pour ce type de silençage, différents types d'oligonucléotides, principalement à base d'ARN, peuvent être utilisés. Parmi ceux-ci, on

distingue les ARN messenger antisens,^{212, 213} les ARN interférents (ARNi),^{212, 227} les aptamères²²⁸ et les ribozymes.²²⁹ À l'exception des aptamères, dont l'action est similaire à un antagoniste protéique, l'ensemble des autres acides nucléiques agit au niveau génétique sur l'ARNm.²²⁸ Les ribozymes sont des ARN (~30 nucléotides) possédant une activité catalytique, la plus courante étant la ribonucléase P (RNaseP) qui permet l'inhibition génétique via le clivage de l'ARNm sur lequel elle se fixe et la réparation de l'ARNm par épissage.²²⁹ Les ARNm antisens quant à eux inhibent spécifiquement l'expression d'un ARNm en s'y fixant par complémentarité, inactivant ainsi le gène.²¹³ Les ARNm fonctionnent comme des bloqueurs stériques, empêchant la fixation du ribosome et par conséquent la traduction. L'efficacité des ARNm exogènes nécessite leur délivrance en quantité importante au sein de la cellule. Les ARN interférents sont les plus couramment étudiés pour le silençage génétique.

Les ARN interférents (ARNi) sont des ARN non codants se retrouvant sous forme doubles brins à l'état naturel. Fire et Melo ont décrit pour la première fois en 1998 l'activité génétique inhibitrice et spécifique de longs doubles brins d'ARN exogènes (dsARN, 30 nucléotides) chez *Caenorhabditis elegans*.²³⁰ Quelques années plus tard, en 2001, cette même activité est démontrée chez les mammifères avec des ARN exogènes.²³¹ Délivrés dans le cytoplasme, ces dsARN sont pris en charge par le complexe protéique cytosolique Dicer se chargeant de les cliver en plus courts fragments doubles brins de 19 à 21 nucléotides (siARN).²¹² Deux types d'ARN interférents sont particulièrement étudiés pour leurs applications pharmaceutiques ; les petits ARN (siARN, 19-21 pb) et les micro ARN interférents (miARN, ~ 22 pb). Les ARNi peuvent être facilement synthétisés en vue d'une administration exogène et permettent le silençage d'ARNm complémentaire. À la différence des ARNm antisens qui fonctionnent comme des inhibiteurs stériques, les ARNi induisent le clivage de l'ARNm. À concentration équivalente, l'activité inhibitrice des ARNi est supérieure à celle des ARNm.

Les siARN et les miARN possèdent des propriétés physicochimiques similaires et un mode d'action biologique très semblable (**Figure 1.19**). Délivrés dans le cytoplasme, les ARNi vont s'associer au complexe induisant le silençage de l'ARN (RISC) qui va dissocier le duplexe d'ARN pour ne conserver que le brin guide. Le brin passager d'un

miARN sera simplement écarté du complexe protéique alors que celui d'un siARN sera dégradé. Le complexe RISC activé va alors conduire le brin guide de ARNi jusqu'à l'ARNm cible. L'action de silençage sur l'ARNm diffère alors légèrement entre les siARN et miARN. La complémentarité partielle entre le simple brin d'ARNm et le brin guide de miARN entraîne la répression, la dégradation ou le clivage de ce dernier dépendant du degré de complémentarité. Le silençage à l'aide de miARN est donc peu spécifique et un seul miARN peut réguler l'expression de plusieurs ARNm voire une centaine, **Figure 1.19**.^{212, 232, 233} En revanche, la complémentarité parfaite entre le brin guide de siARN et l'ARNm entraîne le clivage d'un seul ARNm suivi de sa dégradation par diverses exonucléases. Le silençage résultant de la délivrance de siARN est donc hautement spécifique.^{212, 232, 237} De plus, le RISC intégrant le brin guide de siARN peut être recyclé et conduire à la dégradation d'un autre ARNm cible, amplifiant l'efficacité de silençage. La voie de silençage des siARN peut être également atteinte via la délivrance exogène de longs dsARN clivés par la suite en de courts fragments de siARN (**Figure 1.19**). Cependant, la délivrance de longs dsARN a été rapportée comme plus favorable à la stimulation du système immunitaire (via l'activation de la voie de production de l'interféron) comparée à la délivrance de siARN.²³⁴

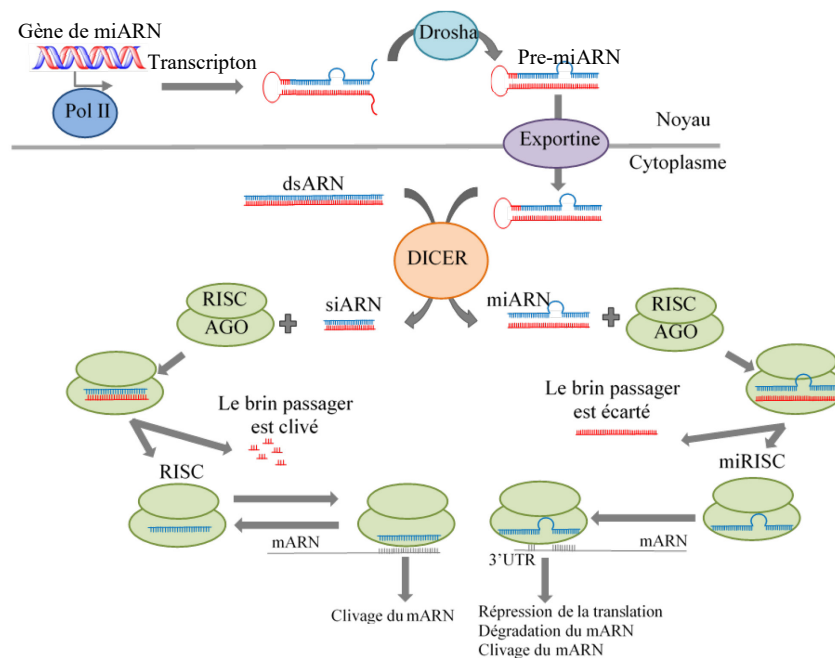


Figure 1.19 : Mécanismes de silençage génétique initié par les ARNi. (Figure adaptée de la référence 232).

Une autre catégorie d'ARNi regroupe les petits ARN en épingle à cheveux (shARN) qui sont ARN simples brins possédant une structure tige-boucle. Les shARN délivrés dans le noyau par des vecteurs viraux peuvent une fois transportés dans le cytosol se substituer aux siARN et s'associer au RISC en vue de silencer là aussi un ARNm spécifique.²³⁵ Plus récemment, il a été rapporté que la forme simples brins d'un siARN (ss-siARN) pouvait outrepasser la forme doubles brins (ds-siARN) et activer directement RISC avec la même efficacité de silençage voire même plus rapidement que la forme doubles brins.²³⁶⁻²³⁸

1.4.2 Obstacles actuels à la délivrance d'ARNi

La délivrance d'oligonucléotides. La contrainte majeure au développement de thérapies géniques efficaces est la délivrance en quantité suffisante d'oligonucléotides au sein de la cellule cible.²²⁶ Ceci est dû à leur instabilité en milieu physiologiques et leur faible perméabilité au travers de la membrane cellulaire. Ce problème est particulièrement prononcé avec les oligonucléotides possédant une action de bloqueur stérique comme les ARNm antisens, qui doivent être délivrés en grande quantité pour permettre un silençage efficace et prolongé. En effet, pour que l'action de silençage se prolonge dans le temps, il faut que la complémentarité entre l'ARNm et l'ARNm antisens exogène soit maintenue. Pour surmonter cette faible délivrance, des nanovecteurs viraux et synthétiques ont été très largement utilisés et font encore l'objet de nombreuses investigations.^{233, 239-247}

Le silençage indésirable (off-target effect). L'avantage de la thérapie génique repose sur le contrôle et la spécificité de modulation des gènes ciblés. Le plus souvent, la stratégie adoptée consiste à délivrer un ARNi pour cibler un seul ARNm. Par conséquent, la complémentarité partielle des miARN avec plusieurs ARNm peut entraîner la modulation de l'expression d'un grand nombre de gènes, et ce de manière non contrôlée. Ce manque de spécificité de silençage est la plus grande limitation thérapeutique des miARN et peut provenir du brin passager comme du brin guide.²³²

La complémentarité parfaite entre un siARN et un ARNm diminue le ciblage indésirable mais ne permet pas de s'en affranchir.²⁴⁸ En effet, l'appariement partiel d'un brin de siARN avec un brin d'ARNm est également possible et peut mener, comme dans

le cas des miARN, à un silençage indésirable. De plus, il a également été démontré que ce silençage indésirable pouvait provenir du brin guide mais aussi du brin passager, à cause d'une saturation des mécanismes de dégradation de ce dernier.^{249, 250} L'utilisation de ss-siARN ou de ds-siARN avec un brin passager inactif a démontré la possibilité de réduire significativement le silençage indésirable lié au brin passager.²⁵¹

Toxicité et stimulation de la réponse immunitaire par l'oligonucléotide. La réponse immunitaire est diminuée lorsque les biomolécules sont délivrées de manière exogène sans être pour autant annihilée. Tous les oligonucléotides délivrés au sein d'une cellule peuvent initier une réponse immunitaire.^{232, 252} Cette réponse est quasi systématiquement dépendante de la concentration. Afin d'en limiter l'amplitude, il est donc essentiel de ne pas saturer les cellules en oligonucléotides exogènes. Certains motifs ont été rapportés comme étant immuno-stimulants. C'est le cas des motifs enrichis en uracil (U) et guanine (G) tels que : GUCCUCAA, UGUGU ou UGGC.²³² Ainsi, plus l'oligonucléotide est long, plus il a de chances de provoquer une forte réponse immunitaire. Par exemple, la délivrance de longs dsARN a été rapportée comme plus favorable à la stimulation du système immunitaire (via l'activation de la voie de production de l'interféron) comparée à la délivrance de siARN.²³⁴

Les avantages des siARN. L'emploi de siARN simples ou doubles brins présente plusieurs avantages par rapport aux autres stratégies de silençage. Tout d'abord, ils sont facilement synthétisables et donc peu coûteux. D'autre part, ils permettent un silençage hautement spécifique. Enfin, ils peuvent être recyclés de manière à silencer plusieurs ARNm, aboutissant à un silençage efficace pour une quantité minime. Les plus faibles quantités de siARN employées comparées aux autres nucléotides permettent de minimiser le silençage indésirable, ainsi que la toxicité liée à la stimulation de la réponse du système immunitaire. Si l'emploi de ds-siARN fait l'objet de nombreuses recherches, les études portant sur la délivrance de ss-siARN sont beaucoup plus réduites malgré leur activité biologique.

1.4.3 Les systèmes de vectorisation de siARN

Plusieurs essais cliniques ont démontré l'efficacité de l'administration locale de siARN par voie pulmonaire, oculaire ou intramusculaire.^{227, 253, 254} Le manque de stabilité en milieu physiologiques, la forte clairance et la faible perméabilité membranaire limitent grandement la biodisponibilité des oligonucléotides exogènes, rendant l'administration systémique plus délicate. Des nanovecteurs ont alors été largement utilisés de manière à assurer la protection, le transport, le ciblage et la délivrance des oligonucléotides thérapeutiques vers les cellules cibles.

Les premiers vecteurs employés pour délivrer des ARNi (tels que les shARN) étaient d'origine virale.²⁵⁵ Cependant, les forts risques de toxicité engendrés par les vecteurs viraux ont très vite limité leur emploi au profit de stratégies chimiques. Pour s'affranchir de l'emploi des vecteurs viraux, des modifications chimiques de nucléotides ont tout d'abord été explorées pour améliorer la stabilité extracellulaire et cytosolique, mais aussi la capture cellulaire des ds-siARN et ss-siARN.^{246, 253, 256, 257} Ces modifications chimiques portent le plus souvent sur les extrémités de l'oligonucléotide (5' ou 3') et peuvent concerner l'ose, la base azotée ou les groupements phosphates. Ces modifications peuvent cependant affecter l'activité de silençage et présentent des succès variables. La majorité des modifications chimiques concerne l'ose, via l'incorporation de groupements : 2'-fluoro, 2'-O-méthyle, 2'-halogène, 2'-amine et 2'-deoxy. Ces modifications chimiques de l'ose permettent une nette amélioration de la stabilité du siARN en milieux physiologiques, mais doivent être minimales pour ne pas trop perturber la machinerie ARN interférente.²³² En effet, une modification 2'-O-méthyl sur les deux brins de siARN peut entraîner la perte de l'activité de silençage alors que la modification unique du brin guide ne semble pas l'altérer. Les modifications chimiques du squelette phosphaté via la substitution de l'atome de phosphate par un brome ou un soufre résulte en une augmentation de la stabilité et de la capture cellulaire, tout en maintenant l'activité de silençage mais peut entraîner une cytotoxicité. En revanche, les modifications chimiques des nucléobases sont majoritairement mieux tolérées si elles concernent seulement le brin passager. La conjugaison chimique de structures aux extrémités de siARN peut également être réalisée de manière à apporter de nouvelles fonctionnalités au duplexe. Ainsi, du

cholestérol, des folates, des peptides (*Cell-Penetrating Peptide*) ou bien des aptamères peuvent être greffés aux extrémités 5' ou 3, du siARN.²⁵⁸⁻²⁶⁰ Ces modifications peuvent aider à la pénétration cellulaire, mais aussi à l'adressage depuis la voie systémique jusqu'aux cellules cibles. Elles sont cependant toujours susceptibles d'impacter l'efficacité du silençage génétique.

1.4.3.1 Les vecteurs cationiques

La forte similarité physico-chimique existante entre l'ADN et les siARN fait que les nanovecteurs utilisés pour délivrer les premiers ont inspiré ceux pour transporter les seconds. Les nanovecteurs développés pour la délivrance d'oligonucléotides peuvent emprisonner l'oligonucléotide²³⁹ par : (i) encapsulation au cœur, (ii) adsorption à la surface et (iii) complexation au sein d'une matrice, tels que représenté à la **Figure 1.20**. L'ensemble de ces modes de remplissage de nanovecteurs en siARN a pour similarité qu'ils favorisent la charge de l'oligonucléotide dans le nanovecteur via des interactions électrostatiques.^{224, 239, 261, 262} Le siARN, comme l'ensemble des autres nucléotides, est une molécule hydrophile possédant un squelette hautement chargé négativement. Ces charges négatives provenant des groupes phosphates des nucléotides offrent la possibilité d'interagir via des interactions électrostatiques avec des charges positives. Ainsi, la grande majorité des nanovecteurs développés sont chargés positivement pour permettre la complexation avec le siARN (ou tout autre type d'oligonucléotides) via des interactions électrostatiques. Comme attendu, plus le nanovecteur sera fortement chargé positivement, plus la complexation avec le brin de siARN (double ou simple) sera forte.²⁶³ Cette complexation forte peut néanmoins s'avérer difficilement réversible. Une grande diversité de nanovecteurs cationiques a été élaborée par exemple, les vecteurs lipidiques

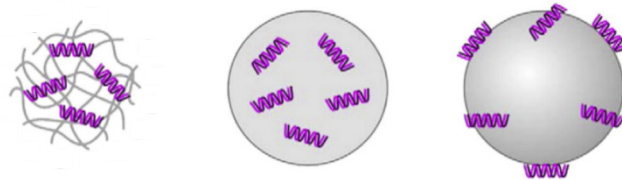


Figure 1.20 : Représentation schématique des différents mécanismes de charge d'un nanovecteur en acides nucléiques. (Figure reproduite à partir de la référence 239 avec la permission d'Elsevier).

(liposomes),^{224, 264, 265} polymériques (polyplexes, polymersomes, NPs, micelles, cyclodextrines).^{209, 221, 240, 266, 267}

Les nanovecteurs lipidiques. Les nanovecteurs lipidiques ont été parmi les premiers à être développés pour la libération d'oligonucléotides et plusieurs formulations sont actuellement disponibles sur le marché.²⁶⁸ Plusieurs types de préparations à base de lipides ont été développés pour délivrer *in vivo* des siARN tels que des liposomes, micelles, émulsions ou des nanoparticules lipidiques solides.^{233, 242, 243, 268-270} Les liposomes cationiques restent néanmoins la forme pharmaceutique la plus étudiée et développée pour la délivrance d'oligonucléotides, dont les siARN. Les liposomes sont des structures vésiculaires auto-assemblées qui sont composées de lipides amphiphiles. Les liposomes peuvent se retrouver sous forme uni- ou multilamellaires, formant respectivement un cœur ou des feuillettes hydrophiles. Formulés à base de lipides cationiques, ces feuillettes hydrophiles permettent la complexation de siARN à l'intérieur du liposome tout en le protégeant de l'environnement extérieur. Néanmoins, la complexation peut également se produire à la surface extérieure des liposomes possédant également des charges positives, exposant alors le siARN à l'environnement. Les liposomes sont largement utilisés car ils permettent une bonne pénétration cellulaire et une bonne transfection. De plus, un revêtement externe de brosses de polyéthylène glycol (PEG) permet d'augmenter le temps de circulation et d'améliorer leur biodistribution.

Les nanovecteurs polymériques. Les nanovecteurs polymériques ont été grandement utilisés pour la délivrance de pADN et plus récemment pour celle de siARN.^{221, 266 233, 239, 240, 245, 247, 260, 267} Tout comme pour les nanovecteurs lipidiques, les polymères employés sont très souvent partiellement ou totalement chargés positivement. Les polycations permettent de complexer des siARN anioniques via des interactions électrostatiques et forment alors des polyplexes. Cette complexation permet de protéger l'oligonucléotide de l'environnement extérieur, en particulier des RNase tout en favorisant la capture cellulaire. D'origine synthétique, les polycations les plus couramment employés sont la poly(L-lysine (PLL) et la polyéthylèneimine (PEI).^{261, 271} Les polycations d'origine naturelle utilisés pour la délivrance de siARN comprennent le chitosan, les cyclodextrines et l'altocollagène. Un grand nombre de structures à base d'homo- ou de copolymères

peuvent être préparés formant des nanoparticules solides, polymersomes, micelles, dendrimères et polymère/siARN conjugués clivables. Plus rarement employée, la conjugaison d'une chaîne polymérique avec un ou plusieurs oligonucléotides via une liaison chimique est une autre stratégie exploitée dans la délivrance d'oligonucléotides.²⁷² La liaison chimique entre le polymère et le siARN peut être biodégradable, permettant la délivrance du siARN dans le cytosol. Dans le cas où la liaison n'est pas biodégradable, le clivage pourra, sous certaines conditions, s'effectuer au sein du complexe protéique Dicer. Cependant, cette conjugaison peut nécessiter la modification chimique du siARN pouvant entraîner des modifications de l'activité de silençage.

La toxicité des vecteurs cationiques. Le succès de la thérapie génique dépend grandement du nanovecteur utilisé pour délivrer l'oligonucléotide. Cependant, l'application clinique des nanovecteurs cationiques est grandement limitée par leur plus grande toxicité comparée à celle des vecteurs anioniques, ou plus particulièrement des neutres.^{271, 273, 274} Plusieurs études ont démontré que les vecteurs cationiques engendraient des réponses inflammatoires importantes. De plus, ils sont rapidement éliminés lorsqu'administrés par voie systémique limitant leur biodisponibilité. Leur charge de surface a été rapportée pour certes augmenter la vitesse de capture cellulaire mais diminue en contrepartie la spécificité de cette capture. La faible spécificité de la capture cellulaire entraîne l'accumulation d'une grande partie du nanovecteur cationique dans certains organes tels les reins, le foie et les poumons (principaux organes d'épuration). Le faible temps de circulation et la plus grande clairance des nanovecteurs cationiques rend plus difficile le ciblage spécifique d'organes (autres que le foie, les poumons et les reins). De plus, si la complexation des siARN avec des vecteurs cationiques est facile via les interactions électrostatiques, la décomplexation peut s'avérer plus difficile. En effet, les fortes interactions ioniques rendent difficile la délivrance de l'oligonucléotide.²⁷⁵

1.4.3.2 Les nanovecteurs non-cationiques

Pour s'affranchir des problématiques liées aux vecteurs cationiques, des stratégies alternatives pour la délivrance de siARN ou d'autres oligonucléotides ont été développées.

Des nanoparticules (NPs) solides à base de poly(acide glycolique-co-acide lactique) (PLGA) ont été étudiées pour la délivrance d'oligonucléotides.²⁷⁶ L'avantage du PLGA est que ce polymère (approuvé par la Food and Drug Administration, FDA) est très stable, biodégradable, faiblement toxique et présente une bonne capture cellulaire. Cependant, la complexation entre le PLGA et le siARN est faible à cause du manque d'interactions électrostatiques ne permettant pas une charge suffisante du vecteur en oligonucléotides. Pour augmenter la complexation du siARN et du PLGA, la surface peut être décorée avec des lipides ou des polymères cationiques, diminuant légèrement les problèmes de toxicité liés aux charges positives précédemment énoncées.²³²

La construction d'architectures tridimensionnelles à base d'acide nucléique permet la formation de systèmes particuliers bien définis pour la délivrance de siARN.^{246,277} Ces structures sont composées de fragments d'ADN et de brins de siARN à délivrer conçus pour s'hybrider entre eux en un assemblage complexe. Néanmoins, le développement de ce type de structures est complexe et coûteux.

La conjugaison d'un siARN avec un lipide ou un polymère neutre via une liaison covalente permet la formation de liposomes²⁷⁸ ou de micelles non-cationiques²⁷², respectivement. La conjugaison du siARN avec des motifs hydrophobes a déjà été rapportée pour des conjugaisons avec le cholestérol, les squalènes ou des acides gras. Néanmoins, cette stratégie nécessite la modification chimique de l'oligonucléotide, ce qui peut altérer l'activité de silençage. L'ensemble de ces techniques reste encore marginalement développé et semble difficile à appliquer.

1.4.4 Interactions non-électrostatiques des oligonucléotides

L'appariement de deux brins d'ADN ou d'ARN est stabilisé par un grand nombre d'interactions de natures différentes. Les liaisons hydrogène permettent l'appariement des bases complémentaires se faisant face, tandis que l'empilement vertical des nucléobases adjacentes est possible grâce à l'empilement π des noyaux aromatiques assurant l'attraction entre les nucléobases hydrophobes. Les répulsions électrostatiques provenant des deux squelettes phosphates permet de maintenir l'ensemble de cette structure. Ces nombreuses interactions pourraient être mises à profit pour la complexation avec des nanovecteurs de

nature chimique variable. La forme simple brin d'oligonucléotides, rendant accessible les nucléobases, semble offrir une grande possibilité d'interactions de natures variées.

Quelques études expérimentales et théoriques se sont attachées à décrire les possibilités d'interactions non-électrostatiques de simples et doubles brins d'oligonucléotides, ADN et ARN confondus. Ces études montrent que le type d'interaction prédominante avec la surface ainsi que la conformation adoptée par l'oligonucléotide dépendent grandement de sa forme double ou simple brin.

Les interactions électrostatiques entre un oligonucléotide anionique et une surface cationique ont été observées pour des oligonucléotides simples et doubles brins. La force de ces interactions électrostatiques augmente avec la densité de charge cationique de la surface et est donc reliée au $pK_{a_{surf}}$.^{263, 275} Les fortes interactions électrostatiques entraînent la condensation de l'oligonucléotide doubles ou simples brins à la surface cationique, produisant des structures compactes.²⁷⁵

Si la présence d'interactions électrostatiques entre un oligonucléotide et une surface est largement admise, la possibilité d'interactions hydrophobes entre les deux entités semble de plus en plus évidente.^{275, 279, 280} En effet, l'adsorption d'oligonucléotides sur des surfaces purement hydrophobes formées par des SAMs d'alkylsilanes (diméthylchlorosilane, octadécyltrichlorosilane et n-octadécyltriéthoxysilane) a été théoriquement et expérimentalement démontrée, ceci pour des simples et doubles brins d'oligonucléotides. Cependant, la force d'interaction entre une surface hydrophobe et un oligonucléotide semble plus forte lors de l'adsorption d'un simple brin, comparée à une structure double brin.²⁷⁹ Dans le cas d'un simple brin, cette forte attraction hydrophobe avec la surface pourrait même provoquer la pénétration partielle de l'oligonucléotide dans une monocouche, comme cela a été déjà démontré avec des monocouches de n-octadécyltriéthoxysilanes.²⁷⁹ L'adsorption d'oligonucléotides simples brins via des interactions purement hydrophobes semble plus faible que via des interactions électrostatiques. Ces plus faibles interactions hydrophobes engendrent une conformation favorisant la formation de boucles d'oligonucléotide, alors que les fortes interactions électrostatiques favorisent une structure compacte de l'oligonucléotide adsorbé. De plus,

la quantité d'oligonucléotides simples brins adsorbés sur une surface hydrophobe a été estimée être 50% plus faible que sur une surface cationique. Les difficultés à prédire la conformation ou la quantité d'oligonucléotides adsorbés proviennent des nombreux paramètres à contrôler telles que la nature et la densité chimique de la surface. La structure de surface sur laquelle peuvent s'immobiliser un oligonucléotide doubles ou simples brins complique encore plus l'adsorption d'oligonucléotides.²⁸⁰

Quelques rares études ont tenté de décrire théoriquement et expérimentalement le comportement d'oligonucléotides adsorbés sur des surfaces hydrophiles neutres ou anioniques.^{279,280} L'adsorption d'oligonucléotides anioniques doubles brins sur une surface de même charge est possible via l'emploi de cations di- ou multivalents. Ce type d'adsorption engendre le plus souvent la compaction de l'oligonucléotide à la surface car elle implique aussi des interactions de type électrostatique.²⁸¹⁻²⁸³ En effet, le cation multivalent va permettre le pontage entre l'oligonucléotide et la surface, comme le décrit la théorie de condensation des contre-ions.²⁸¹⁻²⁸³ Sur une surface hydrophile neutre, l'adsorption d'oligonucléotides doubles et simples brins sur des SAMs d'éthylène glycol a été théoriquement démontrée et est supposée se produire via des liaisons hydrogène.^{279,280} Si dans le cas d'un oligonucléotide double brin, le site le plus probable de liaisons hydrogène semble être le squelette phosphate-sucré, l'identification de ce site est plus spéculée pour un oligonucléotide simple brin. Pourtant, la conformation de l'oligonucléotide simple brin immobilisé sera grandement dépendante du motif (nucléobase, sucre, groupement phosphate) impliqué dans les liaisons hydrogène avec la surface.

L'étude de l'adsorption d'oligonucléotides doubles et simples brins à l'interface eau/air sur des monocouches de lipides zwitterioniques semble néanmoins ouvrir la possibilité d'utiliser des interactions non-électrostatiques pour la thérapie génique à base de nanovecteurs non-cationiques.^{280, 284} Néanmoins, cette étude laisse apparaître qu'un grand nombre de paramètres sont à considérer pour permettre une complexation contrôlée. Au niveau du substrat, la densité, la nature chimique et la structure peuvent influencer les interactions avec l'oligonucléotide. Au niveau de l'oligonucléotide, la flexibilité, la structure repliée masquant les nucléobases hydrophobes ou la forme double ou simple

impactent l'adsorption avec la surface. Ainsi, le développement de nanovecteurs devra être pensé en fonction de l'oligonucléotide à délivrer et peut grandement différer entre un double brin d'ADN long et un simple brin de siARN court.

Les travaux présentés dans cette thèse et présentés au **Chapitre 5** étudient également l'adsorption de simples brins de siARN sur des surfaces hydrophobes, anioniques ou cationiques. Ces études ont permis d'élucider la relation entre la conformation du simple brin de siARN adsorbé et la nature des interactions avec la surface. Dans le cas de systèmes chimiquement hétérogènes, comme les micelles ou les liposomes, la complexation du simple brin de siARN avec le vecteur médicamenteux peut avoir lieu via différentes natures d'interactions entrant en compétition. La nature des interactions entre le siARN et le vecteur influence la quantité, la localisation mais aussi la structure du système médicamenteux.

1.5 Objectifs et structure de la thèse

L'objectif principal de cette thèse est d'étudier les interactions de surface en milieu aqueux de surfaces modèles de biomatériaux. L'étude des propriétés physico-chimiques de surface de biomatériaux (implantables ou injectables) est d'un intérêt capital pour le développement de systèmes à l'efficacité thérapeutique élevée. La surface d'un matériau étant la première zone de contact avec l'environnement, une bonne connaissance de ces propriétés de surface (adhésion, propriétés mécaniques et lubrifiantes et interactions non contact) permettra de mieux comprendre et donc de mieux moduler les interactions avec les systèmes biologiques.

Trois types de surfaces modèles ont été étudiées : des surfaces amino-fonctionnalisées, des surfaces autolubrifiantes et des surfaces pour la complexation de siARN. Cette thèse est structurée en sept chapitres.

Le **Chapitre 2** présente en détail la mesure des interactions de surface à l'aide d'un appareil de mesure des forces de surface (SFA) qui permet la mesure de forces normales et latérales permettant de décrire les interactions hors contact, l'adhésion et le frottement entre deux surfaces.

Le **Chapitre 3** présente la préparation et la caractérisation d'une monocouche auto-assemblée à base d'aminosilane greffée chimiquement sur des substrats de silice et de mica. Le protocole développé a permis la préparation d'une monocouche hydrolytiquement stable sur une large gamme de pH et ce, pour des temps d'immersion prolongés. L'influence de divers paramètres sur la stabilité hydrolytique et le contrôle de la densité de greffage est discutée de manière à approfondir les connaissances de ces systèmes auto-assemblés. Pour finir, la capacité de ces monocouches à immobiliser d'autres systèmes sera étudiée de manière à illustrer leurs potentiels d'applications. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Applied Surface Science* : « **Amino-functionalized Monolayers Covalently Grafted to Silica-Based Substrates as a Robust Primer Anchorage in Aqueous Media** » Lucie Giraud, Rakini Nadarajah, Yasmine Matar, Gwénaëlle Bazin, Jing Sun, X.X. Zhu, Suzanne Giasson, *Appl. Surf. Sci.*, **2016**, 370C, 476-485.

Le **Chapitre 4** présente la préparation et les propriétés tribologiques de surfaces nanostructurées à l'aide de particules molles et dures immobilisées en surface. Les particules à base de polyélectrolytes et de silice sont utilisées pour générer des motifs à la surface. L'impact de ces structures sur les propriétés adhésives et lubrifiantes est étudié en milieu aqueux à l'aide d'un SFA. Les mécanismes contrôlant les propriétés physico-chimiques de ces structures sont discutés et comparés avec ceux déjà rapportés dans la littérature. Cette étude fait l'objet d'une publication acceptée par *Langmuir* : « **Lubrication with Soft and Hard Two-Dimensional Colloidal Arrays** » Lucie Giraud, Gwénaëlle Bazin and Suzanne Giasson.

Le **Chapitre 5** décrit les interactions entre un ss-siARN et des surfaces planes hydrophiliques (chargées négativement et positivement) et hydrophobes. La force de ces interactions, ainsi que la conformation adoptée à la surface par le ss-siARN sont investiguées à l'aide d'un SFA. Les interactions identifiées sont par la suite mises à profit pour encapsuler des ss-siARN dans des nanovecteurs (micelles et liposomes) de charges variables. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Biomaterials* : « **Single Stranded siRNA Complexation through Non-Electrostatic Interactions** » Lucie Giraud, Warren Viricel, Jeanne Leblond, Suzanne Giasson, *Biomaterials*, **2017**, 113, 230–242.

Le **Chapitre 6** discute de la portée générale des résultats obtenus de ces trois études pour le développement de biomatériaux performants et innovants et conclut sur les travaux réalisés lors de cette thèse. Il présente de nouvelles voies de recherche possibles pour approfondir et élargir la compréhension des propriétés physico-chimiques de surface de manière à proposer des biomatériaux aux fonctionnalités innovantes.

1.6 Références

1. R. E. Baier, Correlations of Materials Surface Properties with Biological Responses. *J. Surf. Eng. Mater. Adv. Technol.* **05**, 42-51 (2015).
2. M. P. Staiger, A. M. Pietak, J. Huadmai, G. Dias, Magnesium and its Alloys as Orthopedic Biomaterials: a Review. *Biomaterials* **27**, 1728-1734 (2006).
3. M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano, J. A. Planell, Biomaterials in Orthopaedics. *J. R. Soc. Interface* **5**, 1137-1158 (2008).
4. R. W. Li, T. W. Chow, J. P. Matinlinna, Ceramic Dental Biomaterials and CAD/CAM Technology: State of the Art. *J. Prosthodont Res.* **58**, 208-216 (2014).
5. M. S. Sacks, A. Mirnajafi, W. Sun, P. Schmidt, Bioprosthetic Heart Valve Heterograft Biomaterials: Structure, Mechanical Behavior and Computational Simulation. *Expert Rev. Med. Devices* **3**, 817-834 (2006).
6. Z. S. Haidar, Bio-Inspired/-Functional Colloidal Core-Shell Polymeric-Based NanoSystems: Technology Promise in Tissue Engineering, Bioimaging and NanoMedicine. *Polymers* **2**, 323-352 (2010).
7. D. S. Kohane, R. Langer, Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering. *Pediatr. Res.* **63**, 487-491 (2008).
8. B. Karolewicz, A review of Polymers as Multifunctional Excipients in Drug Dosage Form Technology. *Saudi Pharm. J.* **24**, 525-536 (2015).
9. L. Xinming *et al.*, Polymeric Hydrogels for Novel Contact Lens-based Ophthalmic Drug Delivery Systems: A Review. *Cont. Lens. Anterior Eye* **31**, 57-64 (2008).
10. A. Halliday, M. Cook, Polymer-Based Drug Delivery Devices for Neurological Disorders. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **8**, 205-221 (2009).
11. S. K. Jaganathan, E. Supriyanto, S. Murugesan, A. Balaji, M. K. Asokan, Biomaterials in Cardiovascular Research: Applications and Clinical Implications. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 459-465 (2014).
12. A. Doulabi, K. Mequanint, H. Mohammadi, Blends and Nanocomposite Biomaterials for Articular Cartilage Tissue Engineering. *Materials* **7**, 5327-5355 (2014).
13. J. Liu, X. Zhan, J. Wan, Y. Wang, C. Wang, Review for Carrageenan-based Pharmaceutical Biomaterials: Favourable Physical Features Versus Adverse Biological Effects. *Carbohydr. Polym.* **121**, 27-36 (2015).
14. L. Cen, W. Liu, L. Cui, W. Zhang, Y. Cao, Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications. *Pediatr. Res.* **63**, 492-496 (2008).
15. X. Qiu, S. Hu, "Smart" Materials Based on Cellulose: A Review of the Preparations, Properties, and Applications. *Materials* **6**, 738-781 (2013).

16. C. Vepari, D. L. Kaplan, Silk as a Biomaterial. *Prog Polym Sci* **32**, 991-1007 (2007).
17. L. Fassina *et al.*, Use of a Gelatin Cryogel as Biomaterial Scaffold in the Differentiation Process of Human Bone Marrow Stromal Cells. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* **2010**, 247-250 (2010).
18. F. Croisier, C. Jérôme, Chitosan-based Biomaterials for Tissue Engineering. *Eur. Polym. J.* **49**, 780-792 (2013).
19. Y. P. Jiao, F. Z. Cui, Surface Modification of Polyester Biomaterials for Tissue Engineering. *Biomed. Mater.* **2**, R24-R37 (2007).
20. S. Ravi, E. L. Chaikof, Biomaterials for Vascular Tissue Engineering. *Regen. Med.* **5**, 107-120 (2010).
21. S. Singh, S. S. Ray, Polylactide Based Nanostructured Biomaterials and Their Applications. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **7**, 2596-2615 (2007).
22. D. P. Dowling, I. S. Miller, M. Ardhauoui, W. M. Gallagher, Effect of Surface Wettability and Topography on the Adhesion of Osteosarcoma Cells on Plasma-modified Polystyrene. *J. Biomater. Appl.* **26**, 327-347 (2011).
23. M. D. Mager, V. LaPointe, M. M. Stevens, Exploring and Exploiting Chemistry at the Cell Surface. *Nat. Chem.* **3**, 582-589 (2011).
24. H. Du, P. Chandaroy, S. W. Hui, Grafted Poly-(ethylene glycol) on Lipid Surfaces Inhibits Protein Adsorption and Cell Adhesion. *Biochim. Biophys. Acta* **1326**, 236-248 (1997).
25. C. E. McNamee, S. Yamamoto, K. Higashitani, Effect of the Physicochemical Properties of Poly(ethylene glycol) Brushes on Their Binding to Cells. *Biophys. J.* **93**, 324-334 (2007).
26. S. J. Oh, S. J. Cho, C. O. Kim, J. W. Park, Characteristics of DNA Microarrays Fabricated on Various Aminosilane Layers. *Langmuir* **18**, 1764-1769 (2002).
27. J. M. Brockman, A. G. Frutos, R. M. Corn, A Multistep Chemical Modification Procedure To Create DNA Arrays on Gold Surfaces for the Study of Protein-DNA Interactions with Surface Plasmon Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 8044-8051 (1999).
28. M. Tallawi *et al.*, Strategies for the Chemical and Biological Functionalization of Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering: A Review. *J. R. Soc. Interface* **12**, 20150254 (2015).
29. A. A. John *et al.*, Review: Physico-chemical Modification as a Versatile Strategy for the Biocompatibility Enhancement of Biomaterials. *RSC Adv.* **5**, 39232-39244 (2015).
30. R. A. Gittens *et al.*, The Effects of Combined Micron-/submicron-scale Surface Roughness and Nanoscale Features on Cell Proliferation and Differentiation. *Biomaterials* **32**, 3395-3403 (2011).
31. K. Nowlin, A. Boseman, A. Covell, D. LaJeunesse, Adhesion-dependent Rupturing of *Saccharomyces Cerevisiae* on Biological Antimicrobial Nanostructured Surfaces. *J. R. Soc. Interface* **12**, 20140999-20140999 (2014).
32. E. Cabane, X. Zhang, K. Langowska, C. G. Palivan, W. Meier, Stimuli-responsive polymers and their applications in nanomedicine. *Biointerphases* **7**, 9 (2012).

33. I. Lynch, I. L. Feitshans, M. Kendall, 'Bio-nano Interactions: New Tools, Insights and Impacts': Summary of the Royal Society Discussion Meeting. *Phil. Trans. R. Soc. B* **370**, 20140162 (2015).
34. A. E. Nel *et al.*, Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano-bio Interface. *Nat. Mater.* **8**, 543-557 (2009).
35. L. C. Cheng, X. Jiang, J. Wang, C. Chen, R. S. Liu, Nano-bio effects: interaction of nanomaterials with cells. *Nanoscale* **5**, 3547-3569 (2013).
36. S. E. Jin, J. W. Bae, S. Hong, Multiscale Observation of Biological Interactions of Nanocarriers: From Nano to Macro. *Microsc. Res. Tech.* **73**, 813-823 (2010).
37. A. Verma, F. Stellacci, Effect of Surface Properties on Nanoparticle-cell Interactions. *Small* **6**, 12-21 (2010).
38. D. A. Hammer, M. Tirrell, Biological Adhesion at Interfaces. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **26**, 651-691 (1996).
39. S. K. Aryaa, P. R. Solankia, M. Dattab, B. D. Malhotraa, Recent Advances in Self-Assembled Monolayers Based Biomolecular Electronic Devices. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 2810-2817 (2009).
40. H. A. Ching, D. Choudhury, M. J. Nine, N. A. Abu Osman, Effects of Surface Coating on Reducing Friction and Wear of Orthopaedic Implants. *Sci. Tech. Adv. Mater.* **15**, 014402 (014421pp) (2016).
41. P. R. Solanki, S. K. Arya, Y. Nishimura, M. Iwamoto, B. D. Malhotra, Cholesterol Biosensor Based on Amino-Undecanethiol Self-Assembled Monolayer Using Surface Plasmon Resonance Technique. *Langmuir* **23**, 7398-7403 (2007).
42. R. Murugan, P. Molnar, K. P. Rao, J. J. Hickman, Biomaterial Surface Patterning of Self Assembled Monolayers for Controlling Neuronal Cell Behavior. *Int. J. Biomed. Eng. Technol.* **2**, 104-134 (2009).
43. E. H. Williams *et al.*, Immobilization of Streptavidin on 4H-SiC for Biosensor Development. *Appl. Surf. Sci.* **258**, 6056-6063 (2012).
44. E. P. Simão, G. J. L. S. Barbieri, C. A. S. Andrade, M. D. L. Oliveira, Biosensor Based on Cysteine Monolayer and Monoclonal Antibody for Specific Detection of Aflatoxin B1 in Rice. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **27**, 1040-1047 (2015).
45. N. K. Chaki, K. Vijayamohanan, Self-assembled Monolayers as a Tunable Platform for Biosensor Applications. *Biosens. Bioelectron.* **17**, 1-12 (2002).
46. L. F. de Oliveira *et al.*, Functionalized Silica Nanoparticles As an Alternative Platform for Targeted Drug-Delivery of Water Insoluble Drugs. *Langmuir* **32**, 3217-3225 (2016).
47. O. Seitz *et al.*, Control and Stability of Self-Assembled Monolayers Under Biosensing Conditions. *J. Mater. Chem.* **21**, 4384-4392 (2011).
48. S. G. Thakurta, A. Subramanian, Fabrication of Dense, Uniform Aminosilane Monolayers: A platform for Protein or Ligand Immobilization. *Colloids Surf. A* **414**, 384-392 (2012).
49. J. Kim, J. Cho, P. M. Seidler, N. E. Kurland, V. K. Yadavalli, Investigations of Chemical Modifications of Amino-Terminated Organic Films on Silicon Substrates and Controlled Protein Immobilization. *Langmuir* **26**, 2599-2608 (2010).
50. R. L. Meyera *et al.*, Immobilisation of Living Bacteria for AFM Imaging under Physiological Conditions. *Ultramicroscopy* **110**, 1349-1357 (2010).

51. A. G. Frutos, Jennifer M. Brockman, R. M. Corn, Reversible Protection and Reactive Patterning of Amine-and Hydroxyl-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold Surfaces for the Fabrication of Biopolymer Arrays. *Langmuir* **16**, 2192-2197 (2000).
52. S. Noel, B. Liberelle, L. Robitaille, G. De Crescenzo, Quantification of Primary Amine Groups Available for Subsequent Biofunctionalization of Polymer Surfaces. *Bioconjug. Chem.* **22**, 1690-1699 (2011).
53. D. Aureau *et al.*, Controlled Deposition of Gold Nanoparticles on Well-Defined Organic Monolayer Grafted on Silicon Surfaces. *J. Phys. Chem. C* **114**, 14180-14186 (2010).
54. X. Banquy, X. X. Zhu, S. Giasson, Mechanical and Frictional Properties of Nanoparticle Monolayers Grafted on Functionalized Mica Substrates. *J. Phys. Chem. B* **112**, 12208–12216 (2008).
55. R. R. Bhat, J. Genzer, B. N. Chaney, H. W. Sugg, A. Liebmann-Vinson, Controlling the Assembly of Nanoparticles Using Surface Grafted Molecular and Macromolecular Gradients. *Nanotechnology* **14**, 1145-1152 (2003).
56. K. Yoncheva *et al.*, Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Oral Delivery of Budesonide. *J. Solid State Chem.* **211**, 154-161 (2014).
57. O. Palyvoda, C. Chen, G. W. Aunera, Culturing Neuron Cells on Electrode with Self-Assembly Monolayer. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 2346–2350 (2007).
58. H.-L. Li *et al.*, The Effect of Amino Density on the Attachment, Migration, and Differentiation of Rat Neural Stem. *Mol. Cells* **35**, 436-443 (2013).
59. Z. Ademovic, A. Gonera, P. Mischnick, D. Klee, Biocompatible Surface Preparation Using Amino-functionalized Amylose. *Biomacromolecules* **7**, 1429-1432 (2006).
60. E. P. Simão, G. J. L. S. Barbieri, C. A. S. Andrade, M. D. L. Oliveira, Biosensor Based on Cysteine Monolayer and Monoclonal Antibody for Specific Detection of Aflatoxin B1 in Rice. *J. Braz. Chem. Soc.* **6**, 1040-1047 (2015).
61. C. Chen *et al.*, Amino Group Introduction onto Multiwall Carbon Nanotubes by NH₃/Ar Plasma Treatment. *Carbon* **48**, 939-948 (2010).
62. J. Casimiro *et al.*, Introduction of Primary Amino Groups on Poly(ethylene terephthalate) Surfaces by Ammonia and a Mix of Nitrogen and Hydrogen Plasma. *Plasma Chem. Plasma Process.* **32**, 305-323 (2011).
63. K. S. Siow, L. Britcher, S. Kumar, H. J. Griesser, Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization - A Review. *Plasma Process. Polym.* **3**, 392-418 (2006).
64. C. Haensch, S. Hoepfener, U. S. Schubert, Chemical Modification of Self-assembled Silane Based Monolayers by Surface Reactions. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 2323-2334 (2010).
65. S. B. Hartono *et al.*, Poly-L-lysine Functionalized Large Pore Cubic Mesostructured Silica Nanoparticles as Biocompatible Carriers for Gene Delivery. *ACS Nano* **6**, 2104-2117 (2012).
66. M. Zhu, M. Z. Lerum, W. Chen, How to Prepare Reproducible, Homogeneous, and Hydrolytically Stable Aminosilane-derived Layers on Silica. *Langmuir* **28**, 416-423 (2012).

67. E. Asenath-Smith, W. Chen, How To Prevent the Loss of Surface Functionality Derived from Aminosilanes. *Langmuir* **24**, 12405-12409 (2008).
68. J. H. Moon, J. W. Shin, S. Y. Kim, J. W. Park, Formation of Uniform Aminosilane Thin Layers: An Imine Formation To Measure Relative Surface Density of the Amine Group. *Langmuir* **12**, 4621-4624 (1996).
69. W. C. Bigelow, D. L. Pickett, W. A. Zisman, Oleophobic Monolayers: I. Films Adsorbed from Solution in Non-polar Liquids. *J. Colloid Sci.* **1**, 513-538 (1946).
70. F. Zhang *et al.*, Chemical Vapor Deposition of Three Aminosilanes on Silicon Dioxide: Surface Characterization, Stability, Effects of Silane Concentration, and Cyanine Dye Adsorption. *Langmuir* **26**, 14648-14654 (2010).
71. B. Liberelle, X. Banquy, S. Giasson, Stability of Silanols and Grafted Alkylsilane Monolayers on Plasma-Activated Mica Surfaces. *Langmuir* **24**, 3280-3288 (2008).
72. M. T. McDermott, J.-B. D. Green, M. D. Porter, Scanning Force Microscopic Exploration of the Lubrication Capabilities of Alkanethiolate Monolayers Chemisorbed at Gold: Structural Basis of Microscopic Friction and Wear. *Langmuir* **13**, 2504-2510 (1997).
73. A. Lio, D. H. Charych, M. Salmeron, Comparative Atomic Force Microscopy Study of the Chain Length Dependence of Frictional Properties of Alkanethiols on Gold and Alkylsilanes on Mica. *J. Phys. Chem. B* **101**, 3800-3805 (1997).
74. X. Xiao, J. Hu, D. H. Charych, M. Salmeron, Chain Length Dependence of the Frictional Properties of Alkylsilane Molecules Self-Assembled on Mica Studied by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **12**, 235-237 (1996).
75. S. Onclin, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, Engineering silicon oxide surfaces using self-assembled monolayers. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 6282-6304 (2005).
76. I. B. Malham, L. Bureau, Growth and Stability of a Self-assembled Monolayer on Plasma-treated Mica. *Langmuir* **25**, 5631-5636 (2009).
77. J. Li, Y. J. Yuan, Physisorption and Chemisorption of a Self-assembled Monolayer by the Quartz Crystal Microbalance. *Langmuir* **30**, 9637-9642 (2014).
78. N. Belman, K. Jin, Y. Golan, J. N. Israelachvili, N. S. Pesika, Origin of the Contact Angle Hysteresis of Water on Chemisorbed and Physisorbed Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **28**, 14609-14617 (2012).
79. C. Meltzer *et al.*, Indentation and Self-Healing Mechanisms of a Self-Assembled Monolayer- A Combined Experimental and Modeling Study. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 10718-10727 (2014).
80. S. Norimoto, S. Morimine, T. Shimoaka, T. Hasegawa, Analysis of the Surface Coverage of a Self-Assembled Monolayer of Octadecyl Silane on a Si(100) Surface by Infrared External-Reflection Spectroscopy. *Anal. Sci.* **29**, 979-984 (2013).
81. N. Uyeda, T. Takenaka, K. Aoyama, M. Matsumoto, Y. Fujiyoshi, Holes in a Stearic Acid Monolayer Observed by Dark-field Electron Microscopy. *Nature* **327**, 319-321 (1987).
82. R. Murugan, P. Molnar, K. P. Rao, J. J. Hickman, Biomaterial Surface Patterning of Self-assembled monolayers for Controlling Neuronal Cell Behaviour. *Int. J. Biomed. Eng. Technol.* **2**, 104-134 (2009).
83. D. Chen *et al.*, An Extremely Rapid Dip-coating Method for Self-assembly of Octadecylphosphonic Acid and its Thermal Stability on an Aluminum Film. *J. Mater. Chem. C* **2**, 9941-9948 (2014).

84. A. R. Yadav, R. Sriram, J. A. Carter, B. L. Miller, Comparative Study of Solution–Phase and Vapor–Phase Deposition of Aminosilanes on Silicon Dioxide Surfaces. *Mat. Sci Eng. C* **35**, 283-290 (2014).
85. H. Sugimura *et al.*, Molecular Packing Density of a Self-assembled Monolayer Formed from N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltriethoxysilane by a Vapor Phase Process. *Chem. Commun.* **47**, 8841–8843 (2011).
86. N. Rathor, S. Panda, Aminosilane Densities on Nanotextured Silicon. *Mat. Sci Eng. C* **29**, 2340–2345 (2009).
87. M. J. Geerken *et al.*, Chemical and Thermal Stability of Alkylsilane Based Coatings for Membrane Emulsification *Adv. Funct. Mater* **6**, 749-754 (2004).
88. J. A. Howarter, J. P. Youngblood, Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir* **22**, 11142-11147 (2006).
89. S. R. Wasserman, Y.-T. Tao, G. M. Whitesides, Structure and Reactivity of Alkylsiloxane Monolayers Formed by Reaction of Alkyltrichlorosilanes on Silicon Substrates. *Langmuir* **5**, 1074-1087 (1989).
90. Y. Yang, A. M. Bittner, S. Baldelli, K. Kern, Study of Self-Assembled Triethoxysilane Thin Films Made by Casting Neat Reagents in Ambient Atmosphere. *Thin Solid Films* **516**, 3948-3956 (2008).
91. A. Chandekar, S. K. Sengupta, J. E. Whitten, Thermal Stability of Thiol and Silane Monolayers: A Comparative Study. *Appl. Surf. Sci.* **256**, 2742-2749 (2010).
92. Y. Cho, A. Ivanisevic, Covalent Attachment of TAT Peptides and Thiolated Alkyl Molecules on GaAs Surfaces. *J. Phys. Chem. B* **109**, 12731-12737 (2005).
93. W. A. Marmisollé, D. A. Capdevila, E. d. I. Llave, F. J. Williams, D. H. Murgida, Self-Assembled Monolayers of NH₂-Terminated Thiols: Order, pK_a, and Specific Adsorption. *Langmuir* **29**, 5351-5359 (2013).
94. Slowing, II, J. L. Vivero-Escoto, C. W. Wu, V. S. Lin, Mesoporous Silica Nanoparticles as Controlled Release Drug Delivery and Gene Transfection Carriers. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **60**, 1278-1288 (2008).
95. R. K. Iler, The Chemistry of Silica. *John Wiley & Sons New-York*, Chap 6 (1979).
96. J. D. Le Grange, J. L. Markham, C. R. Kurkjian, Effects of Surface Hydration on the Deposition of Silane Monolayers on Silica. *Langmuir* **9**, 1749-1753 (1993).
97. O. Borozenko, W. G. Skene, S. Giasson, Direct Polymerization of Polyacrylic Acid on Mica Substrates using ATRP - A Preliminary Study. *Macromol. Symp.* **297**, 1-5 (2010).
98. R. S. Tate *et al.*, Extraordinary Elevation of the Glass Transition Temperature of Thin Polymer Films Grafted to Silicon Oxide Substrates. *J. Chem. Phys.* **115**, 9982-9990 (2001).
99. O. Borozenko, V. Machado, W. G. Skene, S. Giasson, Organophosphonic Acids as Viable Linkers for the Covalent Attachment of Polyelectrolyte Brushes on Silica and Mica Surfaces. *Polym. Chem.* **5**, 5740-5750 (2014).
100. R. K. Iler, The Chemistry of Silica *Wiley New York*, (1979).
101. A. Neumann, A. Christel, C. Kasper, P. Behrens, BMP2-loaded Nanoporous Silica Nanoparticles Promote Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *RSC Adv.* **3**, 24222-24230 (2013).

102. V. Gupta, N. Madaan, D. S. Jensen, S. C. Kunzler, M. R. Linford, Hydrogen Plasma Treatment of Silicon Dioxide for Improved Silane Deposition. *Langmuir* **29**, 3604-3609 (2013).
103. O. Ouerghi *et al.*, Investigating Antibody–antigen Binding with Atomic Force Microscopy. *Sens. Actuator B-Chem.* **84**, 167-175 (2002).
104. T. J. Senden, W. A. Ducker, Surface Roughness of Plasma-treated Mica. *Langmuir* **8**, 733-735 (1992).
105. A. Heise, H. Menzel, Grafting of Polypeptides on Solid Substrates by Initiation of N-Carboxyanhydride Polymerization by Amino-Terminated Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **13**, 723-728 (1997).
106. R. Chintala *et al.*, Electrical Properties of Amino SAM Layers Studied with Conductive AFM. *Eur. Polym. J.* **49**, 1952-1956 (2013).
107. N. S. Bhairamadgi *et al.*, Hydrolytic and Thermal Stability of Organic Monolayers on Various Inorganic Substrates. *Langmuir* **30**, 5829–5839 (2014).
108. O. Borozenko *et al.*, Monitoring in Real-Time the Degrafting of Covalently Attached Fluorescent Polymer Brushes Grafted to Silica Substrates—Effects of pH and Salt. *Macromolecules* **44**, 8177-8184 (2011).
109. Y. Tong *et al.*, Preferential Adsorption of Amino-terminated Silane in a Binary Mixed Self-assembled Monolayer. *Langmuir* **27**, 5420-5426 (2011).
110. T. Fischer *et al.*, Quantification of Variable Functional-Group Densities of Mixed-Silane Monolayers on Surfaces via a Dual-Mode Fluorescence and XPS Label. *Anal. Chem.* **87**, 2685–2692 (2015).
111. M. Roba, E. G. Duncan, G. A. Hill, N. D. Spencer, S. G. P. Tosatti, Friction Measurements on Contact Lenses in Their Operating Environment. *Tribol. Lett.* **44**, 387-397 (2011).
112. S. M. Rowland, R. B. Wright, Catheter and Hydrophilic Friction Reducing Coating Thereon. *U.S Patent No*, 5,041,100 (1991).
113. K. Ishihara, Highly Lubricated Polymer Interfaces for Advanced Artificial Hip Joints Through Biomimetic Design. *Polym. J.* **47**, 585-597 (2015).
114. H. J. Kwon, Tissue Engineering of Muscles and Cartilages Using Polyelectrolyte Hydrogels. *Adv. Mat. Sci. Eng.* **2014**, 1-7 (2014).
115. H. J. Kwon, K. Yasuda, J. P. Gong, Y. Ohmiya, Polyelectrolyte Hydrogels for Replacement and Regeneration of Biological Tissues. *Macromol. Res.* **22**, 227-235 (2014).
116. Q. Rong, J. Bai, Y. Huang, J. Lin, Biomechanical Assessment of a Patient-specific Knee Implant Design Using Finite Element Method. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 353690 (2014).
117. R. Crockett, N. D. Spencer, Aqueous Lubrication: Natural and Biomimetic Approaches. **Chapitre 1**, (2014).
118. J. Sotres, T. Arnebrant, Experimental Investigations of Biological Lubrication at the Nanoscale: The Cases of Synovial Joints and the Oral Cavity. *Lubricants* **1**, 102-131 (2013).
119. A. Dédinaïté, Biomimetic Lubrication. *Soft Matter* **8**, 273-284 (2012).
120. U. Raviv *et al.*, Lubrication by Charged Polymers. *Nature* **425**, 163-165 (2003).
121. T. Kang *et al.*, Mussel-Inspired Anchoring of Polymer Loops That Provide Superior Surface Lubrication and Antifouling Properties. *ACS Nano* **10**, 930-937 (2016).

122. J. Seror, L. Zhu, R. Goldberg, A. J. Day, J. Klein, Supramolecular Synergy in the Boundary Lubrication of Synovial Joints. *Nat. Commun.* **6**, 1-7 (2015).
123. X. Liu *et al.*, Low Friction and High Load Bearing Capacity Layers Formed by Cationic-Block-Non-Ionic Bottle-Brush Copolymers in Aqueous Media. *Soft Matter* **9**, 5361-5371 (2013).
124. G. Liu *et al.*, Hairy Polyelectrolyte Brushes-grafted Thermosensitive Microgels as Artificial Synovial Fluid for Simultaneous Biomimetic Lubrication and Arthritis Treatment. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 20452-20463 (2014).
125. M. Kang, Y. M. Park, B. H. Kim, Y. H. Seo, Micro- and Nanoscale Surface Texturing Effects on Surface Friction. *Appl. Surf. Sci.* **345**, 344-348 (2015).
126. M. J. Baum, L. Heepe, S. N. Gorb, Friction Behavior of a Microstructured Polymer Surface Inspired by Snake Skin. *Beilstein J. Nanotechnol.* **5**, 83-97 (2014).
127. B. McDonald, P. Patel, B. Zhao, Micro-Structured Polymer Film Mimicking the Trembling Aspen Leaf. *Chem. Eng. Process. Tech.* **1**, 1012-1020 (2013).
128. D. Labonte, J. A. Williams, W. Federle, Surface Contact and Design of Fibrillar 'Friction Pads' in Stick Insects (*Carausius morosus*): Mechanisms for Large Friction Coefficients and Negligible Adhesion. *J. R. Soc. Interface* **11**, 20140034 (2014).
129. C. Greiner, M. Schafer, U. Popp, P. Gumbsch, Contact Splitting and the Effect of Dimple Depth on Static Friction of Textured Surfaces. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 7986-7990 (2014).
130. M. Wakuda, Y. Yamauchi, S. Kanzaki, Y. Yasuda, Effect of Surface Texturing on Friction Reduction Between Ceramic and Steel Materials Under Lubricated Sliding Contact. *Wear* **254**, 356-363 (2003).
131. M. A. Stuart *et al.*, Emerging Applications of Stimuli-responsive Polymer Materials. *Nat. Mater.* **9**, 101-113 (2010).
132. K. Petrak, Review : Polyelectrolyte Complexes in Biomedical Applications. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **1**, 202-219 (1986).
133. E. Cabane, X. Zhang, K. Langowska, C. G. Palivan, W. Meier, Stimuli-responsive Polymers and Their Applications in Nanomedicine. *Biointerphases* **7**, 9-36 (2012).
134. R. R. Costa, J. F. Mano, Polyelectrolyte Multilayered Assemblies in Biomedical Technologies. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 3453-3479 (2014).
135. M. A. Abd El-Ghaffar, M. S. Hashem, M. K. El-Awady, A. M. Rabie, pH-sensitive Sodium Alginate Hydrogels for Riboflavin Controlled Release. *Carbohydr. Polym.* **89**, 667-675 (2012).
136. N.-Y. Yuan *et al.*, Fabrication and Characterization of Chondroitin Sulfate-modified Chitosan Membranes for Biomedical Applications. *Desalination* **234**, 166-174 (2008).
137. L. Y. Chou, K. Zagorovsky, W. C. Chan, DNA Assembly of Nanoparticle Superstructures for Controlled Biological Delivery and Elimination. *Nat. Nanotech.* **9**, 148-155 (2014).
138. J. Yang *et al.*, Salt-Responsive Zwitterionic Polymer Brushes with Tunable Friction and Antifouling Properties. *Langmuir* **31**, 9125-9133 (2015).
139. N. Ayres, C. D. Cyrus, W. J. Brittain, Stimuli-responsive Surfaces Using Polyampholyte Polymer Brushes Prepared Via Atom Transfer Radical Polymerization. *Langmuir* **23**, 3744-3749 (2007).

140. A.-S. Bouchet, C. Cazeneuve, N. Baghdadli, G. S. Luengo, C. Drummond, Experimental Study and Modeling of Boundary Lubricant Polyelectrolyte Films. *Macromolecules* **48**, 2244-2253 (2015).
141. A. Mateescu, Y. Wang, J. Dostalek, U. Jonas, Thin Hydrogel Films for Optical Biosensor Applications. *Membranes (Basel)* **2**, 40-69 (2012).
142. P. Gong, T. Wu, J. Genzer, I. Szleifer, Behavior of Surface-Anchored Poly(acrylic acid) Brushes with Grafting Density Gradients on Solid Substrates: 2. Theory. *Macromolecules* **40**, 8765-8773 (2007).
143. Q. Wei, M. Cai, F. Zhou, W. Liu, Dramatically Tuning Friction Using Responsive Polyelectrolyte Brushes. *Macromolecules* **46**, 9368-9379 (2013).
144. M. Chen, W. H. Briscoe, S. P. Armes, J. Klein, Lubrication at Physiological Pressures by Polyzwitterionic Brushes. *Science* **323**, 1698-1701 (2009).
145. U. Raviv *et al.*, Normal and Frictional Forces Between Surfaces Bearing Polyelectrolyte Brushes. *Langmuir* **24**, 8678-8687 (2008).
146. O. Borozenko, V. Machado, W. G. Skene, S. Giasson, Organophosphonic Acids as Viable Linkers for the Covalent Attachment of Polyelectrolyte Brushes on Silica and Mica Surfaces. *Polym. Chem.* **5**, 5740-5750 (2014).
147. M. Kobayashi, M. Terada, A. Takahara, Polyelectrolyte Brushes: a Novel Stable Lubrication System in Aqueous Conditions. *Farad. Discuss.* **156**, 403-412 (2012).
148. O. Borozenko, C. Ou, W. G. Skene, S. Giasson, Polystyrene-block-poly(acrylic acid) brushes grafted from silica surfaces: pH- and salt- dependent switching studies. *Polym. Chem.* **5**, 2242-2252 (2014).
149. S. N. Ramakrishna, R. M. Espinosa-Marzal, V. V. Naik, P. C. Nalam, N. D. Spencer, Adhesion and Friction Properties of Polymer Brushes on Rough Surfaces: A Gradient Approach. *Langmuir* **29**, 15251-15259 (2013).
150. B. Liberelle, S. Giasson, Friction and Normal Interaction Forces between Irreversibly Attached Weakly Charged Polymer Brushes. *Langmuir* **24**, 1550-1559 (2008).
151. E. P. K. Currie, W. Norde, M. A. Cohen Stuart, Tethered Polymer Chains: Surface Chemistry and their Impact on Colloidal and Surface Properties. *Adv. Colloid Interface Sci.* **100-102**, 205-265 (2003).
152. M. Ballauff, O. Borisov, Polyelectrolyte Brushes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **11**, 316-323 (2006).
153. O. V. Borisov, E. B. Zhulina, Structure of Weakly Charged Polyelectrolyte Brushes: Monomer Density Profiles. *J. Phys. II* **7**, 449-458 (1997).
154. R. Dong, M. Lindau, C. K. Ober, Dissociation Behavior of Weak Polyelectrolyte Brushes on a Planar Surface. *Langmuir* **25**, 4774-4779 (2009).
155. S. Schmidt *et al.*, Control of Cell Adhesion by Mechanical Reinforcement of Soft Polyelectrolyte Films with Nanoparticles. *Langmuir* **28**, 7249-7257 (2012).
156. D. Patton, W. Knoll, R. C. Advincula, Polymer Loops vs. Brushes on Surfaces: Adsorption, Kinetics, and Viscoelastic Behavior of α,ω -Thiol Telechelics on Gold. *Macromol. Chem. Phys.* **212**, 485-497 (2011).
157. A. Milchev, K. Binder, Adsorption of Oligomers and Polymers into a Polymer Brush Formed from Grafted Ring Polymers. *Macromolecules* **46**, 8724-8731 (2013).

158. B. Dean, B. Bhushan, Shark-skin Surfaces for Fluid-drag Reduction in Turbulent Flow: A Review. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* **368**, 4775-4806 (2010).
159. B. Bhushan, Bioinspired structured surfaces. *Langmuir* **28**, 1698-1714 (2012).
160. W. Federle, W. J. Barnes, W. Baumgartner, P. Drechsler, J. M. Smith, Wet but not Slippery: Boundary Friction in Tree Frog Adhesive Toe Pads. *J. R. Soc. Interface* **3**, 689-697 (2006).
161. J.-S. Kwak, T.-W. Kim, A review of adhesion and friction models for gecko feet. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing* **11**, 171-186 (2010).
162. W. Barthlott, C. Neinhuis, Purity of the Sacred Lotus, or Escape from Contamination in Biological Surfaces. *Planta* **202**, 1-8 (1997).
163. C. Neinhuis, Characterization and Distribution of Water-repellent, Self-cleaning Plant Surfaces. *Annals of Botany* **79**, 667-677 (1997).
164. P. Wagner, Quantitative Assessment to the Structural Basis of Water Repellency in Natural and Technical Surfaces. *J. Exp. Bot.* **54**, 1295-1303 (2003).
165. B. Bhushan, Y. C. Jung, Micro- and Nanoscale Characterization of Hydrophobic and Hydrophilic Leaf Surfaces. *Nanotechnology* **17**, 2758-2772 (2006).
166. M. Jin *et al.*, Superhydrophobic Aligned Polystyrene Nanotube Films with High Adhesive Force. *Adv. Mater.* **17**, 1977-1981 (2005).
167. L. Feng *et al.*, Petal Effect: A Superhydrophobic State with High Adhesive Force. *Langmuir* **24**, 4114-4119 (2008).
168. A. J. Schulte, D. M. Droste, K. Koch, W. Barthlott, Hierarchically Structured Superhydrophobic Flowers with Low Hysteresis of the Wild Pansy (*Viola tricolor*) - New Design Principles for Biomimetic Materials. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2**, 228-236 (2011).
169. B. Quignon *et al.*, Sustained Frictional Instabilities on Nanodomed Surfaces: Stick-Slip Amplitude Coefficient. *ACS Nano* **7**, 10850-10862 (2013).
170. X. Banquy, E. Charrault, S. Giasson, Normal and Lateral Interactions between Thermosensitive Nanoparticle Monolayers in Water. *J. Phys. Chem. B* **114**, 9721-9728 (2010).
171. B. He, W. Chen, Q. Jane Wang, Surface Texture Effect on Friction of a Microtextured Poly(dimethylsiloxane) (PDMS). *Tribol. Lett.* **31**, 187-197 (2008).
172. W. Zhao, L. Wang, Q. Xue, Design and Fabrication of Nanopillar Patterned Au Textures for Improving Nanotribological Performance. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2**, 788-794 (2010).
173. B.-K. Chao *et al.*, Anti-reflection Textured Structures by Wet Etching and Island Lithography for Surface-enhanced Raman Spectroscopy. *Appl. Surf. Sci.* **357**, 615-621 (2015).
174. M. Zou, L. Cai, H. Wang, Adhesion and Friction Studies of a Nano-Textured Surface Produced by Spin Coating of Colloidal Silica Nanoparticle Solution. *Tribol. Lett.* **21**, 25-30 (2006).
175. S. Williams, P. Davies, J. Bowen, C. Allender, Controlling the Nanoscale Patterning of AuNPs on Silicon Surfaces. *Nanomaterials* **3**, 192-203 (2013).
176. L. Han *et al.*, Tunable Stimulus-responsive Friction Mechanisms of Polyelectrolyte Films and Tube Forests. *Soft Matter* **8**, 8642-8650 (2012).

177. A. Checco, A. Rahman, C. T. Black, Robust Superhydrophobicity in Large-area Nanostructured Surfaces Defined by Block-copolymer Self Assembly. *Adv. Mater.* **26**, 886-891 (2014).
178. V. R. Tirumala, R. Divan, L. E. Ocola, D. C. Mancini, Direct-write e-beam Patterning of Stimuli-responsive Hydrogel Nanostructures. *J. Vac. Sci. Technol., B: Microelectron. Nanometer Struct.--Process., Meas., Phenom.* **23**, 3124 (2005).
179. X. Wang *et al.*, Nanopatterns of Polymer Brushes for Understanding Protein Adsorption on the Nanoscale. *RSC Adv.* **4**, 45059-45064 (2014).
180. W. Kuhn, O. Künzle, A. Katchalsky, Verhalten Polyvalenter Fadenmolekelionen in Lösung. *Helv. Chim. Acta* **31**, 1994-2037 (1948).
181. W. B. Russel, D. A. S. Saville, W. R., Colloidal Dispersions. *New York: Cambridge University Press.*, (1989).
182. W. Kuhn, B. Hargitay, A. Katchalsky, H. Eisenberg, Reversible Dilation and Contraction by Changing the State of Ionization of High-Polymer Acid Networks. *Nature* **165**, 514-516 (1950).
183. R. Skouri, F. Schosseler, J. P. Munch, S. J. Candau, Swelling and Elastic Properties of Polyelectrolyte Gels. *Macromolecules* **28**, 197-210 (1995).
184. F. Ganji, S. Vasheghani-Farahani, E. Vasheghani-Farahani, Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iran. Polym. J.* **19**, 375-398 (2010).
185. P. G. de Gennes, Conformations of Polymers Attached to an Interface. *Macromolecules* **13**, 1069-1075 (1980).
186. J. N. Israelachvili, Intermolecular and Surface Forces. *Academic Press Third Edition*, (2011).
187. S. Alexander, Adsorption of Chain Molecules with a Polar Head a Scaling Description. *J. Phys (Paris)* **38**, 983-987 (1977).
188. P. Pincus, Colloid Stabilization with Grafted Polyelectrolytes. *Macromolecules* **24**, 2912-2919 (1991).
189. E. B. Zhulina, T. M. Birshtein, O. V. Borisov, Theory of Ionizable Polymer Brushes. *Macromolecules* **28**, 1491-1499 (1995).
190. M. Biesalski, D. Johannsmann, J. Rühle, Synthesis and Swelling Behavior of a Weak Polyacid Brush. *J. Chem. Phys.* **117**, 4988-4994 (2002).
191. J. Gensel *et al.*, Surface Immobilized Block Copolymer Micelles with Switchable Accessibility of Hydrophobic Pockets. *Soft Matter* **7**, 11144-11153 (2011).
192. M. K. Kang, R. U. I. Huang, Swelling-Induced Instability of Substrate-Attached Hydrogel Lines. *Int. Appl. Mech.* **03**, 219-233 (2011).
193. V. Yadav, A. V. Harkin, M. L. Robertson, J. C. Conrad, Hysteretic Memory in pH-response of Water Contact Angle on Poly(acrylic acid) Brushes. *Soft Matter* **12**, 3589-3599 (2016).
194. D. Aulich *et al.*, In Situ Studies on the Switching Behavior of Ultrathin Poly(acrylic acid) Polyelectrolyte Brushes in Different Aqueous Environments. *Langmuir* **26**, 12926-12932 (2010).
195. R. Dong, M. Lindau, C. K. Ober, Dissociation Behavior of Weak Polyelectrolyte Brushes on a Planar Surface. *Langmuir* **25**, 4774-4779 (2009).
196. A. Bousquet *et al.*, pH Responsive Surfaces with Nanoscale Topography. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **48**, 2982-2990 (2010).

197. K. van der Maaden, K. Sliedregt, A. Kros, W. Jiskoot, J. Bouwstra, Fluorescent Nanoparticle Adhesion Assay: a Novel Method for Surface pKa Determination of Self-Assembled Monolayers on Silicon Surfaces. *Langmuir* **28**, 3403–3411 (2012).
198. S. E. Creager, J. Clarke, Contact-Angle Titrations of Mixed .omega.-Mercaptoalkanoic Acid/Alkanethiol Monolayers on Gold. Reactive vs Nonreactive Spreading, and Chain Length Effects on Surface pKa Values. *Langmuir* **10**, 3675-3683 (1994).
199. A. B. D. Cassie, S. Baxter, Wettability of Porous Surfaces. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **40**, 546 (1944).
200. C. Ishino, K. Okumura, Wetting Transitions on Textured Hydrophilic Surfaces. *Eur. Phys. J. E. Soft Matter* **25**, 415-424 (2008).
201. A. B. D. Cassie, S. Baxter, Wettability of porous surfaces. *Transactions of the Faraday Society* **40**, 546 (1944).
202. R. N. Wenzel, Resistance of Solid Surfaces to Wetting by Water. *Ind. Eng. Chem. Res.* **28**, 988-994 (1936).
203. M. R. Falvo *et al.*, Nanometre-scale Rolling and Sliding of Carbon Nanotubes. *Nature* **397**, 236-238 (1999).
204. S. Kalasin, M. M. Santore, Engineering Nanoscale Surface Features to Sustain Microparticle Rolling in Flow. *ACS Nano* **9**, 4706-4716 (2015).
205. J. M. Coles, D. P. Chang, S. Zauscher, Molecular Mechanisms of Aqueous Boundary Lubrication by Mucinous Glycoproteins. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **15**, 406-416 (2010).
206. S. Jahn, J. Klein, Hydration Lubrication: The Macromolecular Domain. *Macromolecules* **48**, 5059-5075 (2015).
207. R. A. Eguiluz, R. Schur, D. Gourdon, Lubrication and Adhesion by Charged Biopolymers for Biomedical Applications, *Biopolymers Magdy Elnashar (Ed.), Intech* Available from: <http://www.intechopen.com/books/biopolymers/lubrication-and-adhesion-by-charged-biopolymers-for-biomedical-applications>, (2010).
208. S. Giasson, J. M. Lagleize, J. Rodriguez-Hernandez, C. Drummond, Boundary Lubricant Polymer Films: Effect of Cross-linking. *Langmuir* **29**, 12936-12949 (2013).
209. G. Gunkel-Grabole *et al.*, Polymeric 3D Nano-architectures for Transport and Delivery of Therapeutically Relevant Biomacromolecules. *Biomater. Sci.* **3**, 25-40 (2015).
210. B. J. Bruno, G. D. Miller, C. S. Lim, Basics and Recent Advances in Peptide and Protein Drug Delivery. *Ther. Deliv.* **4**, 1443-1467 (2013).
211. B. Yu, X. Zhao, L. J. Lee, R. J. Lee, Targeted Delivery Systems for Oligonucleotide Therapeutics. *AAPS J* **11**, 195-203 (2009).
212. R. Kole, A. R. Krainer, S. Altman, RNA Therapeutics: Beyond RNA Interference and Antisense Oligonucleotides. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **11**, 125-140 (2012).
213. N. Dias, C. A. Stein, Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms. *Mol. Cancer. Ther.* **1**, 347-355 (2002).
214. Y. Nakayama, Hyperbranched Polymeric "Star Vectors" for Effective DNA or siRNA Delivery. *Acc. Chem. Res.* **45**, 994-1004 (2012).

215. S. Crunkhorn, Success in Amyloidosis Trials Supports Potential of Systemic RNAi. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **12**, 818-818 (2013).
216. J. Li *et al.*, A Reduction and pH Dual-Sensitive Polymeric Vector for Long-Circulating and Tumor-Targeted siRNA Delivery. *Adv. Mater.* **26**, 8217–8224 (2014).
217. E. P. Thi *et al.*, Lipid Nanoparticle siRNA Treatment of Ebola-virus-Makona-infected Nonhuman Primates. *Nature* **521**, 362-365 (2015).
218. C. Scholz, E. Wagner, Therapeutic Plasmid DNA Versus siRNA Delivery: Common and Different Tasks for Synthetic Carriers. *J Control Release* **161**, 554-565 (2012).
219. G. Wang *et al.*, Studying Different Binding and Intracellular Delivery Efficiency of ssDNA Single-Walled Carbon Nanotubes and Their Effects on LC3- Related Autophagy in Renal Mesangial Cells via miRNA-382. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 25733–25740 (2015).
220. X. Xu *et al.*, Ultra-pH-Responsive and Tumor-Penetrating Nanoplatform for Targeted siRNA Delivery with Robust Anti-Cancer Efficacy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 1-5 (2016).
221. V. D. Badwaik *et al.*, Structure-property Relationship for in Vitro siRNA Delivery Performance of Cationic 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: PEG-PPG-PEG Polyrotaxane Vectors. *Biomaterials* **84**, 86-98 (2016).
222. S. C. Semple *et al.*, Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery. *Nat. Biotechnol.* **28**, 172-176 (2010).
223. K. A. Whitehead, R. Langer, D. G. Anderson, Knocking Down Barriers: Advances in siRNA Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 129-138 (2009).
224. H.-K. Kim, E. Davaa, C.-S. Myung, J.-S. Park, Enhanced siRNA Delivery Using Cationic Liposomes with New Polyarginine-conjugated PEG-lipid. *Int. J. Pharm.* **392**, 141–147 (2010).
225. Y. Xia, J. Tian, X. Chen, Effect of Surface Properties on Liposomal siRNA Delivery. *Biomaterials* **79**, 56-68 (2016).
226. B. Yu, X. Zhao, L. J. Lee, R. J. Lee, Targeted Delivery Systems for Oligonucleotide Therapeutics. *AAPS J.* **11**, 195-203 (2009).
227. D. H. Kim, J. J. Rossi, Strategies for Silencing Human Disease Using RNA Interference. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 173-184 (2007).
228. N. S. Que-Gewirth, B. A. Sullenger, Gene Therapy Progress and Prospects: RNA Aptamers. *Gene. Ther.* **14**, 283-291 (2007).
229. L. A. Phylactou, M. W. Kilpatrick, M. J. A. Wood, Ribozymes as Therapeutic Tools for Genetic Disease. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1649–1653 (1998).
230. A. Fire *et al.*, Potent and Specific Genetic Interference by Double-stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature* **391**, 806-811 (1998).
231. S. M. Elbashir *et al.*, Duplexes of 21-nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells. *Nature* **411**, 494-498 (2001).
232. J. K. Lam, M. Y. Chow, Y. Zhang, S. W. Leung, siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids* **4**, e252 (2015).
233. R. Kanasty, J. R. Dorkin, A. Vegas, D. Anderson, Delivery Materials for siRNA Therapeutics. *Nat. Mater* **12**, 967-977 (2013).

234. L. Aagaard, J. J. Rossi, RNAi Therapeutics: Principles, Prospects and Challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 75-86 (2007).
235. D. D. Rao, J. S. Vorhies, N. Senzer, J. Nemunaitis, siRNA vs. shRNA: Similarities and Differences. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 746-759 (2009).
236. B. L. Davidson, A. M. Monteys, Singles Engage the RNA Interference Pathway. *Cell* **150**, 873-875 (2012).
237. T. Holen, M. Amarzguioui, E. Babaie, H. Prydz, Similar behaviour of single-strand and double-strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2401-2407 (2003).
238. W. F. Lima *et al.*, Single-Stranded siRNAs Activate RNAi in Animals. *Cell* **150**, 883-894 (2012).
239. S. Mao, W. Sun, T. Kissel, Chitosan-based Formulations for Delivery of DNA and siRNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 12-27 (2010).
240. D. C. Forbes, N. A. Peppas, Polycationic Nanoparticles for siRNA Delivery: Comparing ARGET ATRP and UV-initiated Formulations. *ACS Nano* **8**, 2908-2917 (2014).
241. J. Li *et al.*, A reduction and pH dual-sensitive polymeric vector for long-circulating and tumor-targeted siRNA delivery. *Adv Mater* **26**, 8217-8224 (2014).
242. P. Midoux, C. Pichon, J. J. Yaouanc, P. A. Jaffres, Chemical Vectors for Gene Delivery: a Current Review on Polymers, Peptides and Lipids Containing Histidine or Imidazole as Nucleic Acids Carriers. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 166-178 (2009).
243. A. Schroeder, C. G. Levins, C. Cortez, R. Langer, D. G. Anderson, Lipid-based Nanotherapeutics for siRNA Delivery. *J. Intern. Med.* **267**, 9-21 (2010).
244. C. A. Hong, Y. S. Nam, Functional Nanostructures for Effective Delivery of Small Interfering RNA Therapeutics. *Theranostics* **4**, 1211-1232 (2014).
245. T. Suma *et al.*, Smart Multilayered Assembly for Biocompatible siRNA Delivery Featuring Dissolvable Silica, Endosome-disrupting Polycation, and Detachable PEG. *ACS Nano* **6**, 6693-6705 (2012).
246. R. Kanasty, J. R. Dorkin, A. Vegas, D. Anderson, Delivery Materials for siRNA Therapeutics. *Nat. Mater.* **12**, 967-977 (2013).
247. B. Ballarin-Gonzalez, K. A. Howard, Polycation-based Nanoparticle Delivery of RNAi Therapeutics: Adverse Effects and Solutions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 1717-1729 (2012).
248. Y. Fedorov *et al.*, Off-target Effects by siRNA Can Induce Toxic Phenotype. *RNA* **12**, 1188-1196 (2006).
249. A. L. Jackson, P. S. Linsley, Recognizing and Avoiding siRNA Off-target Effects for Target Identification and Therapeutic Application. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 57-67 (2010).
250. Y. Fedrov *et al.*, Off-target Effects by siRNA Can induce Toxic Phenotype. *RNA* **12**, 1188-1196 (2006).
251. J. B. Bramsen *et al.*, Improved silencing properties using small internally segmented interfering RNAs. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5886-5897 (2007).
252. D. H. Kim, J. J. Rossi, Strategies for Silencing Human Disease Using RNA Interference. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 173-184 (2007).
253. K. A. Whitehead, R. Langer, D. G. Anderson, Knocking Down Barriers: Advances in siRNA Delivery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **8**, 129-138 (2009).

254. R. Kanasty, J. R. Dorkin, A. Vegas, D. Anderson, Delivery Materials for siRNA Therapeutics. *Nat. Mat.* **12**, 967-977 (2013).
255. J. Wang, Z. Lu, M. G. Wientjes, J. L.-S. Au, Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers. *AAPS J.* **12**, 492-503 (2010).
256. K. Gavrilova, a. W. M. Saltzman, Therapeutic siRNA: Principles, Challenges and Strategies. *Yale J. Biol. & M.* **85**, 187-200 (2012).
257. H. J. Haringsma *et al.*, mRNA Knockdown by Single Strand RNA is Improved by Chemical Modifications. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4125-4136 (2012).
258. J. H. Jeong, H. Mok, Y. K. Oh, T. G. Park, siRNA Conjugate Delivery Systems. *Bioconjug. Chem.* **20**, 5-14 (2009).
259. K. Gao, L. Huang, Nonviral Methods for siRNA Delivery. *Mol. Pharm.* **6**, 651-658 (2009).
260. J. Wang, Z. Lu, M. G. Wientjes, J. L. Au, Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers. *AAPS J.* **12**, 492-503 (2010).
261. S.-Y. Lee *et al.*, Stability and Cellular Uptake of Polymerized siRNA (poly-siRNA)/polyethylenimine (PEI) Complexes for Efficient Gene Silencing. *J. Control. Release* **141**, 339-346 (2010).
262. H. J. Haringsma *et al.*, mRNA Knockdown by Single Strand RNA is Improved by Chemical Modifications. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4125-4136 (2012).
263. S. Xu *et al.*, Direct Force Measurements Between siRNA and Chitosan Molecules Using Force Spectroscopy. *Biophys J.* **93**, 952-959 (2007).
264. K. T. Love *et al.*, Lipid-like Materials for Low-dose, in Vivo Gene Silencing. *PNAS* **107**, 1864-1869 (2010).
265. D. Zhi *et al.*, The Headgroup Evolution of Cationic Lipids for Gene Delivery. *Bioconjugate Chem* **24**, 487-519 (2013).
266. M. E. Davis, The First Targeted Delivery of siRNA in Humans via a Self-Assembling, Cyclodextrin Polymer-Based Nanoparticle: From Concept to Clinic. *Mol. Pharm.* **6**, 659-668 (2009).
267. M. E. Davis *et al.*, Evidence of RNAi in Humans from Systemically Administered siRNA via Targeted Nanoparticles. *Nature* **464**, 494-498 (2010).
268. R. W. Malone, P. L. Felgner, I. M. Verma, Cationic Liposome-mediated RNA Transfection. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **86**, 6077-6081 (1989).
269. D. Zhi *et al.*, The Headgroup Evolution of Cationic Lipids for Gene Delivery. *Bioconjug Chem.* **24**, 487-519 (2013).
270. S. C. Semple *et al.*, Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery. *Nat. Biotechnol.* **28**, 172-176 (2010).
271. A. Malek *et al.*, In vivo Pharmacokinetics, Tissue Distribution and Underlying Mechanisms of Various PEI(-PEG)/siRNA Complexes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **236**, 97-108 (2009).
272. B. B. Lundy, A. Convertine, M. Miteva, P. S. Stayton, Neutral Polymeric Micelles for RNA Delivery. *Bioconjug. Chem.* **24**, 398-407 (2013).
273. F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, O. C. Farokhzad, Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **5**, 505-515 (2008).
274. Y. Tan, L. Huang, Overcoming the Inflammatory Toxicity of Cationic Gene Vectors. *J. Drug Target* **10**, 153-160 (2002).

275. V. Chan, S. E. McKenzie, S. Surrey, P. Fortina, D. J. Graves, Effect of Hydrophobicity and Electrostatics on Adsorption and Surface Diffusion of DNA Oligonucleotides at Liquid/Solid Interfaces. *J. Colloid Interface Sci* **203**, 197–207 (1998).
276. K. Singha, R. Namgung, W. J. Kim, Polymers in Small-interfering RNA Delivery. *Nucleic Acid Ther.* **21**, 133-147 (2011).
277. H. Lee *et al.*, Molecularly Self-assembled Nucleic Acid Nanoparticles for Targeted in Vivo siRNA Delivery. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 389-393 (2012).
278. M. Raouane, D. Desmaele, G. Urbinati, L. Massaad-Massade, P. Couvreur, Lipid Conjugated Oligonucleotides: A Useful Strategy for Delivery. *Bioconjug. Chem.* **23**, 1091-1104 (2012).
279. J. H. Monserud, D. K. Schwartz, Effects of Molecular Size and Surface Hydrophobicity on Oligonucleotide Interfacial Dynamics. *Biomacromolecules* **13**, 4002-4011 (2012).
280. R. M. Elder, A. Jayaraman, Structure and Thermodynamics of ssDNA Oligomers Near Hydrophobic and Hydrophilic Surfaces. *Soft Matter* **9**, 11521 (2013).
281. H. G. Hansma, D. E. Laney, DNA Binding to Mica Correlates with Cationic Radius: Assay by Atomic Force Microscopy. *Biophysical J.* **70**, 1933-1939 (1996).
282. Y. Kan, Q. Tan, G. Wu, W. Si, Y. Chen, Study of DNA Adsorption on Mica Surfaces Using a Surface Force Apparatus. *Sci. Rep.* **5**, 1-6 (2015).
283. J. Adamcik, D. V. Klinov, G. Witz, S. K. Sekatskii, G. Dietler, Observation of Single-stranded DNA on Mica and Highly Oriented Pyrolytic Graphite by Atomic Force Microscopy. *FEBS Letters* **580**, 5671–5675 (2006).
284. A. Michanek *et al.*, RNA and DNA Association to Zwitterionic and Charged Monolayers at the Air-liquid Interface. *Langmuir* **28**, 9621-9633 (2012).

Chapitre 2

Technique expérimentale principale utilisée

L'appareil de mesure de forces de surface (SFA)

2.1 L'appareil de mesure de forces de surface (SFA)

2.1.1 Considérations générales

Initialement développé dans les années 1970 par D. Tabor, R.H.S. Winterton et J.N. Israelachvili, l'appareil de mesure de forces de surface (*Surface Forces Apparatus, SFA*) permet la mesure des forces s'exerçant entre deux surfaces en fonction de leur distance de séparation (**Figure 2.1**).¹⁻³ Le SFA est la seule technique permettant la mesure simultanée de la force et de la distance absolue de séparation (D) entre deux surfaces.⁴ Cette technique permet également la visualisation de la géométrie locale des deux surfaces en interaction. Les forces d'interactions normales, F_N , et latérales F_S , s'exerçant entre deux surfaces peuvent être mesurées dans un milieu donné (liquide ou gazeux). Cet appareil permet également de déterminer l'indice de réfraction et l'aire de contact entre deux surfaces.^{5,6}

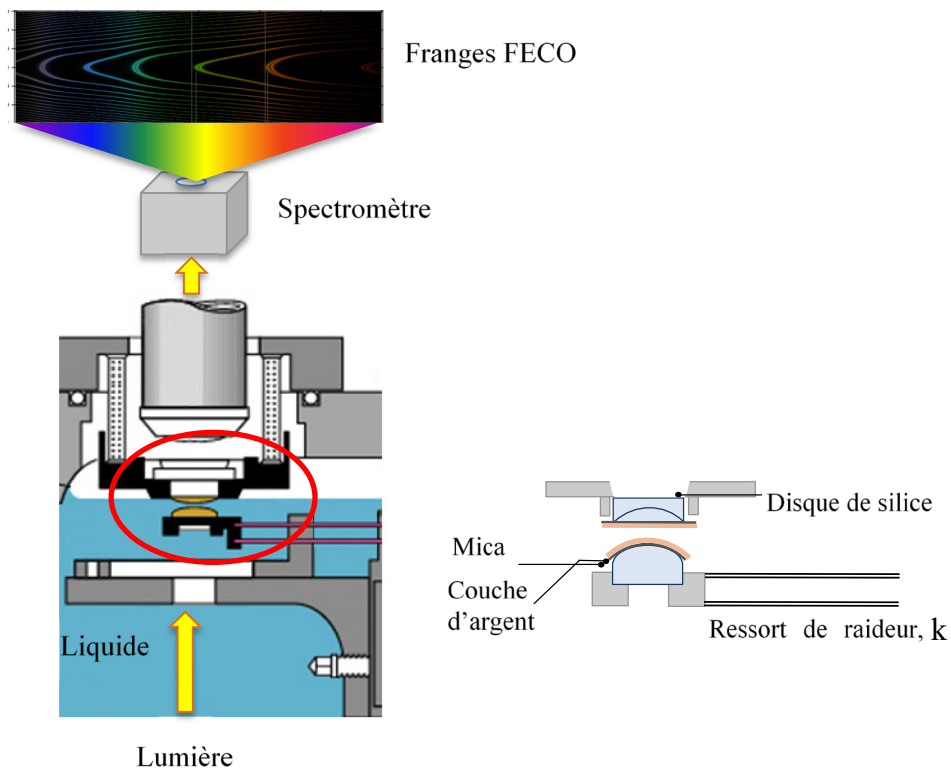


Figure 2.1 : Représentation schématique de l'appareil de mesure de forces de surface.

La mesure de la distance de séparation avec le SFA utilise une technique d'interférométrie optique (décrite à la **section 2.1.2**) et nécessite l'emploi d'un substrat fin, lisse, malléable et transparent.^{4,7,8} Sous fin feuillet (1-3 μm), le mica est le substrat le plus

communément employé. Les systèmes d'investigations (biomolécules⁹, polymères^{10, 11} ou SAMs¹²) peuvent être immobilisés sur le mica ou solubilisés dans un liquide et étudiés entre deux surfaces de mica. Ces substrats de mica sont supportés par des disques de silice cylindriques (de rayon, $R = 2$ cm) montés en géométrie cylindres croisés. La géométrie cylindres croisés est équivalente à une géométrie sphère sur une surface plane (**Figure 2.2**). L'approximation de Derjaguin¹³ relie la force $F_N(D)$ à l'énergie d'interaction par unité de surface entre deux surfaces planes $E(D)$:

$$\frac{F_N(D)}{2\pi R} = E(D) \quad (2.1)$$

Cette approximation est correcte pour $D \lll R$. Cette condition est généralement respectée lors des expériences SFA où les distances investiguées sont comprises entre 1.10^{-9} et 1.10^{-5} m et le rayon de courbure des disques entre 1 et 2 cm.

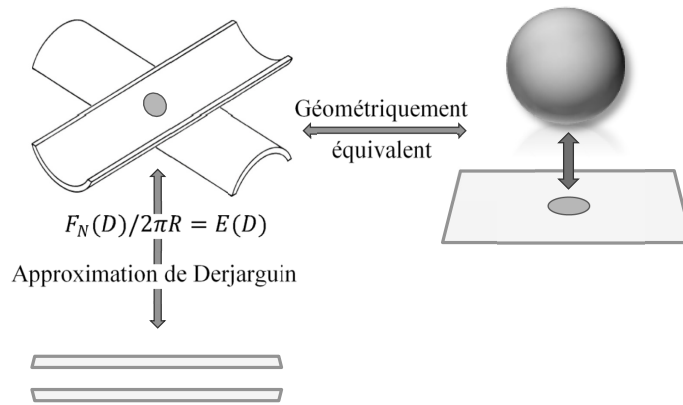


Figure 2.2: Géométrie cylindres croisés et équivalence géométrique et mathématique.

La distance de séparation entre les deux surfaces peut être contrôlée dans un intervalle allant de quelques millimètres jusqu'au contact moléculaire. La distance et la vitesse de déplacement peuvent être variées à partir de divers contrôleurs permettant d'ajuster précisément la distance de séparation (**Table 2.1**). Pour contrôler la distance de séparation, une seule des deux surfaces (le plus souvent celle du bas) est déplacée. La surface se déplaçant est fixée en porte à faux sur un ressort plat à la constante de raideur k (**Figure 2.1**).

Table 2.1 : Contrôleurs de distance du SFA 2000 et ses spécifications (Traduit à partir de la référence 4).

Niveau de contrôle	Type de contrôle	Déplacement des surfaces	Précision de la position (Å)	Intervalle total de déplacement (µm)
Grossier	Micromètre différentiel	Inférieur	2000	2000
Moyen	Micromètre différentiel	Inférieur	500	200
Fin	Ressort différentiel	Inférieur	2	10
Extra-fin	Tube Piézoélectrique	Supérieur	<1	1

2.1.2 Mesure de la distance de séparation

La distance de séparation peut être mesurée quantitativement avec une précision de $\pm 2 \text{ \AA}$ à l'aide d'une technique d'interférométrie optique basée sur l'analyse des franges d'ordre chromatique égal (*Fringes of Equal Chromatic Order*, FECO).^{5, 6, 14} De la lumière blanche est envoyée perpendiculairement aux deux surfaces de mica argenté sur leur face arrière permettant l'obtention de réflexions multiples du faisceau lumineux transmis qui est ensuite collimaté sur la fente d'entrée d'un spectromètre à réseau (**Figure 2.1**).^{5, 6, 14} Ce faisceau lumineux peut être diffracté par le réseau d'un spectromètre et le patron des franges d'interférence peut être observé directement au travers d'un oculaire positionné en sortie du spectromètre ou via une caméra.¹⁵ La forme courbée des franges FECO est directement liée à la géométrie de l'aire de contact.^{16, 17} Lorsque les surfaces sont en contact physique, elles apparaissent aplaties, ce qui provient de la déformation élastique du substrat (**Figure 2.3**). En revanche, hors contact, les franges sont alors arrondies (**Figure 2.3**). Les expériences SFA présentées dans ce manuscrit prennent comme référence $D = 0$ le contact adhésif entre les deux substrats de mica nu dans l'air. Cette distance $D = 0$ peut être mesurée à partir d'une frange de référence d'ordre n et de longueur d'onde λ_n^0 (**Figure 2.3**). L'adsorption de molécules sur le mica engendre une augmentation de la distance de séparation et de λ_n^0 . La distance de séparation entre deux surfaces de mica d'épaisseur identique peut être calculée à partir de l'équation suivante ^{5, 6}:

$$\tan\left(\frac{2\pi D}{\lambda_n^D}\right) = \frac{2\bar{n} \sin\left[\frac{1 - \lambda_n^0/\lambda_n^D}{1 - \lambda_n^0/\lambda_{n-1}^0} \pi\right]}{(1 + \bar{n}^2) \cos\left[\frac{1 - \lambda_n^0/\lambda_n^D}{1 - \lambda_n^0/\lambda_{n-1}^D} \pi\right] \pm (\bar{n}^2 - 1)} \quad (2.2)$$

où le signe « + » fait référence aux franges impaires (d'ordre n) et le signe « - » aux franges paires (d'ordre n-1). Avec $\bar{n} = \frac{n_{mica}}{n_{milieu}}$ où n_{mica} correspond à l'indice de réfraction du mica et n_{milieu} l'indice de réfraction du milieu entre les deux surfaces de mica à la longueur d'onde λ_n^D . λ_n^0 et λ_{n-1}^0 correspondent aux longueurs d'onde des franges FECO paires et impaires respectivement lorsque les surfaces sont en contact adhésif mica/mica dans l'air. λ_n^D et λ_{n-1}^D correspondent aux longueurs d'ondes des franges FECO paires et impaires lorsque les surfaces sont séparées d'une distance D.

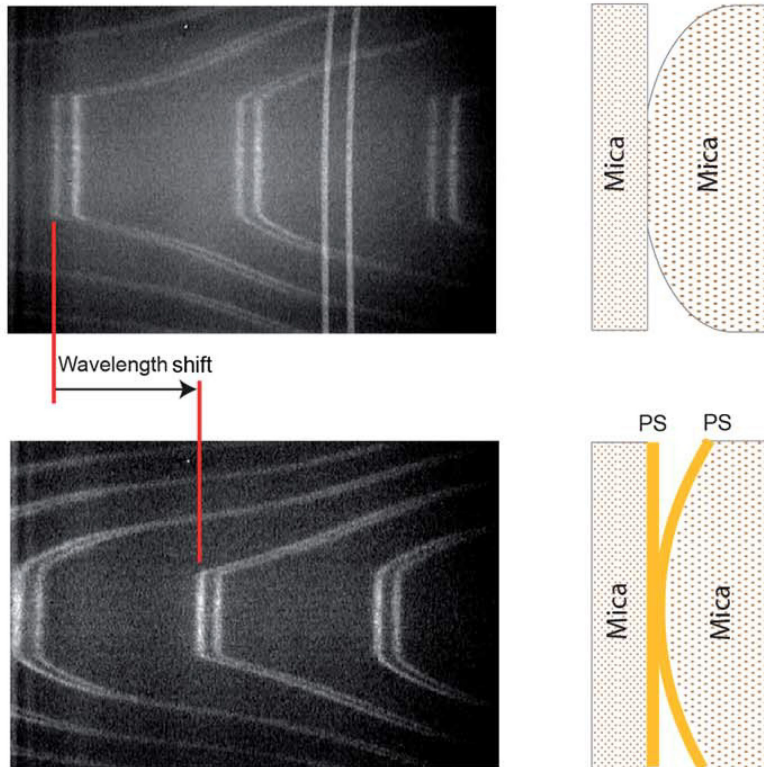


Figure 2.3 : Principe de la mesure de distance à l'aide des franges FECO. Le déplacement de la longueur d'onde permet de déterminer la distance de séparation à partir de l'Equation 2.2. (Figure reproduite à partir de la référence 16 avec la permission de Royal Society of Chemistry Press.)

2.1.3 Mesure de la force normale

La mesure de la force normale s'exerçant entre les deux surfaces, se fait à partir de la déflexion du ressort (ΔD) supportant la surface inférieure à l'aide de la loi de Hooke.

$$\Delta F_N(D) = k \Delta D \text{ et } (\Delta D = D_{\text{imposé}} - D_{\text{réelle}}) \quad (2.3)$$

Pour de grandes distances de séparation, la force d'interaction est nulle ($F_N = 0$) tout comme la déflexion du ressort, $\Delta D = 0$. Dans ce cas, le déplacement imposé à la surface inférieure ($D_{\text{imposé}}$) est égal à la distance réelle de séparation ($D_{\text{réelle}}$) mesurée à partir des franges FECO. En revanche, quand une force (attractive ou répulsive) s'exerce entre les deux surfaces, la déflexion du ressort n'est plus nulle et $D_{\text{imposé}} \neq D_{\text{réelle}}$, tel que représenté à la **Figure 2.4**. $D_{\text{réelle}}$ peut être calculée en tout temps à l'aide des franges FECO. $D_{\text{imposé}}$ est obtenue à partir d'un encodeur comptabilisant le nombre de tours de la vis micrométrique assurant le déplacement de la surface inférieure. Une équation linéaire permet de relier le nombre de tours d'encodeur à $D_{\text{imposé}}$. La précision sur la mesure de forces F_N dépend de la constante de raideur k du ressort plat ainsi que de la résolution de la mesure de D .

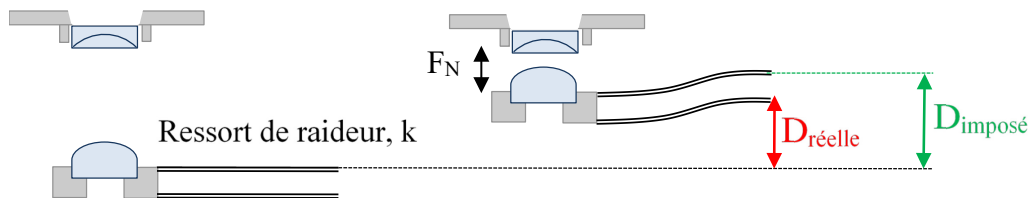


Figure 2.4 : Principe de la mesure de la force normale (F_N , déterminée à partir de l'Équation 2.3). Dans cette représentation une force répulsive entre les deux surfaces est illustrée.

2.1.4 Profil de forces

La mesure simultanée de la force et de la distance de séparation permet d'établir le profil force-distance d'un système sur une gamme de distance souhaitée. Un profil caractéristique existe pour plusieurs types d'interactions (hydrophobes, van der Waals, électrostatiques),¹⁸ tels que schématisés à la **Figure 2.5**. La grande majorité des systèmes (en particulier ceux composés de biomolécules) ne présentent pas un seul type d'interaction mais plusieurs natures d'interactions peuvent contribuer au profil global de forces, compliquant grandement l'interprétation. Certaines natures d'interactions peuvent être

modélisées à l'aide d'équations connues.¹⁸ Cependant, la majorité de ces modélisations supposent un système symétrique, c'est-à-dire deux surfaces de mica supportant les mêmes entités chimiques, dans les mêmes proportions et sous la même conformation. L'étude de systèmes asymétriques est possible à l'aide d'un SFA mais l'interprétation des profils de forces résultant peut s'avérer plus complexe.

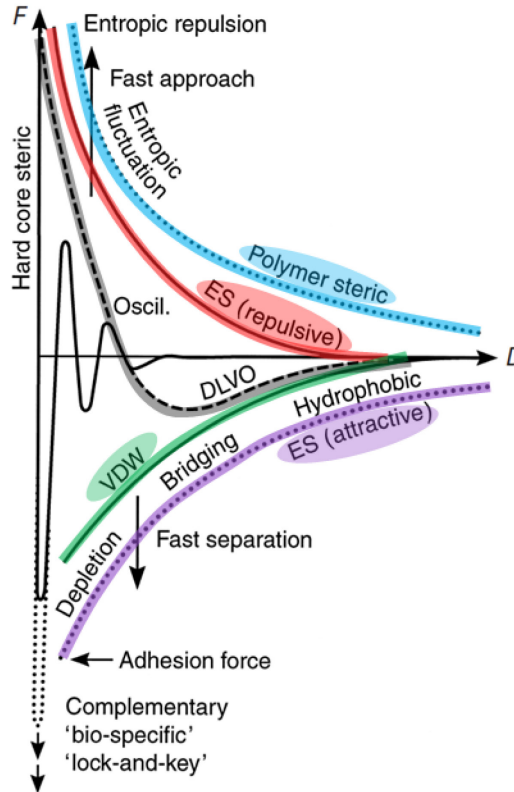


Figure 2.5 : Différentes natures d'interactions et leurs profils force-distance caractéristiques. (Figure reproduite à partir de la référence 18 avec la permission de Cambridge University Press).

Avec le SFA, la force F_N en fonction de D est généralement rapportée sous la forme $F_N(D)/R$ ou $F_N(D)/2\pi R = E(D)$ où R correspond au rayon de courbure moyen des disques de silice (le plus souvent de 1 ou 2 cm). Cette expression normalisée de la force est comparable à l'énergie d'interaction entre deux surfaces planes et permet de comparer différents systèmes analysés à partir de diverses techniques indépendamment de la géométrie utilisée.

2.1.5 Mesure de la force latérale

Le SFA peut également être utilisé pour mesurer la force latérale (ou force de frottement) s'exerçant entre deux surfaces sous différentes charges appliquées.^{4, 19} Pour cela, la surface supérieure est montée sur deux ressorts plats verticaux couplés à des jauges de contrainte de sensibilité variable. Le frottement est généré en déplaçant horizontalement (et à vitesse contrôlée) le dispositif supérieur à l'aide d'un moteur ou de dispositifs à base de céramiques piézoélectriques. La déflexion des ressorts est transmise aux jauges de contrainte et est reliée à la force de frottement s'exerçant entre les deux substrats (**Figure 2.6**). Le voltage transmis par les jauges de contrainte (V) est fonction de la déflexion des ressorts et permet de déterminer les forces de frottement à l'aide de d'une simple relation linéaire ($F_s = aV$). Le facteur a se détermine expérimentalement en exerçant des forces de valeurs connues sur les jauges à l'aide de poids de masse variable tout en enregistrant le voltage transmis correspondant à chaque poids. La sensibilité de la mesure de la force de frottement est dépendante de la constante de raideur des ressorts plats verticaux et de la sensibilité des jauges de contrainte.

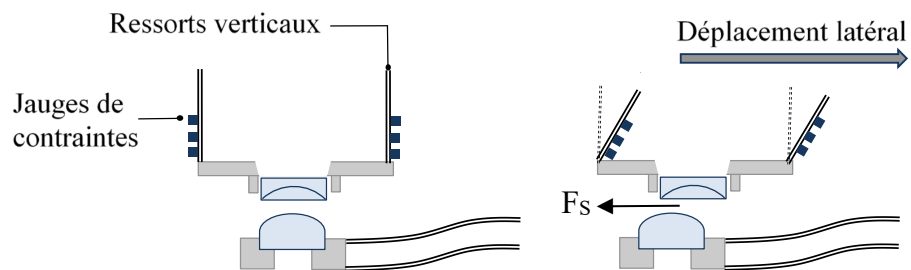


Figure 2.6: Principe de la mesure de la force latérale (de frottement), F_s . F_s est déterminée à partir de $F_s = aV$ avec V , le voltage des jauges de contrainte et a , un facteur déterminé par la calibration expérimentale.

2.1.6 Analyse des franges FECO

Comme vu précédemment, la forme des franges renseigne sur la géométrie de contact. En effet des franges aplaties traduisent des surfaces en contact physique se déformant élastiquement. La mesure de la hauteur du plat permet de connaître le diamètre de l'aire de contact avec une précision de 10% ($\approx 1 \mu\text{m}$).

L'interprétation de la forme des franges apporte également des informations sur la topographie de l'aire de contact.¹⁴ Cette topographie corrélée aux mesures de forces

normales, latérales et de distance de séparation a permis de mettre en évidence un grand nombre de phénomènes (**Figure 2.7**) tels la fusion lipidique de bicouches supportées²⁰ et l'agrégation de molécules organiques dans l'aire de contact après cisaillement de deux surfaces de mica.²¹

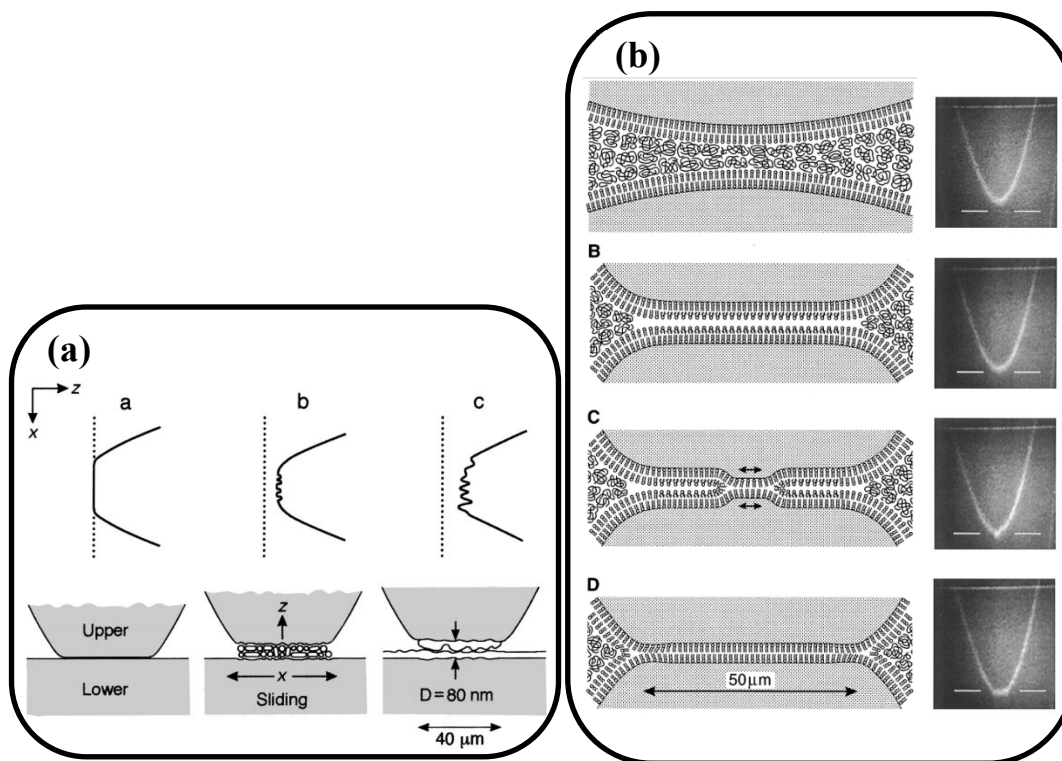


Figure 2.7 : Représentation schématique de la corrélation entre la forme des franges FECO observées SFA et la géométrie ou la topographie du contact. (Figures reproduites à partir des références 21 avec la permission d'Elsevier (a) et 20, Copyright © 1996, American Chemical Society (b)).

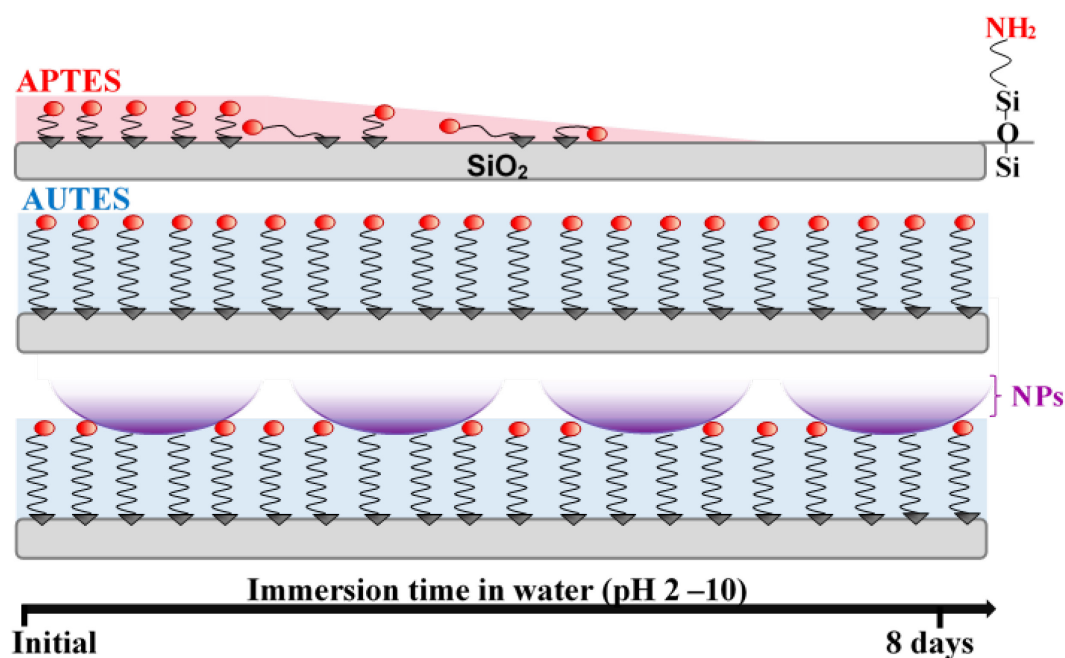
2.2 Références

1. D. Tabor, R. H. S. Winterton, The Direct Measurement of Normal and Retarded van der Waals Forces. *Proc. R. Soc. A* **312**, 435-450 (1969).
2. J. N. Israelachvili, D. Tabor, The Measurement of Van Der Waals Dispersion Forces in the Range 1.5 to 130 nm. *Proc. R. Soc. A* **331**, 19-38 (1972).
3. J. N. Israelachvili, G. E. Adams, Measurement of Forces Between Two Mica Surfaces in Aqueous Electrolyte Solutions in the Range 0–100 nm. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **74**, 975-1001 (1978).
4. J. Israelachvili *et al.*, Recent Advances in the Surface Forces Apparatus (SFA) Technique. *Rep. Prog. Phys.* **73**, 036601 (036616pp) (2010).

5. R. Tadmor, N. Chen, J. N. Israelachvili, Thickness and Refractive Index Measurements Using Multiple Beam Interference Fringes (FECO). *J. Colloid Interface Sci.* **264**, 548-553 (2003).
6. J. N. Israelachvili, Thin Film Studies Using Multiple-beam Interferometry. *J. Colloid Interface Sci.* **44**, 259-272 (1973).
7. J. N. Israelachvili, Intermolecular and Surface Forces. *Academic Press Third Edition*, (2011).
8. J. N. Israelachvili, P. M. McGuiggan, Adhesion and Short-range Forces Between Surfaces. Part I: New Apparatus for Surface Force Measurements. *J. Mater. Res.* **5**, 2223-2231 (2011).
9. E. Perez, F. Li, D. Tareste, F. Pincet, The Surface Force Apparatus to Reveal the Energetics of Biomolecules Assembly. Application to DNA Bases Pairing and SNARE Fusion Proteins Folding. *Cell. Mol. Bioeng.* **1**, 240-246 (2008).
10. S. H. Donaldson, Jr. *et al.*, Asymmetric Electrostatic and Hydrophobic-Hydrophilic Interaction Forces Between Mica Surfaces and Silicone Polymer Thin Films. *ACS Nano* **7**, 10094-10104 (2013).
11. U. Raviv *et al.*, Normal and Frictional Forces Between Surfaces Bearing Polyelectrolyte Brushes. *Langmuir* **24**, 8678-8687 (2008).
12. M. Valtiner, X. Banquy, K. Kristiansen, G. W. Greene, J. N. Israelachvili, The Electrochemical Surface Forces Apparatus: the Effect of Surface Roughness, Electrostatic Surface Potentials, and Anodic Oxide Growth on Interaction Forces, and Friction Between Dissimilar Surfaces in Aqueous Solutions. *Langmuir* **28**, 13080-13093 (2012).
13. B. Derjaguin, Untersuchungen über die Reibung und Adhäsion, IV. *Kolloid-Zeitschrift* **69**, 155-164 (1934).
14. M. Heuberger, G. Luengo, J. Israelachvili, Topographic Information from Multiple Beam Interferometry in the Surface Forces Apparatus. *Langmuir* **13**, 3839-3848 (1997).
15. T. Grünewald, C. A. Helm, Computer-Controlled Experiments in the Surface Forces Apparatus with a CCD-Spectrograph. *Langmuir* **12**, 3885-3890 (1996).
16. A. Faghihnejad, H. Zeng, Hydrophobic Interactions Between Polymer Surfaces: Using Polystyrene as a Model System. *Soft Matter* **8**, 2746-2759 (2012).
17. J. Israelachvili *et al.*, Recent Advances in the Surface Forces Apparatus (SFA) Technique. *Rep. Prog. Phys* **73**, 1-16 (2010).
18. D. Leckband, J. Israelachvili, Intermolecular Forces in Biology. *Q. Rev. Biophys.* **34**, 105-267 (2001).
19. J. N. Israelachvili, P. M. McGuiggan, A. M. Homola, Dynamic Properties of Molecularly Thin Liquid Films. *Science* **240**, 189-191 (1988).
20. T. Kuhl *et al.*, Direct Measurement of Polyethylene Glycol Induced Depletion Attraction between Lipid Bilayers. *Langmuir* **12**, 3003-3014 (1996).
21. Y. Golan, C. Drummond, J. Israelachvili, R. Tenne, In Situ Imaging of Shearing Contacts in the Surface Forces Apparatus. *Wear* **245**, 190-195 (2000).

Chapitre 3

Amino-functionalized Monolayers Covalently Grafted to Silica-Based Substrates as a Robust Primer Anchorage in Aqueous Media



3.1 Contexte et résumé

L'amino-fonctionnalisation de surface via l'emploi de monocouches auto-assemblées rencontre un intérêt certain pour l'ancrage de diverses molécules, macromolécules, systèmes colloïdaux et cellules mais aussi pour le contrôle des interactions avec le milieu environnant. Cependant, pour être employées efficacement ces monocouches doivent pouvoir résister au dégreffage sous divers milieux aqueux (force ionique, pH). Le manque de stabilité en milieu aqueux de ces monocouches en particulier sur les substrats de silicates (silice et mica) limite grandement leurs perspectives d'utilisation pour la fonctionnalisation de surface de biomatériaux.

L'étude présentée au chapitre suivant vise à caractériser des SAMs amino-fonctionnalisées greffées de manière covalente sur des substrats de silicates via un lien $\text{Si}_{\text{silane}}\text{-O-Si}_{\text{surface}}$. Par la suite la stabilité hydrolytique de ces monocouches a été étudiée. Deux aminoalkylsilanes ont été employés pour la préparation des SAMs investiguées, l'un possédant une chaîne alkyle de 3 carbones (l'aminopropyltriéthoxysilane, APTES) et l'autre de 11 (l'aminoundécyltriéthoxysilane, AUTES).

Des SAMs homogènes et de faible rugosité peuvent être préparées avec les deux aminoalkylsilanes par phase vapeur, mais aussi par phase liquide. Les SAMs d'AUTES ont pu être préparées simplement et rapidement en phase liquide tout en ne consommant que peu d'aminoalkylsilane par rapport à la phase vapeur. De plus, la densité de greffage en aminoalkylsilane a pu être modulée via la concentration de la solution d'immersion lors du greffage. L'adsorption physique de particules chargées négativement sur les SAMs d'AUTES a permis de mettre en évidence la charge positive de ces couches même à des pH élevés (pH 13).

La stabilité des monocouches en milieu aqueux a ensuite été étudiée à l'aide de la variation de l'angle de contact. L'extrême stabilité hydrolytique du lien $\text{Si}_{\text{silane}}\text{-O-Si}_{\text{surface}}$ rapportée pour la monocouche d'AUTES permet une immersion prolongée en milieu aqueux et sur une large gamme de pH, contrairement à celle d'APTES qui se dégreffe rapidement (chute de l'angle de contact). Les paramètres ayant été identifiés comme impactant cette stabilité sont l'organisation de la monocouche, la densité de greffage et la longueur de la chaîne carbonée de l'aminoalkylsilane.

Chapitre 3

La réactivité chimique de ces monocouches amino-fonctionnalisées a par la suite été confirmée par l'attachement covalent de nanoparticules polymériques. L'immobilisation des nanoparticules s'est avérée dépendante de la résistance du lien Si-O-Si à la surface. Ainsi, les nanoparticules chimisorbées sur les SAMs d'AUTES peuvent également résister à une immersion prolongée en milieu aqueux.

Les monocouches d'AUTES présentées dans cette étude possèdent la meilleure stabilité hydrolytique rapportée jusque à présent.

3.2 Abstract

Controlling surface coverage and stability of supported aminoalkylsilane monolayers on silica-based substrates still remains a challenge for the development of biosensors and nanomaterials. We have developed protocols using simple surface chemistry and self-assembly from solution without stringent deposition conditions to covalently attach monolayers of 11-aminoundecyltriethoxysilane (AUTES) onto mica and silica substrates. The resulting self-assembled monolayers (SAMs) exhibited excellent hydrolytic stability. The long alkyl chain together with the large grafting density and homogeneity enhanced the monolayer stability by preventing the $\text{Si}_{\text{silane}}\text{-O-Si}_{\text{surface}}$ bonds from hydrolysis over a wide range of pH values (2 to 10) for long time periods (up to 8 days). The control over the surface density of amino groups was achieved and the reactivity of the amino SAMs was confirmed by covalently attaching carboxyl-functionalized nanoparticles on the SAMs. The immobilized nanoparticles exhibited the same hydrolytic stability as that of the SAMs. The AUTES SAMs prepared in this study exhibited the best hydrolytic stability of similar systems reported so far.

Keywords: *monolayer, silane, hydrolytic stability, grafting density, Surface coverage*

3.3 Introduction

Alkylsilane self-assembled monolayers (SAMs) on silica-based substrates have useful applications in materials science and engineering¹ for sensing,^{2, 3} surface coating,⁴ medical devices,⁵ micro- and nano-fabrication technologies.⁶ More specifically, aminoalkylsilane monolayers are suitable surfaces for immobilizing chemical and biological entities such as proteins,⁷ oligonucleotides,⁸ polymers,⁹ nanoparticles (NPs),^{10, 11} cells¹² through chemical or physical attachment.¹³⁻¹⁷ Surface density of amino groups is an important parameter as it determines the quantity, conformation and physico-chemical properties of immobilized systems. For most applications, such immobilization must be robust enough to resist cleavage or detachment under variable environmental conditions. Alkylsilanes, including aminoalkylsilanes can be covalently attached on silica-based substrates via $\text{Si}_{\text{silane}}\text{-O-Si}_{\text{surface}}$ bonds using vapor or liquid phase.¹⁸ The most common aminoalkylsilane SAMs are made of short alkyl chain such as 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES),^{7, 18-22} 3-aminopropyldimethylethoxysilane (APDMES),¹⁸⁻²⁰ and 3-aminopropyldiisopropylethoxysilane (APDIPES).¹⁹ The resulting SAMs usually exhibit good thermal stability in air²¹ and organic solvent.^{21, 22} Unfortunately, the $\text{Si}_{\text{silane}}\text{-O-Si}_{\text{surface}}$ bonds are very susceptible to hydrolysis and therefore, the SAMs can detach from the surface at high pH and with added salt.^{20, 23-26} In addition, the terminal amino groups can condensate on the surface and catalyze the hydrolysis of the $\text{Si}_{\text{silane}}\text{-O-Si}_{\text{surface}}$ bonds, making the hydrolytic stability of aminoalkylsilanes SAMs more challenging than alkylsilane SAMs.^{20, 23, 27} However, it has been shown that a pH lower than the pK_a value of the amino groups disfavors the amino catalyzed hydrolysis of the $\text{Si}_{\text{silane}}\text{-O-Si}_{\text{surface}}$ bond.²⁷ The sensitivity of $\text{Si}_{\text{silane}}\text{-O-Si}_{\text{surface}}$ bond to hydrolysis has limited the use of aminoalkylsilane-based SAMs in aqueous media.^{20, 23, 27}

The nature of silane functionality also influences the stability of the SAMs.²³ The trimethoxy- and triethoxy-silanes provide multiple points of attachment so that they can react with the surface as well as with adjacent aminoalkylsilanes forming a reticulated SAM as illustrated in **Figure 3.1**. This reticulation is known to enhance the stability of SAMs but can also lead to buckling and to the formation of aggregates and/or multilayers.²³ Heterogeneous layers are particularly favored with trimethoxysilanes whose reticulation is

fast whereas more homogeneous SAMs are usually obtained with triethoxysilanes, which slowly reticulate.

Changing the surface chemistry can improve the robustness of supported SAMs on silica-based surfaces. Different chemical bonds have been used to attach SAMs on silica surfaces including (i) $\text{Si}_{\text{surface}}\text{-C}_{\text{adsorbate}}$ (on oxide-free silicon substrates) using 10-carboxydecyl,²⁸ 1-octadecene²⁹ or 1-octadecyne,²⁹ (ii) $\text{Si}_{\text{surface}}\text{-O-C}_{\text{adsorbate}}$ using aminohexanol,²⁸ 1-octadecene²⁹ or 1-octadecyne²⁹ and (iii) $\text{Si}_{\text{surface}}\text{-O-P}_{\text{adsorbate}}$ using 11-(2-bromoisobutyrate)-undecyl-1-phosphonic acid.³⁰ Most of them have shown enhanced stability compared to SAMs attached via $\text{Si}_{\text{silane}}\text{-O-Si}_{\text{surface}}$ bonds. However, these studies did not investigate systematically amino-functionalized SAMs, whose amino groups can catalyze the hydrolysis of the $\text{Si}_{\text{silane}}\text{-O-Si}_{\text{surface}}$ bond as previously mentioned. Increasing the length of the alkyl chain to improve stability of alkylsilane SAMs is less constraining than changing the surface chemistry and was shown to improve the stability by providing a hydrophobic spacer, which prevents water penetration into the SAMs and subsequent hydrolysis of the $\text{Si}_{\text{silane}}\text{-O-Si}_{\text{surface}}$ bond.^{21, 25, 26} In addition, long alkyl chains prevent the condensation of the amino groups on the surface and promote well-packed, homogeneous and smooth SAMs.^{25, 26, 31} Long aminoalkylsilanes such as 11-aminoundecyltriethoxysilane (AUTES) and 11-aminoundecyltrimethoxysilane (AUTMS) have indeed been studied to functionalize substrates for developing biosensors²⁶ and microelectromechanical systems (MEMS).³² However, the experimental conditions used for these studies gave rise to multilayers, which were investigated in restricted environmental conditions, i.e., in air or water for relatively short time periods (2 hours). Given the importance in improving the stability of SAMs on silica-based substrates, a systematic evaluation of the hydrolytic stability is very much in need by controlling the grafting density, homogeneity and environmental conditions to provide reliable and reproducible devices in various applications.

We chose to use SAMs made of AUTES to study systematically the hydrolytic stability, reactivity and grafting density on silica-based substrates over extended time periods (up to 8 days) under various conditions. In addition, the reactivity of the primary amine at the outermost layer of the SAMs was investigated by attaching carboxyl-

functionalized NPs. The hydrolytic stability of these immobilized systems was also investigated under the same conditions.

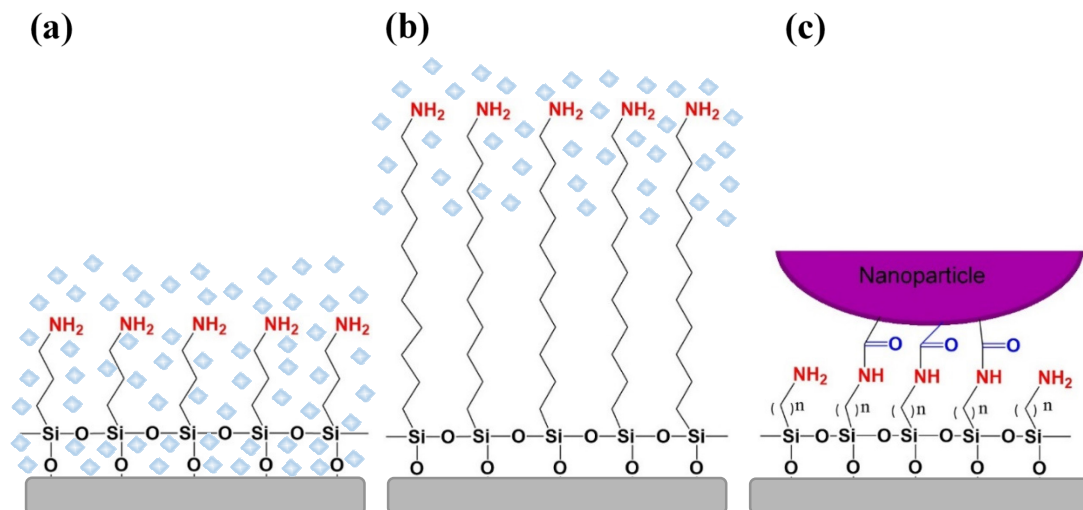


Figure 3.1: Schematic representation of (a) APTES SAMs immersed in water (b) AUTES SAMs immersed in water and (c) Carboxyl-functionalized NPs covalently attached to amino SAMs, with $n=3$ or 11 . The longer alkyl chain of AUTES compared to APTES acts as a hydrophobic barrier protecting the Si_{silane}-O-Si_{surface} bond from hydrolysis.

3.4 Materials and Methods

Ruby mica sheets were purchased from S & J Trading Inc. (Glen Oaks, NY, USA). Plasma Prep II from SPI Supplies was used to activate freshly cleaved mica surfaces using argon (5.0 grade). Milli-Q quality water was obtained from a Millipore Gradient A10 purification system (resistance 18.2 M Ω ·cm, TOC < 3 ppb). Silicon wafers were obtained from University Wafer Co (100 mm diameter, boron-doped, (100) orientation, one side polished). Styrene, divinylbenzene (DVB), acrylic acid (AA), potassium persulfate (KPS), 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), hydrochloric acid, sodium hydroxide, 4-nitrobenzaldehyde (4-NBA), Trizma base, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), citric acid, sodium bicarbonate, dodecyltrichlorosilane and sulfate modified polystyrene fluorescent orange nanoparticles (sulfate-modified polystyrene NPs of 100 nm diameter) were purchased from Sigma-Aldrich. 11-aminoundecyltriethoxysilane (AUTES) was

purchased from Gelest Inc. Styrene, anhydrous DVB and AA were distilled under reduced pressure. KPS was used without further purification.

3.4.1 Carboxyl-functionalized nanoparticle synthesis.

Carboxyl-functionalized NPs are composed of polystyrene core and poly (acrylic acid) shell. The NPs were synthesized by surfactant-free emulsion polymerization with KPS as the initiator.³³ 3.25 g of styrene, 0.16 g of DVB and 0.45 g of AA were dissolved in 200 mL of Milli-Q water in a 500 mL three-neck flask equipped with a reflux condenser. The system was degassed with nitrogen for 30 min while being stirred at a speed of 350 rpm. 1.35 g of the initiator were then added with 20 mL of water and the flask was heated to 70 °C in an oil bath. After 2 hours of heating, 6.31 g of AA in 30 mL of water were added. The temperature and the stirring were maintained for 22 h. The water-particle mixture was centrifuged and was re-dispersed in Milli-Q water. The centrifugation procedure was repeated three times followed by dialysis against distilled water for one week at room temperature in a cellulose sack (molecular weight cut-off at 3200 Da) from Fisher Scientific.

3.4.2 Self-assembled monolayers preparation.

All surface manipulations were performed in a clean laminar airflow cabinet in order to prevent dust deposition on the surfaces. All glassware was carefully cleaned in a bath of KOH-saturated isopropyl alcohol and then rinsed intensively with Milli-Q water and absolute ethanol.

Silicon wafers were cut into 1 cm × 1 cm pieces using a diamond pencil. Silanol groups were generated using a Piranha solution ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2 = 70/30$ v/v) for 45 min at room temperature. (Caution: Piranha solution is extremely corrosive and should be used with absolute carefulness!). The substrates were then removed from the Piranha solution and washed with copious amounts of Milli-Q water, absolute ethanol, and finally dried thoroughly under a gentle flow of nitrogen and immediately used for grafting procedures.

Water/argon plasma activation was used to generate silanol groups on the mica surfaces as previously reported.²⁵ Briefly, freshly cleaved mica surfaces were placed in a plasma chamber under a vacuum pressure of 0.5 mTorr. Argon and water vapors were then introduced at partial pressures of 80 mTorr and 300 mTorr respectively. Plasma activation was performed for 5 min at 40 W, then mica surfaces were left in the plasma chamber under vacuum (0.5 mTorr) for 5 more min. The mica surfaces were removed from the chamber and immediately used for grafting procedures.

3.4.2.1 Aminoalkylsilane grafting via vapor phase.

Immediately after their activation, mica and silica substrates were transferred into an evaporation chamber under a vacuum of 1.6 Torr. The evaporation chamber was connected via a valve to a small glass reservoir containing ca 0.6 mL of APTES or AUTES. After purging the evaporation chamber for 15 min, the valve was opened allowing aminoalkylsilane vapors to react with activated surfaces. During this step, vacuum was maintained in order to ensure a constant flux of vapor in the chamber and to avoid condensation of the aminoalkylsilane on the surfaces. Evaporation was allowed to proceed for 4 h. The valve was then closed and remnant vapor was pumped out for 2 h. The aminoalkylsilane grafting was completed by annealing the substrates for 45 min at 120 °C under atmospheric pressure.

3.4.2.2 Aminoalkylsilane grafting via self-adsorption from solution.

Immediately after their activation, mica and silica substrates were immersed in freshly prepared AUTES solutions (absolute ethanol) of different concentrations (0.125 - 1 mM) and for various immersion times (20 min - 6 hours). The resulting AUTES SAMs were thoroughly rinsed with absolute ethanol. The AUTES grafting was completed by annealing the substrates for 45 min at 120 °C under atmospheric pressure.

3.4.3 Nanoparticles deposition.

3.4.3.1 Carboxyl-functionalized nanoparticle deposition on amino-functionalized mica.

The AUTES SAMs used for carboxyl-functionalized NPs deposition were prepared with 1 mM AUTES solution and an immersion time of 20 min and for an immersion time of 20 min and APTES SAMs were obtained from vapor phase as previously described.

Carboxyl-functionalized NPs were self-assembled from a NPs aqueous dispersion (0.1%w/w) on the AUTES SAMs. Coupling agents (2 mM EDC and 5 mM NHS) were added to the NPs dispersion and stirred for 30 min. The supported AUTES SAMs were immersed in the NPs dispersion for at least 20 h. The resulting surfaces supporting NPs were thoroughly rinsed with Milli-Q water and dried under nitrogen.

Horizontal convective evaporation method (HCEM) was also used for the deposition of carboxyl-functionalized NPs on aminoalkylsilane SAMs, as previously done for non-charged polymer NPs.¹¹ NPs aqueous dispersions of concentrations of 0.07 and 0.2 % w/w were used for deposition on APTES and AUTES SAMs on mica, respectively. Coupling agents (2 mM EDC and 5 mM NHS) were added to the NPs dispersions and stirred for 30 min. Glass coverslips were cleaned in a Piranha solution ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2 = 70/30$ v/v) at 40 °C for 10 min and thoroughly rinsed with Milli-Q water and absolute ethanol, then dried under nitrogen. This clean glass coverslip applicator was placed over an amino-functionalized mica at an angle of 15°. The separation distance between the applicator and the functionalized mica substrate was kept constant during the deposition process (ca 100 μm). Prior to translation of the functionalized surface, a drop (50 μL) of the NPs dispersion was placed between the applicator and the surface. The deposition process was carried out on a vibration-isolated table in a closed box at room temperature and at a constant velocity of 15 $\mu\text{m}/\text{s}$ which corresponds to 10 min of deposition for a sample of 1 cm \times 1 cm.

3.4.3.2 Sulfate-modified polystyrene nanoparticle deposition on surface.

Sulfate-modified polystyrene NPs (100 nm diameter) were self-assembled from aqueous dispersions of various pH values (from 3 to 13) on AUTES, hydrophobically-modified silica and bare silica substrates.³⁴ AUTES SAMs were prepared on silica with 1 mM AUTES solution and an immersion time of 20 min. Supported dodecyltrichlorosilane SAMs (procedure described in supplementary material) were used as hydrophobically-modified silica substrates. Buffers with pH between 3 and 9 were prepared by mixing a solution of Trizma base (0.1 M)/EDTA (1 mM) to a solution of citric acid (0.1 M)/EDTA (1 mM). Buffers with pH between 9 and 13 were prepared by mixing a solution of Trizma base (0.1 M)/EDTA (1 mM) to a solution of sodium bicarbonate (0.05 M)/EDTA (1 mM). The substrates were immersed in 2 mL of buffer containing 2 μ L of 2.5% w/w of sulfate-modified polystyrene NPs for 4 h at room temperature. After immersion, the substrates were removed, gently rinsed with ethanol and dried with nitrogen.

3.4.4 Surface characterization.

Atomic Force Microscopy (AFM) imaging was carried out using a Multimode microscope equipped with a Nanoscope V extend controller (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) at room temperature and in ambient air. The surfaces were imaged in the tapping-mode using a silicon cantilevered tip from AppNano with a resonance frequency of 200-400 kHz and a spring constant between 25 and 75 N/m. AFM images were treated and analyzed using Nanoscope Analysis (version 1.4) software. The roughness of the surfaces was determined and averaged by extracting the root mean square (RMS) on a minimum of three different areas of various scan size. The surface density of immobilized NPs was determined using bearing analysis mode of the Nanoscope Analysis software and averaged on different surface areas of 30 μ m \times 30 μ m and 5 μ m \times 5 μ m scan size for chemically attached carboxyl-functionalized NPs and physisorbed sulfate-modified polystyrene NPs respectively. The average height of the immobilized NPs was measured by using a cross section analysis of the AFM images on three different areas. The height of immobilized NPs corresponds to the distance between the top of the NPs and the

substrate. All the AFM topography images reported in Section 3.5.1 are representative of the different analyzed areas for a given substrate.

Water contact angle measurements were performed on the different functionalized substrates using a FTA200 dynamic contact angle analyzer (First Ten Angstrom). All measurements were carried out in the static mode. A droplet of Milli-Q water (3-5 μL) was deposited on the surfaces and a clear picture of it was taken and used to determine the contact angle within an error of $\pm 0.6^\circ$. FTA32 Video software was used for data analyses. The contact angle was measured at least on three different locations on a given substrate and the average is reported in Section 3.3. The water contact angle measured on freshly Si-OH activated mica and silica substrates is 0° (**Table 3.1**). An increase in water contact angle is expected to occur after the immobilization of aminoalkylsilane owing to the hydrophobic character of the grafted alkyl chain.³¹ Change in water contact angle was used to assess the stability of supported amino-functionalized SAMs in water of different pH values (ranging from 2 to 10) and for various immersion times. The pH buffers were prepared from Trizma base buffer solution (0.1 M) in Milli-Q water and the pH was adjusted using HCl solution and measured with a Symphony SB20 pH meter with an Ag/AgCl electrode. Water contact angle was first measured on the freshly prepared aminoalkylsilane SAMs. Then, the supported SAMs were immersed in water at a given pH and for a given immersion time. The surfaces were taken out from water, thoroughly rinsed with Milli-Q water and dried under nitrogen then water contact angle was measured again. After the measurements, the surfaces were rinsed with Milli-Q water and immersed again in water at the same pH level but for a different immersion time.

The thickness of the aminoalkylsilane SAMs grafted on silica substrates was measured using an Ellipsometer M2000V from J. A. Woollam Co at a 75° angle of incidence at room temperature in air. Wavelengths ranging from 370 to 1000 nm were used. Three different locations were analyzed for each sample. The modeling and data fitting were performed using the WVASE32 software (J. A. Woollam Co, version 3.768). After the substrate activation, a silicon oxide layer thickness of 1.7 nm was measured prior to aminoalkylsilane grafting. This thickness was used when modeling the aminoalkylsilane layer with the Cauchy equation, which assumes transparent and homogeneous coverage.³⁵

The thickness of the SAMs grafted on mica was determined using the Surface Forces Apparatus (SFA), a technique well described in literature.³⁶ This technique allows force between two surfaces to be measured as a function of their separation distance. The distance is determined by an interferometry technique using Fringes of Equal Chromatic Orders (FECO) with subnanometric resolution.³⁷ Prior to mica functionalization, two back-silvered molecularly smooth mica surfaces are glued onto two cylindrically curved silica lenses. Mica surfaces are then brought into adhesive contact in air in order to determine the reference separation distance ($D = 0$). The SFA disks were dismantled under a laminar-flow cabinet for aminoalkylsilane deposition. Then, the two supported aminoalkylsilane SAMs were brought into adhesive contact in air and the separation distance at that position was reported as twice the SAMs thickness. This separation distance was determined at three different contact positions and the averaged value is reported.

Zeta potential measurements on flat bare mica and AUTES SAMs on mica substrates (prepared with 1 mM AUTES solution and an immersion time of 20 min) were measured with a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instrument Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) at 25 °C in the Surface Zeta Potential Cell with an oppositely charged tracer. The pH of the tracer solution was adjusted with HCl.

NH₂ surface density on amino SAMs was determined by covalently attaching the chromophoric 4-nitrobenzaldehyde (4-NBA) dye on the amino-functionalized mica substrates (3 cm × 3 cm) and measuring the absorbance (at 262 nm) of the degrafted dye using a Cary 500 UV-Vis-NIR spectrophotometer (Agilent Technologies) according to a method described elsewhere.³⁸ The amount of surface NH₂ groups was determined from the quantification of 4-NBA molecules released in acidic media assuming the complete release of one dye molecule upon reaction with one amino group. NH₂ surface density was determined from the average of three aliquots on two independently prepared surfaces. The standard deviation of the mean concentration obtained from three aliquots is 0.3% resulting in an error of less than 2% for the final NH₂ surface density.

Nanoparticles adhesion assay was used to assess surface charge of AUTES SAMs on silica as a function of pH. The positive surface charge of AUTES SAMs was

qualitatively assessed by self-adsorbing negatively charged sulfate-modified polystyrene NPs (see **Section 3.4.3**). The NPs surface density was then determined from the AFM images taken in air on three different areas of $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ scan size and averaged using bearing analysis mode of the Nanoscope Analysis software. For comparison, the NPs surface density was also determined on hydrophobically-modified silica (supported dodecyltrichlorosilane SAMs) and on bare silica substrates at pH 3 and 11.

3.5 Results and Discussion

3.5.1 Amino-functionalization of substrates.

As reference, APTES was deposited from vapor phase on mica surfaces, providing very smooth layers, free of aggregates, with 0.08 nm RMS surface roughness, comparable to the one observed on bare mica (0.07 nm RMS, **Figure 3.2a** and **b**). As expected, the water contact angle increases from 0° (on bare mica) to 48° (**Table 3.1**), suggesting the successful grafting of APTES. The value agrees well with a previous study¹⁹ reporting a value of 45° on APTES SAMs produced from vapor phase but with a larger surface roughness (0.152 nm RMS) compared to that measured in this study (**Figure 3.2b**).

The thickness of the APTES SAMs on silica and mica was 0.9 and 1.0 nm, respectively (**Table 3.1**). These values are close to the approximated fully extended contour length of an APTES molecule (ca 0.6 nm) suggesting the formation of well-packed and dense monolayers as illustrated in **Figure 3.1a**. The NH_2 surface density for APTES monolayers prepared from vapor phase was 11 molecules/ nm^2 (**Table 3.1**). In spite of the fact that these APTES SAMs are very smooth and dense, they are not hydrolytically stable and they will be used for a systematic comparison with the exceptional stability of AUTES SAMs.

Grafting of AUTES on mica from vapor phase was also possible and resulted in very smooth monolayers with 0.08 nm RMS surface roughness (**Figure 3.S.1a**). However, the water contact angle ($25^\circ \pm 2$, Data not shown) is much smaller than that on AUTES SAMs prepared from liquid phase ($76\text{-}78^\circ$, **Table 3.1**). Further investigation was carried

out on samples prepared from liquid phase as it showed better surface coverage as demonstrated hereafter.

Table 3.1 : Characterization of bare and amino-functionalized substrates

Substrate	Deposition phase	θ_{water} (°) on mica / (on silica)	SAMs thickness in air (nm) on mica ^a / (on silica) ^b	NH ₂ surface density (molecules/nm ²) ^c on mica
Bare substrate	N/A	0 / (0)	0 ^a /(0) ^b	0 ^c
APTES	Vapor	48 ± 3 / (56 ± 1)	1.0 ± 0.5 / (0.9 ± 0.02)	11 ± 2
AUTES	Liquid phase 0.125 mM ^d	76 ± 2	0.8 ± 0.1	4.0 ± 1.5
	Liquid phase 1 mM ^d	78 ± 3 / (79 ± 2)	1.7 ± 0.4 / (1.6 ± 0.02)	12.5 ± 0.5

Each experimental data represents the mean from a minimum of two independent measurements and the errors (±) represent the standard deviation of the mean.

^a measured on mica from adhesive contact in air by SFA.

^b measured on silica in air by ellipsometry.

^c measured by UV detection. No significant UV detection was observed for bare mica surfaces and the NH₂ surface density was reported as 0 molecules/nm².

^d AUTES SAMs were prepared with AUTES solutions and an immersion time of 20 min.

AUTES SAMs from liquid phase were made from different concentrations (from 0.125 to 1 mM) and for various immersion times. For immersion times longer than 6 hours and AUTES concentrations higher than 1 mM, aggregates of nanometric size were observed (**Figure 3.S.1b**). The water contact angle on the AUTES SAMs increases significantly from 0° on bare mica to a maximum value of ca 78° ± 3 (**Table 3.1**) after only 20 min of immersion for all concentrations (**Figure 3.3**). These results suggest that a larger surface coverage can be obtained over a shorter period of time compared to that of AUTES deposited from vapor phase. The maximum water contact angle (78° ± 3) corresponds to the maximum values reported for amino-functionalized SAMs of similar alkyl chain length but grafted on gold and gallium phosphide substrates, i.e., water contact angle varying from 35 to 79°. ³⁹⁻⁴¹ The wide range of reported values is associated with differences in the surface characteristics such as the nature and roughness of the substrate, the surface

grafting density, the pH level and the homogeneity of the SAMs. The lack of systematic control of these parameters prevents meaningful comparison of the different reports.

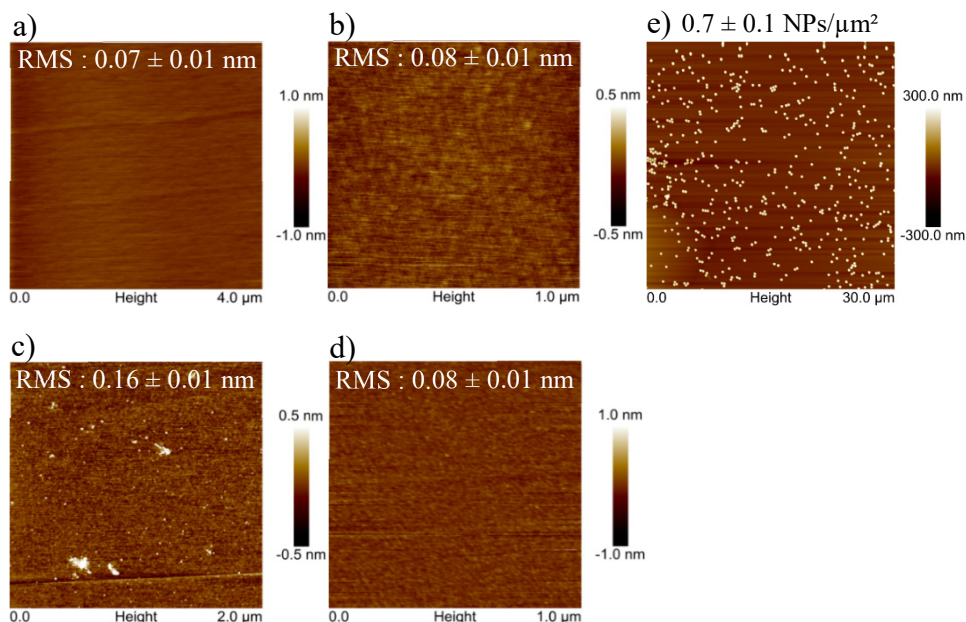


Figure 3.2: AFM images in air of (a) bare mica, (b) APTES SAMs on mica prepared from vapor phase, (c) AUTES SAMs on mica prepared from solution of 0.125 mM and an immersion time of 20 min, (d) AUTES SAMs on mica prepared from solution of 1 mM and an immersion time of 20 min, (e) immobilized carboxyl-functionalized NPs from NPs suspension of 0.1% w/w. NPs were grafted on AUTES SAMs on mica made of 1 mM and 20 min of immersion.

In order to assess the surface coverage, the variation in AUTES SAMs thickness was measured in air as a function of immersing solution concentration (**Table 3.1**). The increase in thickness on mica (from 0.8 to 1.7 nm) with concentration (from 0.125 to 1 mM) suggests an increase in grafting density, which could not be deduced from the water contact angle measurements (**Figure 3.3**). The thickness measured at 1 mM on both mica and silica (ca 1.7 nm, **Table 3.1**) is in agreement with the approximated fully extended contour length of 1.6 nm of AUTES molecules, indicating the absence of multilayer formation. The increase in thickness with an increase in concentration of the immersing solution is also associated with a decrease in surface roughness from 0.16 to 0.08 nm RMS (**Figure 3.2c and d**).

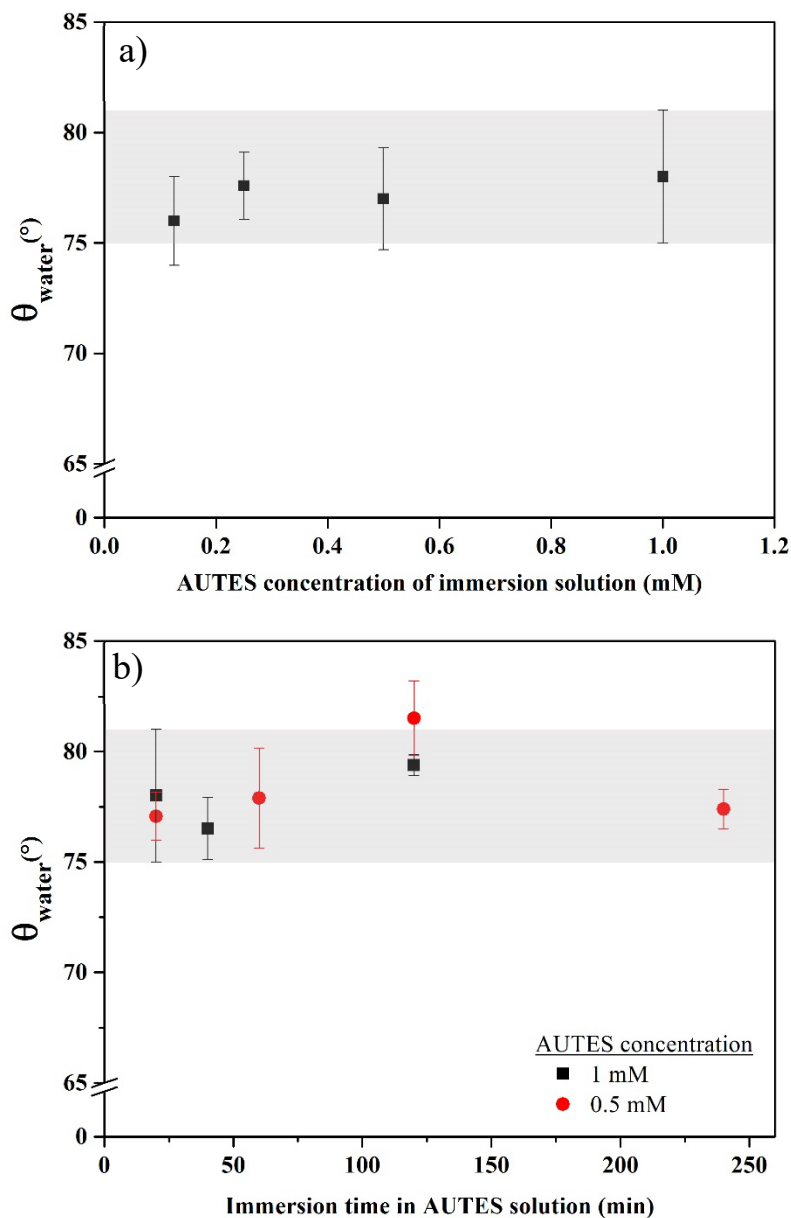


Figure 3.3 : Variation of θ_{water} on AUTES SAMs on mica prepared via self-assembling from solution as a function of **(a)** AUTES concentration for an immersion time of 20 min and **(b)** immersion time in AUTES solution for two different concentrations.

The combined and opposite influences of surface roughness (**Figure 3.2**) and grafting density on water contact angle can explain the absence of variation in the water contact angle with the concentration of the immersing solution (**Figure 3.3**). The inability to independently control these two parameters makes correlations between surface density and water contact angle difficult. Nevertheless, relatively smooth AUTES SAMs can be

obtained at concentration lower than 1 mM with RMS values comparable to those obtained for AUTES and APTES layers prepared from vapor phase (**Figure 3.2**) and significantly smaller than those reported in literature for shorter aminoalkylsilanes also prepared from liquid phase (RMS varying between 0.25 and 20 nm).^{18, 32, 42, 43}

To confirm and quantify the variation of AUTES grafting density with the concentration of immersing solution, NH₂ surface density was determined. The results confirm that the concentration of the immersing solution can be used to tune the grafting density of AUTES SAMs as an increase in NH₂ surface density was observed with increasing concentration of immersing solution (**Table 3.1**). The measured amino surface density ranges from 4.0 molecules/nm² to 12.5 molecules/nm² (**Table 3.1**). The maximum surface coverage (12.5 molecules/nm²) is very close to that determined on APTES monolayers (ca 11 molecules/nm², **Table 3.1**) prepared from vapor phase. Nevertheless, the maximum measured NH₂ surface densities are larger than those usually reported for SAMs made of relatively short aminoalkylsilanes (ca 3-6 molecules/nm²).^{13, 44-46}

Thickness, surface density and roughness measurements confirm that AUTES SAMs prepared from liquid phase are molecularly smooth and well-packed monolayers on both mica and silica substrates. In addition, the results confirm that similar SAMs can be obtained on both substrates if prepared under the same conditions (**Table 3.1**).

3.5.2 Surface charge of AUTES SAMs on mica.

APTES SAMs are widely used and it is well accepted that APTES surface pK_a is close to 9.^{27, 34} However, to the best of our knowledge, the pK_a value for AUTES SAMs has never been reported. Investigation of the effect of pH on the surface charge of AUTES SAMs (prepared with 1 mM AUTES solution and an immersion time of 20 min) was carried out by monitoring the adsorption of sulfate-modified polystyrene NPs (negatively charged from pH 3 to 13) as previously reported.³⁴ To study whether or not NPs adsorb via interactions other than electrostatic interactions, adhesion assays were carried out on bare and hydrophobically-modified silica substrates at pH 3 and 11. The NPs did not adsorb on bare silica surfaces at both pH values (**Figure 3.S.2b and d**), suggesting the absence of hydrogen bonding between silica and NPs. On hydrophobically-modified silica surfaces,

the NPs did not adsorb at pH 11 (**Figure 3.S.2c**) but slightly did at pH 3 (less than 2 NPs/ μm^2), (**Figure 3.S.2a**). However, this adsorption is negligible compared to the one observed on AUTES SAMs at all pH values tested (**Figure 3.S.2e**). The number of adsorbed NPs on AUTES SAMs remained constant (ca 20 NPs/ μm^2) from pH 3 to 13 (**Figure 3.4**), strongly suggesting that the AUTES SAMs remain positively charged over a wide range of pH. Measurements of zeta potential of AUTES SAMs on mica partly support this observation as no significant change in surface potential was observed between pH 3 ($+35 \pm 2$ mV) and pH 7 ($+40 \pm 4$ mV) (data not shown). These results are also in agreement with a study on APTES showing evidence of protonated amino groups for $1 < \text{pH} < 10$.²⁷

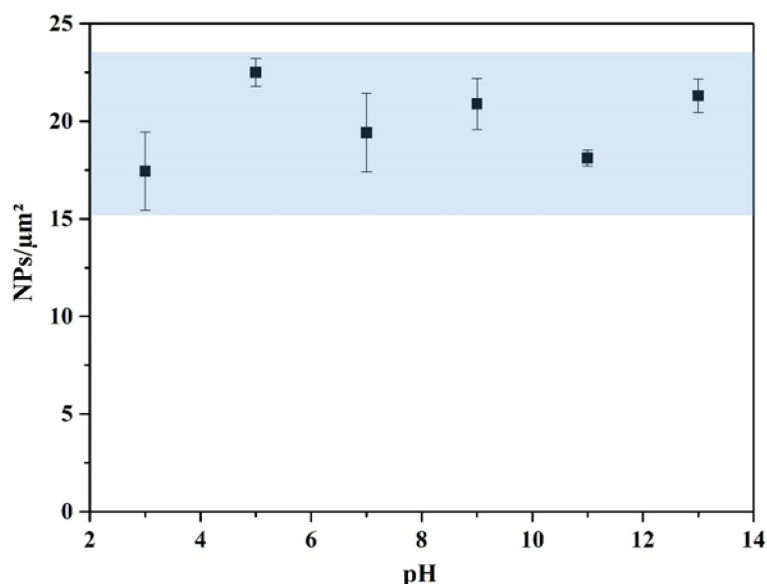


Figure 3.4 : Surface density of physisorbed sulfate-modified polystyrene NPs on AUTES SAMs from aqueous solution as a function of pH. All surfaces were immersed in sulfate-modified polystyrene NPs suspension for 4 h at room temperature. The surface density was determined from AFM images. Scan size: ($5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$). The surface density of NPs immobilized through electrostatic interactions on AUTES SAMs from aqueous suspension of pH 3–13 is constant. This means that AUTES pKa is high and that amino groups remain charged even at high pH values.

3.5.3 Hydrolytic stability of amino SAMs on mica.

Static water contact angle was measured to determine the stability of supported APTES and AUTES SAMs on mica (prepared from vapor phase or self-adsorption from 1 mM AUTES solution for various time periods) in water of different pH values (from 2 to 10). Static and dynamic water contact angle measurements are widely used to assess

hydrolytic stability of SAMs.^{20, 23, 25, 29, 30} Chemisorbed monolayers have shown small hysteresis in dynamic contact angles compared to physisorbed SAMs.⁴⁷ In addition, the reported difference between static and advancing contact angles (ca 4%)²⁵ is of the same order of magnitude as the experimental error, making comparison between the two angles reliable.

On APTES SAMs, the water contact angle decreased significantly from 48° (before immersion) to 4°, 15° and 21° after only 1 hour of immersion in pH 4, 6 and 8 respectively (**Figure 3.5**), revealing the very poor stability of the SAMs in water. On AUTES SAMs, no change in water contact angle was observed after 8 days of immersion for pH > 6 (**Figure 3.5**). A slight decrease in contact angle (< 10°) was measured over the first three days of immersion for pH < 6 but it is significantly smaller than that observed on APTES (**Figure 3.5**). This might be caused by an increase in the number of hydrophilic protonated amino groups as pH decreases. This hypothesis is supported by the absence of systematic diminution of N/Si ratio on AUTES-functionalized mica substrates over immersion time up to 8 days, in acidic and basic conditions (studied by XPS analysis, data not shown). These results confirm that AUTES SAMs did not degraft from mica in aqueous media.

Fast degrafting of APTES monolayers upon exposure to water is consistent with previous reports.^{20, 23} The increase in stability observed with AUTES is a consequence of the increased alkyl chain length as also demonstrated for shorter aminoalkylsilanes (C₃ vs C₆).²⁰ The long alkyl chain of AUTES provides a hydrophobic barrier preventing the hydrolysis of Si_{silane}-O-Si_{surface} bonds. Increasing grafting density disfavors amino catalyzed hydrolysis of the Si_{silane}-O-Si_{surface} bonds by sterical hindrance. In addition, the protonation of amino groups of AUTES even at high pH values slows down the amino catalyzed hydrolysis of Si_{silane}-O-Si_{surface} and contributes to the good stability of AUTES monolayers observed.

The Si_{surface}-C_{adsorbate}, Si_{surface}-O-C_{adsorbate}, Si_{surface}-O-P_{adsorbate} bonds²⁸⁻³⁰ were found to be more robust than Si_{silane}-O-Si_{surface} but the same bonds in AUTES SAMs prepared in that study exhibit the best hydrolytic stability reported so far for similar systems on silica-based substrates. This is due to the synergic effects of combined long alkyl chain length,

large grafting density, protonation of the amino groups, homogeneity and the $\text{Si}_{\text{silane}}\text{-O-Si}_{\text{surface}}$ bonds with the surface and between the neighboring silanes.

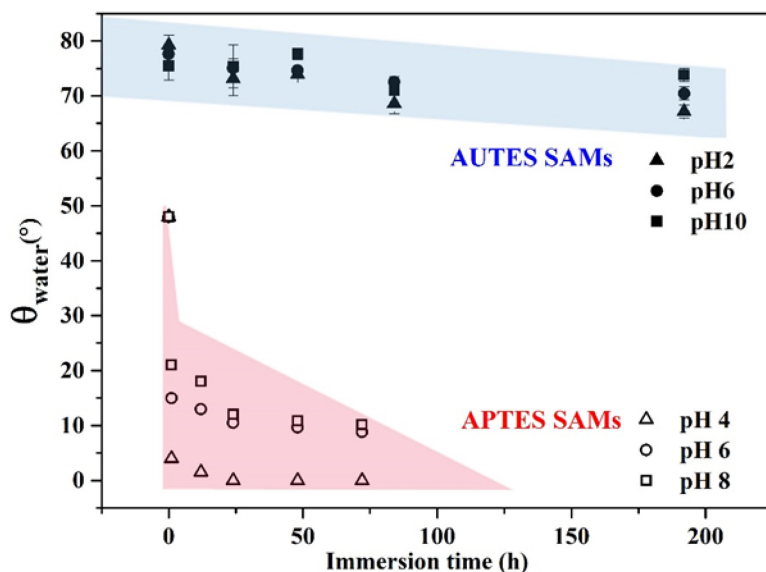


Figure 3.5 : Variation of θ_{water} on amino-functionalized mica substrates as a function of immersion time in water of various pH levels. AUTES SAMs were prepared with 1 mM AUTES solution and an immersion time of 20 min. APTES SAMs were prepared from vapor phase. The fast decrease of water contact angle on APTES SAMs with immersion time reveals the instability of this monolayer in water. In contrast, the slight diminution on AUTES monolayer confirms the robustness of AUTES anchorage on silica-based substrate.

3.5.4 Reactivity of amino SAMs and subsequent hydrolytic stability of the immobilized system.

Several approaches may be used to study the reactivity of the surface amino groups such as grafting antibodies¹³, fluorescent dye^{19,48} and NPs^{28,49}. Carboxyl-functionalized NPs were chosen as a probe system for several reasons. First, the PAA shell of the NPs may form amide bonds with the primary amine groups of the SAMs. Second, the PAA shell is pH-sensitive and can swell at high pH, which would favor water contact with the SAMs surface. Finally, the large size of NPs makes their quantification relatively easy. As a consequence, the variation in the surface density of NPs with immersion time in water with different pH values was used as an indicator of the hydrolytic stability. Both self-adsorption from solution and HCEM were used to graft carboxyl-functionalized NPs on amino SAMs.

The time required for maximal coverage of amino-functionalized SAMs by the NPs was longer using self-adsorption from solution than for HCEM deposition (20 hours vs 10 min). Because APTES monolayers rapidly degraft from silica-based substrates in water (**Figure 3.5**), the HCEM method was selected for deposition on APTES because it requires a shorter exposure time to water (ca 10 min) and does not require the immersion of the SAMs in water. However, NPs immobilized on APTES obtained from HCEM were not reproducible and exhibited highly heterogeneous surface coverage for an unknown reason (**Figure 3.S.4**). As a consequence, self-adsorption from solution was used on APTES and resulted in a more homogeneous surface coverage (**Figure 3.2e**). The surface coverage of the NPs deposited via HCEM on supported APTES decreased from an initial value of 2.03 to 1.00 NPs/ μm^2 after being immersed for 72 hours in solutions of pH 8 (**Figure 3.S.3**). The decrease in NPs surface density is clearly evidenced by the presence of large areas of flat bare mica on the surface. The detachment of the NPs can be explained by the instability of

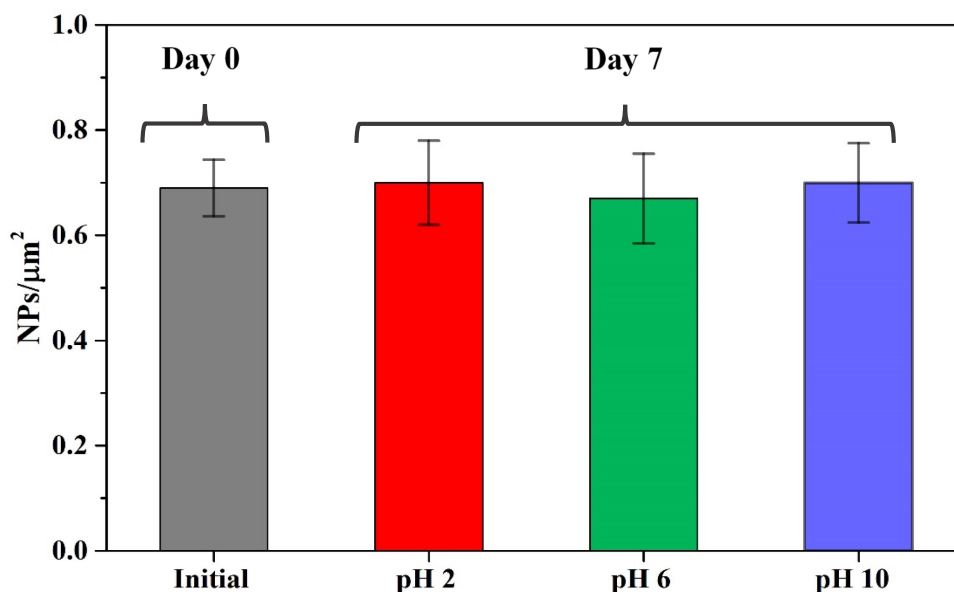


Figure 3.6 : Change in surface density of carboxyl-functionalized NPs attached on APTES SAMs before immersion (initial) and after 7 days of immersion in pH 2, 6 and 10. The surface density was determined from AFM images. Scan size: (30 μm \times 30 μm). See **Figure 3.2e** for AFM image of immobilized NPs before immersion (initial). NPs were grafted on APTES SAMs (prepared on mica with 1 mM APTES solution and an immersion time of 20 min) from a 0.1% w/w NPs dispersion. No significant change in NPs density is observed after water immersion for all pH values tested. This observation confirms that attachments of NPs to APTES and APTES to substrates are robust.

the APTES SAMs observed in aqueous media (**Figure 3.5**). Nevertheless, the NPs degrafting is slower than APTES degrafting (**Figure 3.5**), which may be explained by the multiple bonds linking each NP to the SAMs. On AUTES SAMs, The NPs surface density does not show any significant change with immersion time (7 days) and pH (**Figure 3.6**). These results confirm the reactivity of the AUTES SAMs and strongly support the enhanced stability of AUTES compared to APTES SAMs.

3.6 Conclusion

Robust and homogeneous amino-functionalized monolayers made of AUTES were easily prepared on silica and mica substrates using simple surface chemistry and self-assembly with a control in grafting density. Water wettability, thickness measurements and quantification of NH_2 surface density confirmed that the long alkyl chain of AUTES significantly improves the stability in aqueous media over a wide range of pH compared to short aminoalkylsilanes as APTES and that surface coverage can be tuned by varying the concentration of the immersing solution. In addition, the results suggest that the amino groups of the AUTES SAMs remain partially ionized over a wide range of pH values (3-13). The robustness and homogeneity of AUTES SAMs allowed the stable immobilization of carboxyl-functionalized NPs on silica-based surfaces. Such a system provides an ideal platform to design and develop surfaces with uniform and controlled attachment of various functional units such as functionalized polymers, proteins, enzymes, nucleic acids or cells via covalent attachment.

3.7 Acknowledgements

Financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Fonds Québécois pour la Recherche en Nature et Technologies is acknowledged. The authors thank Bertrand Floure at Malvern for zeta potential measurements on planar mica and AUTES surfaces and Josianne Lefebvre at École Polytechnique de Montréal for XPS analysis.

3.8 Supplementary material

Procedure for XPS measurement. Hydrophobically-modified silica substrate preparation. AFM images of AUTES SAMs on mica prepared from vapor and liquid phase for long immersion time. AFM images resulting from adhesion assays of sulfate-modified polystyrene NPs on hydrophobically-modified silica, bare silica and AUTES SAMs. Carboxyl-functionalized NPs immobilized on AUTES SAMs and APTES SAMs mica prepared from horizontal convective evaporation.

3.8.1 X-Ray Photoelectron Spectrometry (XPS)

XPS analysis of surfaces was performed using a VG ESCALAB 3 MKII apparatus. All spectra were referenced to the C1s hydrocarbon peak at 285.0 eV. Relative concentrations were determined using Wagner sensitivity factors. Spectra were analyzed using VG Advantage software and a Shirley background was subtracted. The analyzed surface area was 2 mm × 3 mm and depth was 50-100 Å. XPS analysis of AUTES SAMs on mica was monitored directly after monolayer preparation and after 7 days of immersion at pH 2, 4, 8 and 10 on independent samples prepared at the same time with identical mica activation and AUTES immersing solution. Prior to XPS analysis, the surfaces were taken out from water and thoroughly rinsed with Milli-Q water and dried under nitrogen. pH buffers were prepared from Trizma base buffer solution (0.1 M) in Milli-Q water and the pH was adjusted using HCl solution. The pH was measured with a Symphony SB20 pH meter with an Ag/AgCl electrode.

3.8.2 Hydrophobically-modified silica substrate

Hydrophobic alkylsilane monolayers made of dodecyltrichlorosilane were prepared on activated silica substrates. A solution of 100 mM of dodecyltrichlorosilane in dry toluene was stirred for 1h then filtered on 0.2 µm poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) filter. Immediately after the activation, the substrates were immersed in the dodecyltrichlorosilane solution and air was replaced by argon. After 2 h, the substrates were removed from the solution, rinsed with dry toluene and dried with nitrogen prior to annealing at 120 °C for 1 h under atmospheric pressure.

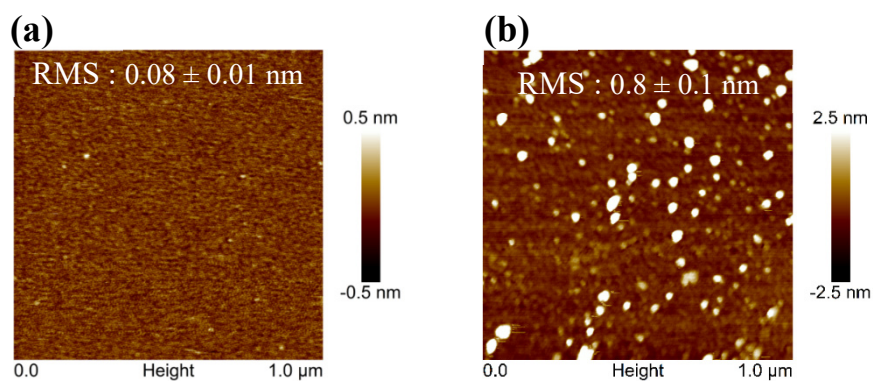


Figure 3.S.1: AFM images in air of AUTES SAMs on mica prepared (a) from vapor phase and (b) with 1 mM AUTES solution and an immersion time of 6 hours.

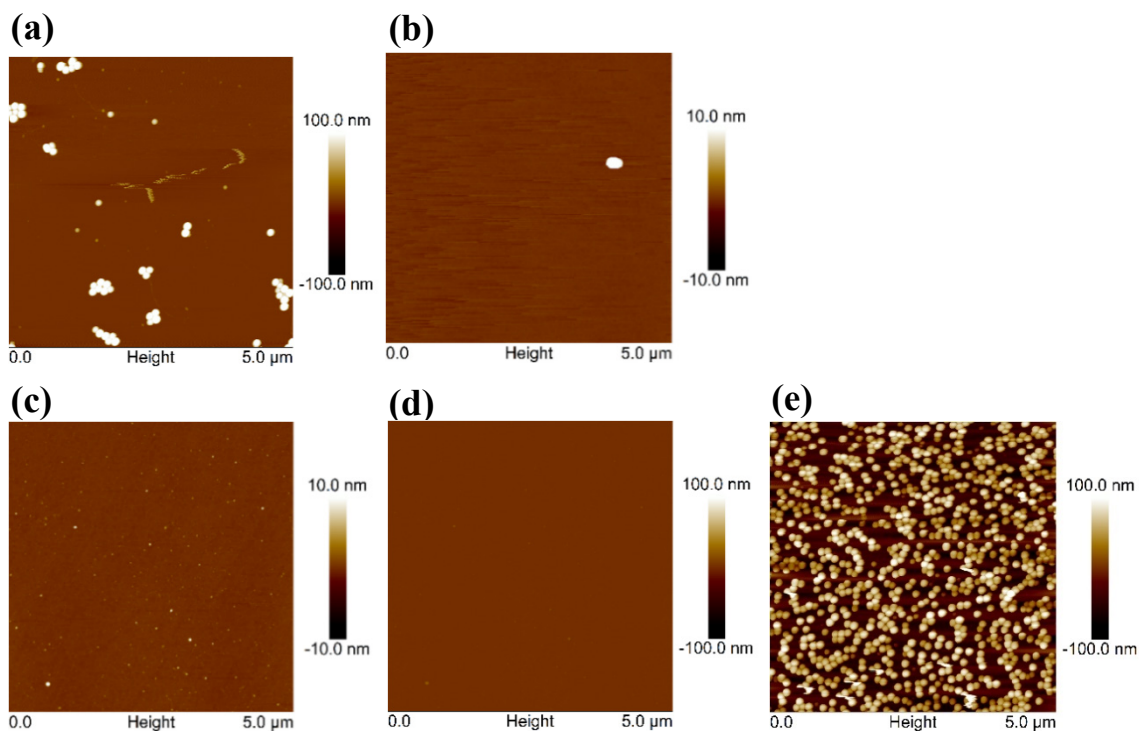


Figure 3.S.2 : AFM images in air of sulfate-modified polystyrene NPs physisorbed on: (a) hydrophobized silica at pH 3, (b) bare silica at pH 3, (c) hydrophobized silica at pH 11, (d) bare silica at pH 11 and (e) AUTES SAMs at pH 5. All surfaces were immersed in sulfate-modified polystyrene NPs dispersions for 4 hours at room temperature. The surface density was determined from AFM images. Scan size: (5 μm × 5 μm).

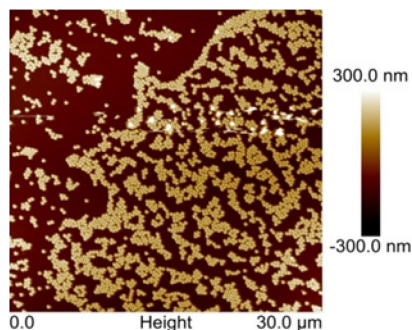


Figure 3.S.3 : AFM images in air of immobilized carboxyl-functionalized NPs obtained using horizontal convective evaporation method at a constant velocity of 15 $\mu\text{m/s}$. NPs were grafted on AUTES SAMs (prepared on mica with 1 mM AUTES solution and an immersion time of 20 min) from a 0.2% w/w NPs dispersion.

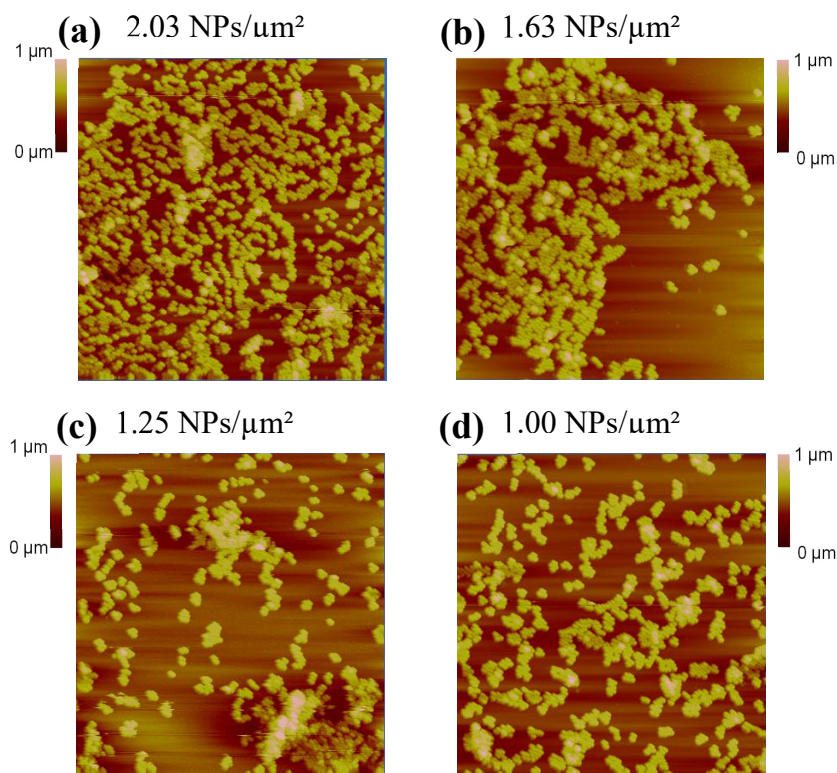


Figure 3.S.4 : AFM images in air of immobilized carboxyl-functionalized NPs (a) before immersion, and after 72 h of immersion in aqueous solution at (b) pH 4, (c) pH 6 and (d) pH 8. Scan size: 30 $\mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$. NPs were grafted on APTES monolayers (prepared from vapor phase) using horizontal convective evaporation method at a constant velocity of 15 $\mu\text{m/s}$ and with a drop (50 μL) of 0.07% w/w NPs dispersion.

3.9 References

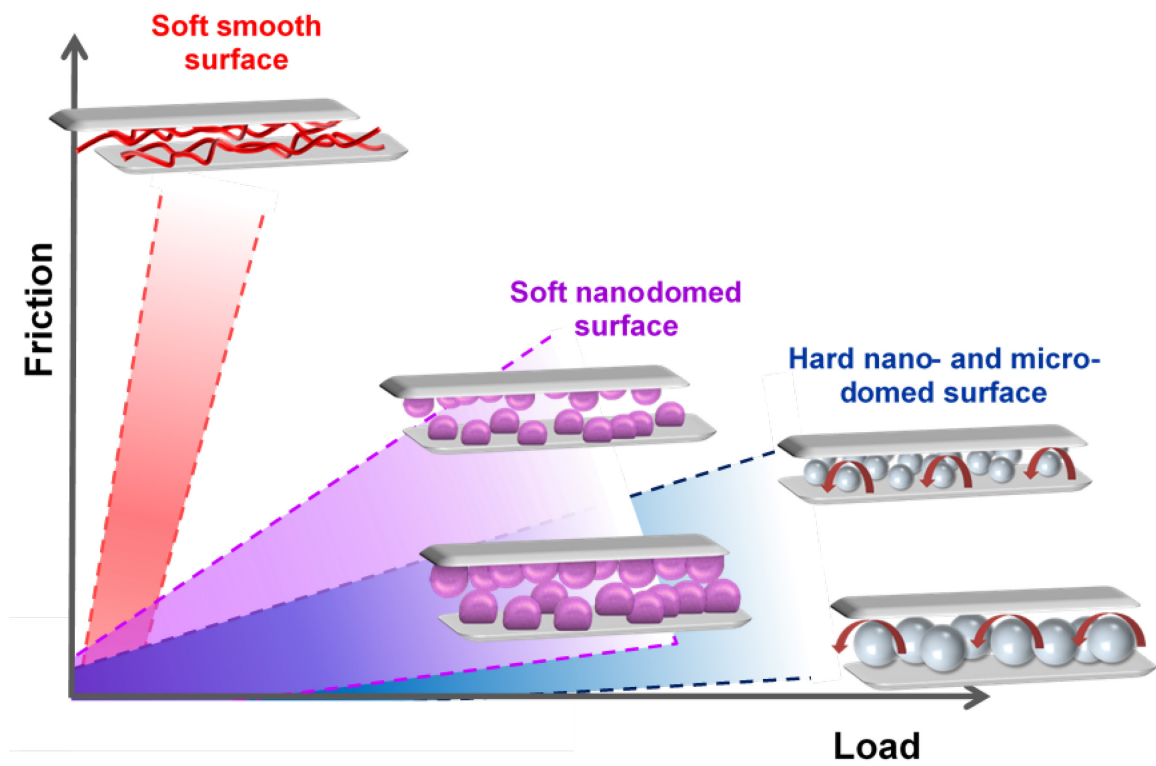
1. S. Onclin, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, Engineering Silicon Oxide Surfaces Using Self-Assembled Monolayers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 6282 – 6304 (2005).
2. S. K. Aryaa, P. R. Solankia, M. Dattab, B. D. Malhotraa, Recent Advances in Self-Assembled Monolayers Based Biomolecular Electronic Devices. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 2810-2817 (2009).
3. E. H. Williams *et al.*, Immobilization of Streptavidin on 4H-SiC for Biosensor Development. *Appl. Surf. Sci.* **258**, 6056-6063 (2012).
4. R. Maboudian, W. R. Ashurst, C. Carraro, Self-Assembled Monolayers as Anti-Stiction Coatings for MEMS: Characteristics and Recent Developments. *Sensor. Acutat. A-Phys.* **82**, 219-223 (2000).
5. T. Böcking, K. A. Kilian, K. Gaus, J. J. Gooding, Modifying Porous Silicon with Self-Assembled Monolayers for Biomedical Applications: The Influence of Surface Coverage on Stability and Biomolecule Coupling. *Adv. Funct. Mater.* **18**, 3827-3833 (2008).
6. T. Baumgärtel, C. von Borczyskowski, H. Graaf, Selective Surface Modification of Lithographic Silicon Oxide Nanostructures by Organofunctional Silanes. *Beilstein J. Nanotechnol.* **4**, 218–226 (2013).
7. J. Kim, J. Cho, P. M. Seidler, N. E. Kurland, V. K. Yadavalli, Investigations of Chemical Modifications of Amino-Terminated Organic Films on Silicon Substrates and Controlled Protein Immobilization. *Langmuir* **26**, 2599-2608 (2010).
8. Bo Li, R. Franking, E. C. Landis, H. Kim, R. J. Hamers, Photochemical Grafting and Patterning of Biomolecular Layers onto TiO₂ Thin Films. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **1**, 1013–1022 (2009).
9. A. G. Frutos, Jennifer M. Brockman, R. M. Corn, Reversible Protection and Reactive Patterning of Amine-and Hydroxyl-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold Surfaces for the Fabrication of Biopolymer Arrays. *Langmuir* **16**, 2192-2197 (2000).
10. X. Banquy, X. X. Zhu, S. Giasson, Mechanical and Frictional Properties of Nanoparticle Monolayers Grafted on Functionalized Mica Substrates. *J. Phys. Chem. B* **112**, 12208–12216 (2008).
11. X. Banquy, E. Charrault, S. Giasson, Normal and Lateral Interactions between Thermosensitive Nanoparticle Monolayers in Water. *J. Phys. Chem. B* **114**, 9721–9728 (2010).
12. R. L. Meyera *et al.*, Immobilisation of Living Bacteria for AFM Imaging under Physiological Conditions. *Ultramicroscopy* **110**, 1349-1357 (2010).
13. S. G. Thakurta, A. Subramanian, Fabrication of Dense, Uniform Aminosilane Monolayers: A platform for Protein or Ligand Immobilization. *Colloids Surf. A* **414**, 384-392 (2012).
14. R. R. Bhat, J. Genzer, B. N. Chaney, H. W. Sugg, A. Liebmann-Vinson, Controlling the Assembly of Nanoparticles Using Surface Grafted Molecular and Macromolecular Gradients. *Nanotechnology* **14**, 1145-1152 (2003).
15. A. Heise, H. Menzel, Grafting of Polypeptides on Solid Substrates by Initiation of N-Carboxyanhydride Polymerization by Amino-Terminated Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **13**, 723-728 (1997).

16. M. Steenackers *et al.*, Morphology Control of Structured Polymer Brushes. *Small*, 1764-1773 (2007).
17. H.-L. Li *et al.*, The Effect of Amino Density on the Attachment, Migration, and Differentiation of Rat Neural Stem. *Mol. Cells* **35**, 436-443 (2013).
18. A. R. Yadav, R. Sriram, J. A. Carter, B. L. Miller, Comparative Study of Solution-Phase and Vapor-Phase Deposition of Aminosilanes on Silicon Dioxide Surfaces. *Mat. Sci Eng. C* **35**, 283-290 (2014).
19. F. Zhang *et al.*, Chemical Vapor Deposition of Three Aminosilanes on Silicon Dioxide: Surface Characterization, Stability, Effects of Silane Concentration, and Cyanine Dye Adsorption. *Langmuir* **26**, 14648-14654 (2010).
20. E. Asenath-Smith, W. Chen, How To Prevent the Loss of Surface Functionality Derived from Aminosilanes. *Langmuir* **24**, 12405-12409 (2008).
21. A. Chandekar, S. K. Sengupta, J. E. Whitten, Thermal Stability of Thiol and Silane Monolayers: A Comparative Study. *Appl. Surf. Sci.* **256**, 2742-2749 (2010).
22. S. R. Wasserman, Y.-T. Tao, G. M. Whitesides, Structure and Reactivity of Alkylsiloxane Monolayers Formed by Reaction of Alkyltrichlorosilanes on Silicon Substrates. *Langmuir* **5**, 1074-1087 (1989).
23. M. Zhu, M. Z. Lerum, W. Chen, How to Prepare Reproducible, Homogeneous, and Hydrolytically Stable Aminosilane-derived Layers on Silica. *Langmuir* **28**, 416-423 (2012).
24. O. Borozenko *et al.*, Monitoring in Real-Time the Degrafting of Covalently Attached Fluorescent Polymer Brushes Grafted to Silica Substrates—Effects of pH and Salt. *Macromolecules* **44**, 8177-8184 (2011).
25. B. Liberelle, X. Banquy, S. Giasson, Stability of Silanols and Grafted Alkylsilane Monolayers on Plasma-Activated Mica Surfaces. *Langmuir* **24**, 3280-3288 (2008).
26. O. Seitz *et al.*, Control and Stability of Self-Assembled Monolayers Under Biosensing Conditions. *J. Mater. Chem.* **21**, 4384-4392 (2011).
27. M. Etienne, A. Walcarius, Analytical Investigation of the Chemical Reactivity and Stability of Aminopropyl-Grafted Silica in Aqueous Medium. *Talanta* **59**, 1173-1188 (2003).
28. D. Aureau *et al.*, Controlled Deposition of Gold Nanoparticles on Well-Defined Organic Monolayer Grafted on Silicon Surfaces. *J. Phys. Chem. C* **114**, 14180-14186 (2010).
29. N. S. Bhairamadgi *et al.*, Hydrolytic and Thermal Stability of Organic Monolayers on Various Inorganic Substrates. *Langmuir* **30**, 5829-5839 (2014).
30. O. Borozenko, V. Machado, W. G. Skene, S. Giasson, Organophosphonic Acids as Viable Linkers for the Covalent Attachment of Polyelectrolyte Brushes on Silica and Mica Surfaces. *Polym. Chem.* **5**, 5740-5750 (2014).
31. Y. Yang, A. M. Bittner, S. Baldelli, K. Kern, Study of Self-Assembled Triethoxysilane Thin Films Made by Casting Neat Reagents in Ambient Atmosphere. *Thin Solid Films* **516**, 3948-3956 (2008).
32. R. Chintala *et al.*, Electrical Properties of Amino SAM Layers Studied with Conductive AFM. *Eur. Polym. J.* **49**, 1952-1956 (2013).
33. Q. Meng, Z. Li, G. Li, X. X. Zhu, Effect of Hydrophilic Shells on the Formation of Colloidal Crystals by Monodisperse Core-Shell Polymer Microspheres. *Macromol. Rapid Commun.* **28**, 1613-1618 (2007).

34. K. van der Maaden, K. Sliedregt, A. Kros, W. Jiskoot, J. Bouwstra, Fluorescent Nanoparticle Adhesion Assay: a Novel Method for Surface pKa Determination of Self-Assembled Monolayers on Silicon Surfaces. *Langmuir* **28**, 3403–3411 (2012).
35. H. G. Tompkins, E. A. Irene, Handbook of Ellipsometry. *William Andrew Pub*, (2005).
36. J. Israelachvili *et al.*, Recent Advances in the Surface Forces Apparatus (SFA) Technique. *Rep. Prog. Phys* **73**, 1-16 (2010).
37. J. N. Israelachvili, Thin Film Studing Using Multiple-Beam Interferometry. *J. Colloid Interface Sci.* **44**, 259-272 (1972).
38. J. H. Moon, J. W. Shin, S. Y. Kim, J. W. Park, Formation of Uniform Aminosilane Thin Layers: An Imine Formation To Measure Relative Surface Density of the Amine Group. *Langmuir* **12**, 4621-4624 (1996).
39. P. R. Solanki, S. K. Arya, Y. Nishimura, M. Iwamoto, B. D. Malhotra, Cholesterol Biosensor Based on Amino-Undecanethiol Self-Assembled Monolayer Using Surface Plasmon Resonance Technique. *Langmuir* **23**, 7398-7403 (2007).
40. J. M. Brockman, A. G. Frutos, R. M. Corn, A Multistep Chemical Modification Procedure To Create DNA Arrays on Gold Surfaces for the Study of Protein-DNA Interactions with Surface Plasmon Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc* **121**, 8044-8051 (1999).
41. R. Flores-Perez, D. Y. Zemlyanov, A. Ivanisevic, Quantitative Evaluation of Covalently Bound Molecules on GaP (100) Surfaces. *J. Phys. Chem. C* **112**, 2147-2155 (2008).
42. J. A. Howarter, J. P. Youngblood, Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir* **22**, 11142-11147 (2006).
43. X. Song, J. Zhai, Yilin Wang, L. Jiang, Self-Assembly of Amino-Functionalized Monolayers on Silicon Surfaces and Preparation of Superhydrophobic Surfaces Based on Alkanoic Acid Dual Layers and Surface Roughening. *J. Colloid Interface Sci.* **298**, 267-273 (2006).
44. N. Rathor, S. Panda, Aminosilane Densities on Nanotextured Silicon. *Mat. Sci Eng. C* **29**, 2340–2345 (2009).
45. H. Sugimura *et al.*, Molecular Packing Density of a Self-assembled Monolayer Formed from N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltriethoxysilane by a Vapor Phase Process. *Chem. Commun.* **47**, 8841–8843 (2011).
46. T. Fischer *et al.*, Quantification of Variable Functional-Group Densities of Mixed-Silane Monolayers on Surfaces via a Dual-Mode Fluorescence and XPS Label. *Anal. Chem.* **87**, 2685–2692 (2015).
47. N. Belman, K. Jin, Y. Golan, J. N. Israelachvili, N. S. Pesika, Origin of the Contact Angle Hysteresis of Water on Chemisorbed and Physisorbed Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **28**, 14609–14617 (2012).
48. S. Shiota *et al.*, Quantification of Amino Groups on Solid Surfaces Using Cleavable Fluorescent Compounds. *Langmuir* **31**, 8824–8829 (2015).
49. S. E. Williams, P. R. Davies, J. L. Bowen, C. J. Allender, Controlling the Nanoscale Patterning of AuNPs on Silicon Surfaces. *Nanomaterials* **3**, 192-203 (2013).

Chapitre 4

Lubrication with Soft and Hard Two-Dimensional Colloidal Arrays



4.1 Contexte et résumé

L'extrême stabilité des SAMs d'AUTES préparées lors de l'étude présentée au *Chapitre 3* a permis d'immobiliser de manière robuste des nanoparticules. Cette stratégie a été ensuite utilisée pour immobiliser des particules de polystyrène-polyacide acrylique (PS-PAA) sensibles aux variations de pH. De la même manière une couche molle de polyacide acrylique a été chemisorbée sur ces substrats amino-fonctionnalisés permettant l'immobilisation subséquente de particules dures de silices. La préparation de ces substrats a permis d'étudier avec fiabilité les propriétés tribologiques de surfaces nanostructurées tout en s'affranchissant du dégreffage de particules lié à la stabilité en milieu aqueux. En effet, le besoin en surface autolubrifiante couvre une large variété de biomatériaux tels que les substituts cartilagineux, les dispositifs oculaires ou bien les cathéters.

De cette étude, il résulte que des surfaces superlubrifiantes peuvent être obtenues à partir de substrats structurés. L'immobilisation de particules polymériques à base de polyélectrolytes sensibles aux variations de pH a permis l'obtention de structures molles et déformables alors que l'immobilisation de particules de silice a permis la formation de structures dures. Deux mécanismes majeurs contrôlant les propriétés de frottement ont été mis en évidence. Les surfaces structurées à partir de polyélectrolytes présentent des propriétés de frottement directement corrélées au gonflement et donc à la teneur en eau de ces structures. Le gonflement peut être contrôlé par le pH du milieu aqueux. Plus les structures sont gonflées, plus le coefficient de frottement est faible. En revanche, avec des structures dures obtenues par l'immobilisation de particules de silice, le roulement de ces particules permet d'obtenir sous certaines conditions des coefficients de frottement extrêmement faibles. Dans ce cas, la nature du lien entre la particule et le substrat importe peu et un dégreffage systématique de certaines particules est observé pour permettre le mouvement des surfaces tout en limitant les forces de frottement.

Cette étude démontre que des structures 2D non cristallines peuvent être utilisées pour contrôler les propriétés lubrifiantes. De plus, même sous de fortes charges appliquées (ex: 600 atm) les coefficients de friction restent faibles rendant ce type de revêtement plus efficace que les revêtements polymériques non-structurées.

4.2 Abstract

Normal and friction forces between immobilized two-dimensional (2D) homogeneous non-close-packed colloidal arrays made of different particles are compared in aqueous media. Soft pH-responsive (microgels) and nonresponsive hard (silica) particles of different sizes were used to create the 2D arrays. The results show that the friction of soft responsive structured layers can be successfully modulated by varying the pH, with a friction coefficient varying by nearly 3 orders of magnitude (10^{-2} to 1). This important change in lubricating properties is mainly correlated with the particle swelling behavior, i.e., the friction coefficient decreasing exponentially with an increase in the swelling ratio regardless of the size, surface coverage, and degree of ionization of the particles. In addition, the robustly attached microgel particles were able to sustain high pressure (up to 200 atm) without significant surface damage. The 2D arrays of nonresponsive hard particles also gave rise to very a low friction coefficient ($\mu \approx 10^{-3}$) under similar experimental conditions and could sustain a larger pressure without damage (≤ 600 atm). The low friction dissipation observed between the hard arrays resulted from a rolling mechanism. Even though rolling requires nonimmobilized particles on the substrates, the results show the importance of attaching a certain proportion of particles on the surfaces to reduce friction.

Keywords: *friction, lubrication, nanoparticle, two-dimensional colloidal array, responsive surface, polymer, rolling, Surface Forces Apparatus*

4.3 Introduction

The exceptional capacity of mammalian joint articulations to sustain high-applied load with extremely good lubricity and minimal wear have significantly impacted the development of polymer-bearing surfaces and coatings to improve aqueous lubricity of biomaterials.¹⁻⁵ Good lubricity is especially required for devices involving motion such as articular implants,^{6,1} ocular lenses⁷ and catheters.⁸ The excellent lubricant properties of articular joints have been associated with the presence of sugar-based polymers in the synovial liquid.^{2, 9, 10} They are attributed to the facility with which sugar-based polymers can be hydrated to hold a significant amount of water at the interface to be lubricated.⁹

In an attempt to mimic the lubricating function of the natural molecules, researchers have resorted to different polymers,^{1-5, 11-16} more particularly, synthetic polymer brushes,^{3, 17-22} which are generally simpler and whose behavior is somewhat better understood than that of their natural counterparts.^{4, 10, 23} Several studies using the surface forces apparatus (SFA) and atomic force microscopy (AFM) have been carried out for different classes of solvated polymer-bearing surfaces in order to elucidate the role of different parameters, such as polymer conformation, solvent quality and type of substrate, in reducing friction between surfaces.^{4, 10, 24-26} In particular, water-based polymer brushes have been shown to be highly lubricious in an aqueous environment under conditions ranging from 10 nN to 30 mN loads experienced in AFM and SFA.²⁵⁻²⁸ The good performance of such systems is attributed to their ability to maintain separated the sliding countersurfaces while presenting a solvent-rich, low shear-strength interbrush layer, providing fluid-film lubrication without the need for hydrodynamic lubrication.^{9, 24} This differentiates brushes from other polymer coatings.²⁹ With polyelectrolyte brushes, the charges appear to provide additional repulsions between the sliding surfaces upon compression, thereby enhancing the ability of the brush to separate the surface.³

The main challenge facing polymer coatings, including brushes, appears to be their resistance to wear.³⁰ Physisorbed polymer layers are more susceptible to desorb or cleave from the substrates under an applied load or upon environmental changes (i.e., pH, ionic strength) compared to covalently attached polymer coating.³⁰ Nevertheless, covalently attached polymer coatings, even if more robust than their physisorbed counterparts, are also susceptible to cleavage and wear under high pressure and shear rates.^{18, 23, 19}

Cross-linking polymers, and more particularly assemblies of cross-linked nanoparticles layers, have shown to be a possible solution to the wear issue for nonregenerable polymer brushes.^{19, 31} Chemical cross-linking appears to increase the cohesion and wear resistance of the polymer layer under small deformations.²⁴ The addition of a chemical cross-linker has been shown to lead to both stiffening and shrinking of the resulting polymer network which can drastically improve the robustness of the polymer coating. However, the friction increases dramatically upon increasing the amount of chemical cross-linker.²⁴ On another hand, low friction and low wear have been reported for physically cross-linked hydrogels.²¹ This behavior was explained by the weak electrostatic cross-link bonds that are beneficial compared to strong covalent cross-links and suggested that an energy dissipation mechanism needs to be in place to impart wear resistance.

The nonstructured and/or soft polymer coatings investigated so far^{19, 30} do not necessary model biomedical devices, implants, or biological tissues, which can be highly organized from the molecular to the nano-, micro and macro-scale.³² Nature developed many efficient materials with specific surface structures to modulate surface interactions such as adhesion, friction and wettability.^{12, 33-35} Structured surfaces have demonstrated several advantages for aqueous-based lubrication. First, patterns can promote water retention as well as the trapping of wear particles in the gap between valleys.³⁶⁻³⁸ Second, low deformability asperities of relatively hard surface structures can significantly reduce the real contact area and therefore reduce the adhesion and friction forces acting between surfaces.³⁸⁻⁴¹ Tribological properties of various patterns have been investigated in water for different structures such as hard pits,²⁶ dimples,⁴² and domes³⁹ as well as for soft polymer structures such as tube forests⁴³ and domes.^{31, 44} However, the mechanism in which structures control friction properties is still unclear and debated, especially with polymer surfaces because of the difficulty in independently controlling the parameters affecting friction such as the surface coverage, surface topography, elasticity, porosity and degree of ionization.

In this work, we explore the tribological properties of structured surfaces made of two-dimensional (2D) soft and hard colloidal arrays in order to elucidate the role of surface structure and elasticity in controlling friction in aqueous-based media. The normal and lateral forces between two similarly structured surfaces are investigated using a surface

forces apparatus. The soft colloidal arrays, or soft nanodomed surfaces, were made of pH-sensitive polymer nanoparticles (NPs). The effect of surface density, elasticity, charges, and the surface immobilization method was investigated over a wide range of pH (4-10). The tribological behavior of the soft nanodomed surfaces is compared to that of hard nondeformable arrays made of silica particles of various dimensions and grafting densities.

4.4 Experimental Section

4.4.1 Materials

Ruby mica sheets were purchased from S & J Trading Inc. (Glen Oaks, NY, USA). Milli-Q-quality water was obtained from a Millipore Gradient A10 purification system (resistance 18.2 M Ω ·cm, TOC < 3 ppb). Styrene, divinylbenzene (DVB), acrylic acid (AA), potassium persulfate (KPS), N-(3(dimethylamino)propyl)-N'-ethyl-carbodiimide (EDC), N-hydroxysulfosuccinimide (NHS), hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide (NaOH), Trizma base, triethanolamine (TEA), and poly(acrylic acid) (PAA; molecular weight, $M_w = 1\,250\,000$ g/mol) were purchased from Sigma-Aldrich. 11-Aminoundecyltriethoxysilane (AUTES) was purchased from Gelest Inc. Amino-functionalized silica particles (8 μm and 700 nm diameter) were purchased from Corpuscular. Inc. Styrene, anhydrous DVB, and AA were all distilled under reduced pressure. KPS was used without further purification.

4.4.2 Methodology

4.4.2.1 Polystyrene-poly(acrylic acid) (PS-PAA) Core:shell Nanoparticles (NP)

Synthesis

The polystyrene-poly(acrylic acid) core:shell nanoparticles (PS-PAA NPs) were synthesized by surfactant-free emulsion polymerization with KPS as the initiator.⁴⁵ Two independent syntheses were carried out, giving rise to different core:shell molar ratios of 75:25 (PAA-25%) and 20:80 (PAA-80%). For PAA-25% (PAA-80%), 3.25 g (4.17 g) of styrene, 0.16 g of DVB, and 0.45 g (0.29 g) of AA were dissolved in 200 mL of Milli-Q water in a 500 mL three-necked flask equipped with a reflux condenser. The system was degassed with nitrogen for 30 min while being mechanically stirred at a speed of 350 rpm.

Chapitre 4

1.35 g (1.08 g) of the initiator was then added with 20 mL of water, and the flask was heated to 70 °C in an oil bath. After 2 hours of heating, 6.31 g (11.24 g) of AA in 30 mL of water was added directly for PAA-25% and drop by drop for PAA-80%. The temperature and the stirring were maintained for 22 h. The water-particle mixture was centrifuged, and the resulting precipitate was dispersed in Milli-Q water. The centrifugation procedure was repeated three times, followed by dialysis against distilled water for 1 week at room temperature in a cellulose sack (M_w cutoff at 3200 Da) from Fisher Scientific.

4.4.2.2 Size and Zeta Potential of Dispersed PS-PAA NPs

The hydrodynamic diameter and zeta potential of the dispersed NPs in Milli-Q water ($0.04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) were determined using a Malvern dynamic light scattering (DLS)-Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instrument Ltd., Malvern, Worcestershire, U.K.) at 25 °C in backscattering mode. The pH of the NP dispersion was adjusted from 1 to 12 with HCl or NaOH. Mean values of triplicates were determined and are reported in the Results and Discussion section.

4.4.2.3 Structured Surfaces

All surface manipulations were performed in a clean laminar airflow cabinet in order to prevent dust deposition on the surfaces. All glassware was carefully cleaned in a bath of KOH-saturated isopropyl alcohol and then rinsed intensively with Milli-Q water and ethanol.

Surface Activation of Mica Substrates

Plasma Prep II from SPI Supplies was used to activate freshly cleaved mica surfaces. Water/argon plasma activation was used to generate silanol groups on the mica surfaces as previously reported.⁴⁶ Briefly, freshly cleaved mica surfaces were placed in a plasma chamber under a vacuum pressure of 0.5 mTorr. Argon and water vapor were then introduced at partial pressures of 80 and 300 mTorr, respectively. Plasma activation was performed for 5 min at 40 W, and then mica surfaces were left in the plasma chamber under

vacuum (0.5 mTorr) for an additional 5 min. The mica surfaces were removed from the chamber and immediately used for grafting procedures.

Amino-Functionalized Mica Substrates

Aminoalkylsilane monolayers were grafted to mica surfaces using self-adsorption from solution. A solution of 1 mM AUTES was prepared in absolute ethanol and stirred for 30 min. After the agitation was stopped, mica substrates were immersed in the AUTES solution for 20 min. The resulting AUTES SAMs were thoroughly rinsed with anhydrous ethanol. The AUTES grafting was completed by annealing the substrates for 30 min at 120 °C under atmospheric pressure.

PAA-Functionalized Mica Substrates

A layer of PAA was covalently grafted to amino-functionalized mica substrates via self-adsorption from solution. An aqueous solution of 0.1% w/w PAA ($M_v = 1\,250\,000$ g/mol) was prepared with Milli-Q water at room temperature. After solubilization of PAA, the coupling agents (5 mM EDC and 5 mM NHS) were added to the PAA solution and stirred for 30 min prior to AUTES SAM immersion. After 3 hours of immersion, the substrates were removed and thoroughly rinsed with Milli-Q water prior to particle deposition.

Particle Deposition on Functionalized Mica Substrates

Soft nanodomed structured surfaces were generated by immobilizing the core-shell NPs onto the amino-functionalized mica substrates via covalent bonds (chemisorption) or molecular interactions (physisorption). PAA-25% and PAA-80% were chemisorbed through peptidic coupling with the amino-functionalized mica substrates. NP aqueous dispersions of 0.1 and 0.3% w/w were prepared for the deposition of PAA-80% and PAA-25%, respectively. Coupling agents (2 mM EDC and 5 mM NHS) were added to the NP dispersions and stirred for 30 min. Then, the amino-functionalized mica substrates were immersed in the NP dispersions for various immersion times (from 5 min to 20 h). The resulting self-assembled NP layers were thoroughly rinsed with Milli-Q water and dried

under nitrogen. PAA-80% NPs were also physisorbed onto amino-functionalized mica substrates through electrostatic interactions by immersing the amino-functionalized mica substrates in a 0.3% w/w PAA-80% aqueous dispersion without coupling agents.

Hard nanodomed structured surfaces were generated by immobilizing amino-functionalized silica particles on PAA-functionalized mica substrates via self-adsorption from solution. Two different particle sizes were investigated: 8 μm and 700 nm diameter, hereafter referred to as Si-8 and Si-07, respectively. Si-8 was chemisorbed through peptidic coupling with a PAA-coated surface by immersing the surface for 3 hours in a Si-8 suspension (0.1% w/w) containing NHS and EDC (5 mM/5 mM) at pH 7 or containing TEA (100 mM) at pH 10. Si-8 was also physisorbed through electrostatic interactions, from immersion in a Si-8 suspension (0.1% w/w), onto a PAA-coated surface previously rinsed in an aqueous solution of NaOH (pH 10) to remove any residual NHS. Si-07 particles were chemisorbed to a PAA-coated surface by immersing the surface for 3 hours in a Si-07 suspension (0.1% w/w) containing TEA (100 mM) at pH 10.

4.4.2.4 Surface Characterization

Atomic Force Microscopy (AFM)

Immobilized nanosized particles (PAA-80%, PAA-25%, and Si-07) were visualized using AFM imaging with a Multimode microscope equipped with a Nanoscope V extend controller (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) at room temperature and in ambient air. The surfaces were imaged in tapping mode using a silicon cantilevered tip from AppNano with a resonance frequency of 200-400 kHz and a spring constant of ca. 75 N/m. AFM images were treated and analyzed using Nanoscope Analysis (version 1.4) software. The surface density of immobilized NPs was determined using the bearing analysis mode of the Nanoscope Analysis software and averaged over different surface areas of 30 μm \times 30 μm scan size. The average height of the NP layers was measured by using a cross-section analysis of the AFM images on three different areas of 30 μm \times 30 μm and 5 μm \times 5 μm for the soft NPs and hard Si-07 particles, respectively. The average height of surface asperities corresponds to the average distance between the maximum height of the particles and the functionalized substrate. All of the AFM topography images presented

in the Results and Discussion section are representative of a minimum of three different analyzed areas for a given substrate.

Optical Microscopy

Optical microscopy using an Olympus microscope in transmission mode at room temperature and in ambient air was used to image immobilized micrometer-sized particles, Si-07 and Si-8.

Surface Forces Measurements

Normal Interactions. Measurements of normal interaction forces, F_N , between two surfaces bearing particles as a function of the surface separation distance were determined using a surface forces apparatus (SFA), which is well described in the literature.^{47, 48} In brief, back-silvered molecularly smooth mica surfaces were glued onto two cylindrically curved silica lenses of radius $R=2$ cm using an optical adhesive (Norland 81 UV cured glue, U.K.). The force–distance profiles between the surfaces were obtained by changing the position of the lower surface stepwise using a nanopositioner and measuring the actual variation in the separation distance between the surfaces with subnanometric resolution using an interferometry technique that uses Fringes of Equal Chromatic Orders (FECO).⁴⁷ The force between the two surfaces was determined according to Hooke's law, $F = k \Delta D$, where k is the spring constant supporting the lower surface (1700 N/m) and Δx is the difference between the change in displacement applied by the nanopositioner and the displacement change measured by interferometry. The two disks were mounted in the SFA chamber in cross cylinder geometry and brought into mica adhesive contact in air in order to determine the reference separation distance ($D = 0$). Afterward, the cylindrical disks were dismantled from the SFA chamber under a laminar-flow cabinet for the substrate functionalization and mounted back in the SFA chamber at the same previous position. For the force profiles measured across water, a droplet of water at a given pH was deposited between the two apposing surfaces 2 hours before the force measurements. pH buffers were prepared from Trizma base buffer solution (0.1 M) in Milli-Q water and the pH was adjusted using HCl solution. The pH was measured with a Symphony SB20 pH meter with

an Ag/AgCl electrode. The force profiles were measured on approaching and separating the surfaces to assess the reversibility and robustness of the grafting. Each reported separation distance was measured at equilibrium, which was arbitrarily set for a distance variation of less than 0.3 nm/min. Each force profile was reproduced on two different pairs of mica substrates and on three different areas of a given pair. The maximal applied pressure was calculated from the maximal normal force and the apparent area of contact between the two surfaces. The diameter of the contact area was determined from the flattened part of the FECO fringes.

Friction Measurements. The lateral (or friction) force was measured by displacing the upper surface horizontally using a motor-driven sliding device. The upper surface was connected to a vertical cantilever spring whose lateral deflection, allowing the friction forces to be determined, was measured using strain gauges. The resolution in measuring the friction force was on the order of 10^{-3} mN. The normal force (or applied load) F_N can be simultaneously controlled using the nanopositioner for vertical displacement.

4.5 Results and Discussion

4.5.1 Soft Nanodomed Surfaces

4.5.1.1 Characterization of NP Suspension

Prior to surface immobilization, the zeta potential and the size of the NPs dispersed in water were investigated. Both PAA-25% and PAA-80% dispersions exhibited a relatively narrow size distribution with a polydispersity index (PDI) of 0.20 ± 0.05 (**Figure 4.S.1**). The NPs (PAA-25% and PAA-80%) remained negatively charged above pH 3 and aggregated at lower pH (**Figure 4.1**). The major change in the zeta potential is observed at around pH 5 (**Figure 4.1**), which coincides with the pK_a of acrylic acid (ca. 4.26).⁴⁹ The increase in zeta potential with increasing pH from 3 to 10 was significant and larger for PAA-25% (230%) than for PAA-80% (160%) (**Figure 4.1**). For both dispersions, the hydrodynamic diameter increased with increasing pH as a result of the ionization-induced swelling of the PAA shell, as supported by the increase in the zeta potential (**Figure 4.1**). Such swelling behavior has also been reported for similar PS-PAA core-shell NPs.^{45, 50} The protonation of the PAA shell at lower pH values facilitates the physical cross-linking of the

PAA shell through hydrogen bonding between the carboxylic groups. However, the size increase between pH 3 and 10 was larger for PAA-80% (190%) than for PAA-25% (130%) even though they exhibited a smaller change in zeta potential (**Figure 4.1**). This can be explained by the variation in the PAA shell density upon changes in particle size. As the particles swell, the surface density of charges is expected to decrease for a given degree of ionization (increase in volume associated with a decrease in monomer density). Because the swelling is more significant with PAA-80%, the increase in PAA ionization with pH is associated with a more important decrease in effective surface charge density, giving rise to a smaller change in zeta potential compared to that for PAA-25%. The larger swelling of PAA-80% is also associated with a smaller elasticity of PAA-80%, compared to that for PAA-25%, allowing a more important polymer chain extension. This is supported by the large deformation of PAA-80% onto the substrates, as will be demonstrated hereafter.

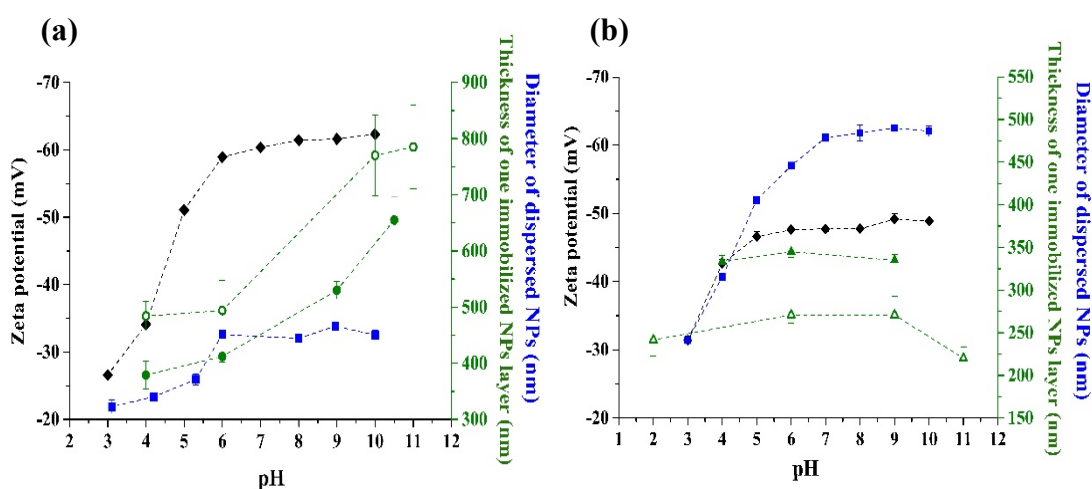


Figure 4.1 : Surface potential (black \blacklozenge) and size of dispersed (blue \blacksquare) and chemisorbed soft NPs (0.8 PAA-25% NPs $\pm 0.2 / \mu\text{m}^2$, green \circ ; 1.0 PAA-25% NPs $\pm 0.1 / \mu\text{m}^2$, green \bullet ; 1.7 ± 0.4 PAA-80% NPs/ μm^2 , green \triangle ; 26 ± 2 PAA-80% NPs/ μm^2 , green \blacktriangle) as a function of pH for PAA-25% (a) and PAA-80% (b). The thickness of immobilized NPs is determined by surface forces measurements and is assumed to be the half distance marking the onset of repulsive forces between two NP layers. Dashed lines are guides to the eyes. Each data point represents the average of three measurements, and the error bars represent the standard deviation of the mean.

4.5.1.2 Surface Characterization

The NP attachment to the highly dense amino-functionalized mica substrates is expected to occur through multiple amide bonds because of the deformability of the elastic

PAA shell as previously reported.⁵¹ The chemisorbed PS-PAA NPs have previously been shown to be hydrolytically stable over 1 week of immersion in aqueous solution for pH ranging from 2 to 10.⁵¹ These amide bonds provided enough robustness to prevent the desorption of NPs during normal and lateral force measurements, as will be shown hereafter. Tuning the NP concentration of the immersed dispersion and the immersion time was used to control the surface coverage (**Figure 4.S.2**).

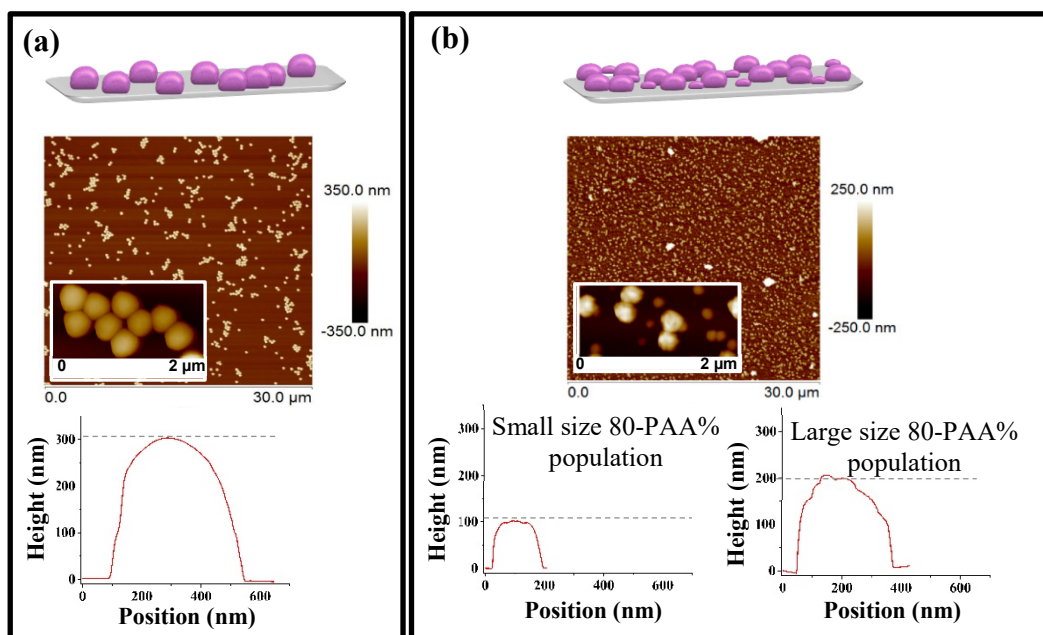


Figure 4.2 : Surface topography of immobilized (chemisorbed) soft NPs. AFM images in air, cross section analysis and schematic representation of immobilized PAA-25% (**a**) and PAA-80% (**b**). Soft NPs were immobilized from a NP suspension at pH 6 and for an immersion time of 20 h.

The surface distribution of immobilized PAA-25% appears to be homogeneous on a large scale ($30\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m}$), but the presence of PAA-25% clusters is observed on a smaller scale for all investigated conditions (**Figure 4.2a**). According to DLS measurements, no aggregation of PAA-25% in suspension was evidenced (**Figure 4.1a**). Surface clusters could result from partial charge neutralization of the PAA shell by the positively charged amino-functionalized surfaces upon particle grafting. The NP surface density was 0.6 and $2.5\ \text{NPs}/\mu\text{m}^2$ when prepared from 20 hours of immersion in NP dispersions of 0.1 and 0.3% w/w, respectively (**Figure 4.S.2**). In the dry state, the measured average height of the immobilized PAA-25% is $300 \pm 10\ \text{nm}$, (**Figure 4.2a**) regardless of the grafting density (data not shown). This value is consistent with the hydrodynamic

diameter of the expected collapsed PAA-25% NPs measured in water at pH 3 (**Figure 4.1a**). The surface coverage of PAA-80% appears to be homogeneous on large and small scales (**Figure 4.2b**) for both physisorbed and chemisorbed NPs. The surface coverage of covalently attached PAA-80% was significantly larger than that for PAA-25% (**Figure 4.S.2**) for similar immersion time and NP concentration, suggesting faster grafting kinetics for PAA-80%. Moreover, the range in which the surface coverage could be tuned for both PAA-25% and PAA-80% NPs is significantly different. Large PAA-25% coverages, such as these observed with PAA-80%, could not be obtained, and low PAA-80% coverages were not observed even for very short immersion time. The reason for such differences in the surface coverage and grafting kinetics is not clear but might be due to the difference in particle surface potential (10 mV at pH 6, corresponding to the grafting conditions, **Figure 4.1**) and/or in the size (**Figure 4.2**) of the immobilized particles. The smaller surface potential of PAA-80% compared to that of PAA-25% could explain the larger surface coverage with PAA-80% as the electrostatic repulsions between adjacent particles are expected to be weaker. In addition, AFM imaging in air reveals a bimodal size distribution for the immobilized PAA-80%, as evidenced by small and large NP populations that were characterized by different aspect ratios (height/NP diameter) of $(100 \pm 5 \text{ nm})/(175 \pm 10 \text{ nm})$ and $(210 \pm 20 \text{ nm})/(350 \pm 50 \text{ nm})$, respectively (**Figure 4.2b**). Both populations are spherical, and the small particles are relatively well dispersed whereas the larger ones form dimers (**Figure 4.2**). The presence of these two populations was observed regardless of the NP concentration (**Figure 4.S.2**), the immersion time (**Figures 4.S.2e and 4.S.3c**), and the immobilization method (**Figure 4.3c**). Both populations most probably arise for the different synthesis procedures used for PAA-25% and PAA-80% preparation. The fact that the smallest population was not detected by DLS in the PAA-80% suspension (**Figure 4.1b**) is most probably due to its low concentration. Nevertheless, the results (DLS and AFM images) suggest a favorable adsorption of the smaller particles. Small particles would favor faster grafting kinetics, observed with PAA-80%, and also disfavor aggregation.

4.5.1.3 Normal Forces

The normal interaction forces between two apposing soft nanodomed surfaces as a function of separation distance were measured over a wide range of pH ($2 < \text{pH} < 11$) for

different NP surface coverages. The force profiles measured between the chemisorbed NP layers were purely repulsive (**Figure 4.3**) and showed low hysteresis for all investigated pH values (**Figure 4.S.3**). The physisorbed PAA-80% was less robustly anchored compared to the chemisorbed species because significant hysteresis between surface approach and separation was observed, particularly in acidic media (**Figure 4.S.3**). At $\text{pH} \leq 4$, the physisorbed PAA-80% NPs quickly desorbed (within 1 h) and aggregated on the surfaces, breaking the 2D structures as evidenced by a significant increase in the range of the repulsive forces (**Figure 4.S.3**) and by the presence of irregularities in the FECO fringes (data not shown). Particle detachment is most probably caused by the expected decrease in the electrostatic interactions between the NPs and the amino-functionalized mica substrates as the pH decreases. Because of to this possible NP detachment, only the force profiles measured during the first approach are presented in the Results and Discussion section for reliable comparison.

Long-range exponentially decreasing electrostatic repulsions were expected between the NP layers, as a result of the surface charge carried by the particles (**Figure 4.1**) but could not be measured for both PAA-25%- and PAA-80%-covered surfaces and for all investigated pH values (**Figure 4.3**). This results from the resolution in measuring the normal forces and more particularly in measuring large separation distances such as those resulting from the relatively large immobilized particles. Even though the range of electrostatic interactions is expected to be large in Milli-Q water (1 μm), the magnitude of interactions between two particle arrays with a large surface potential (≈ 100 mV) would be, at close separation distances, on the order of mN/m, which corresponds to the experimental resolution in measuring the forces (**Figure 4.3**). Because no clear long-ranged electrostatic repulsions could be identified, the onset of interaction forces (distance at which the interactions become larger than the experimental resolution set as $F/R = 1$ mN/m) upon surface approach was assumed to correspond to the physical contact between two nondeformed apposing supported NP layers. Therefore, the thickness of the swollen immobilized particle layers in water was assumed to correspond to half the onset of the repulsive forces. This distance is of the same order of magnitude as the size of suspended particles in water (**Figure 4.1**) but larger than the height of the immobilized NPs observed

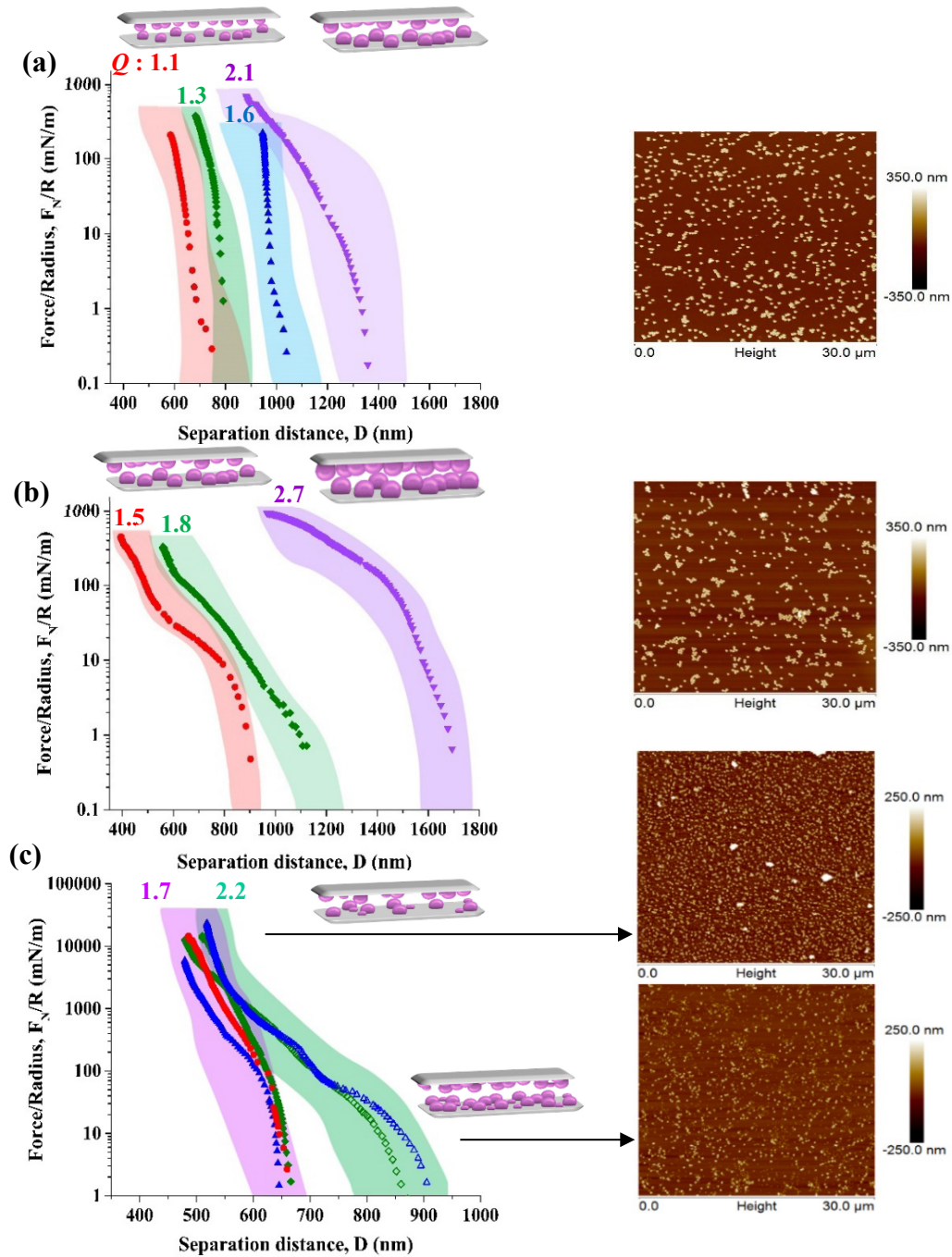


Figure 4.3 : Force profile, measured on the first compression between two identical soft NP layers across water at different pH levels of 4 (red ●), 6 (green ◆), 9 (blue ▲) and 10 (purple ▼) and AFM images in air of a reference surface used in SFA measurements prior to any experiment. The layers were made of chemisorbed PAA-25%, 1.0 ± 0.1 NPs/ μm^2 (a), chemisorbed PAA-25%, 0.8 ± 0.2 NPs/ μm^2 (b), and chemisorbed PAA-80%, 26 ± 2 NPs/ μm^2 (filled symbols) and physisorbed PAA-80%, 7 ± 0.3 NPs/ μm^2 (open symbols) (c). The shaded areas represent the variability in the measured force profiles, and the most representative profiles are illustrated. Q corresponds to the swelling ratio calculated using Eq. 4.1.

in the dry state using AFM imaging (ca. 310 nm, **Figure 4.2a**). For PAA-25%, an increase in pH led to an increase in the onset distance (**Figure 4.3a, b**), as expected by the swelling of the PAA shell. To compare the pH-swelling response of the different layers, a swelling ratio (Q) was arbitrarily calculated according to the following equation

$$Q = (0.5 T)/h \quad (4.1)$$

where T is the onset distance of repulsive forces between two NP layers in aqueous media at a given pH and h is the average height of the NP layers determined from AFM images in air. The Q values are given in **Figure 3**. For the bimodal NP distribution of the immobilized PAA-80%, h of the largest NPs was used for the determination of Q.

The increase in Q with pH confirms that the immobilized PAA-25% maintains its pH-responsiveness. Despite the fact that the difference between the two investigated surface densities for PAA-25% is small (0.8 and 1.0 NP/ μm^2), the swelling ratio of 0.8 PAA-25%/ μm^2 is larger than that of 1.0 PAA-25%/ μm^2 for all investigated pH values. This difference in the swelling response cannot be attributed to the small change in the surface coverage but most probably results from variations in the surface distribution of NPs, as will be discussed hereafter. The pH-dependent response is more pronounced for the immobilized than the dispersed PAA-25% NPs (**Figure 4.1a**). An increase of $160 \pm 10 \%$ in the thickness of immobilized particles between pH 4 and 10 was observed whereas the increase in the hydrodynamic diameter of the dispersed particles was $130 \pm 5 \%$ (**Figure 4.1a**). This might result from the patches of closely packed grafted PAA-25% NPs as shown in **Figure 4.2a**. The lateral compression of neighboring particles can result in an anisotropic (vertical) swelling, which would explain the more important change in thickness compared to isotropic swelling in an aqueous dispersion. Similar anisotropic swelling has been reported for immobilized hydrogel NPs at a large surface coverage.⁵² In addition, a basic shift in the pH-dependent swelling response is observed for the immobilized PAA-25% (**Figure 4.1a**) compared to that for the dispersed PAA-25% NPs, which may be caused by a local pH variation at the NP/water interface. Indeed, such basic shifts have previously been observed experimentally and theoretically for the swelling response of weakly charged polymer brushes grafted on substrates.⁵³ This study reported a more acidic interfacial pH (of 1 to 2 units), which was attributed to a larger proton concentration at the polymer/water interface due to the ionization of the brush.

The pH response of the chemisorbed PAA-80% highly contrasts with that observed for the chemisorbed PAA-25% (**Figure 4.3**). Even though an increase in the degree of ionization of the soft NPs with pH was observed (**Figure 4.S.4**), no significant change in the chemisorbed PAA-80% layer thickness could be measured between pH 4 and 9, and a constant Q of 1.7 was determined (**Figure 4.3c**). The swelling of the chemisorbed PAA-80% layer was independent of the NP grafting density, as the swelling ratio observed for low and high surface coverages were not significantly different ($Q= 1.4$ for $3.7 \text{ NP}/\mu\text{m}^2$ and $Q= 1.7$ for $26 \pm 2 \text{ NP}/\mu\text{m}^2$, **Figures 4.S.3c and 4.3c**). The absence of pH-responsive swelling is explained by the flattening of the NPs on the surface upon immobilization. This is expected to reduce the swelling capacity of the particles because they have to deform (stretch) to adopt a flattened conformation. The more significant flattening of PAA-80% compared to that of PAA-25% is attributed to their larger swellability in the dispersed state (**Figure 4.1b**), which is usually associated with a lower elasticity.⁵⁴ The nature of the NP anchorage to the surface also influenced the NP flattening and, consequently, the swelling response. In fact, the thickness of the PAA-80% NP layer is larger for the physisorbed ($>850 \text{ nm}$, **Figure 4.3c**) than for the chemisorbed ones (650 nm , **Figure 4.3c**), suggesting that covalent attachment induced a larger deformation (flattening) and therefore reduced the swellability of the immobilized particles. A similar influence of surface interactions on the flattening and swelling responses has been observed for adsorbed pH-responsive polymer micelles.⁵⁵ Flattening of the micelles, caused by an increase in the attractive micelles/substrate interactions, has been shown to result in an absence of pH response of the adsorbed layer.

4.5.1.4 Friction Forces

Sliding friction forces (F_S) between two similar NP layers as a function of applied load (F_N) were measured in the steady-state regime at a constant sliding velocity of $1.6 \mu\text{m/s}$ for various pH values. Typical friction traces are illustrated in **Figure 4.4d**. The friction behaviors of the PAA-25% and PAA-80% layers are similar and exhibit smooth sliding friction forces regardless of the load, pH, grafting density, and immobilization method. In most cases, the friction behavior follows Amontons' law, i.e., $F_S = \mu \times F_N$ where μ is the friction coefficient, as also often observed with polymer-coated substrates.^{28, 43, 56,}

⁵⁷ However, for large Q values (>2.5), as for PAA-25% at $0.8 \text{ particle}/\mu\text{m}^2$, F_S increases asymptotically with F_N with a very low effective friction coefficient in the large load regime (**Figure 4.4a**). The immobilized PAA-25% NPs exhibit a significant decrease in the friction coefficient with increasing pH or increased swelling (**Figures. 4.4c and 4.5b**). For example, the friction coefficient between two PAA-25% layers decreased by 1 order of

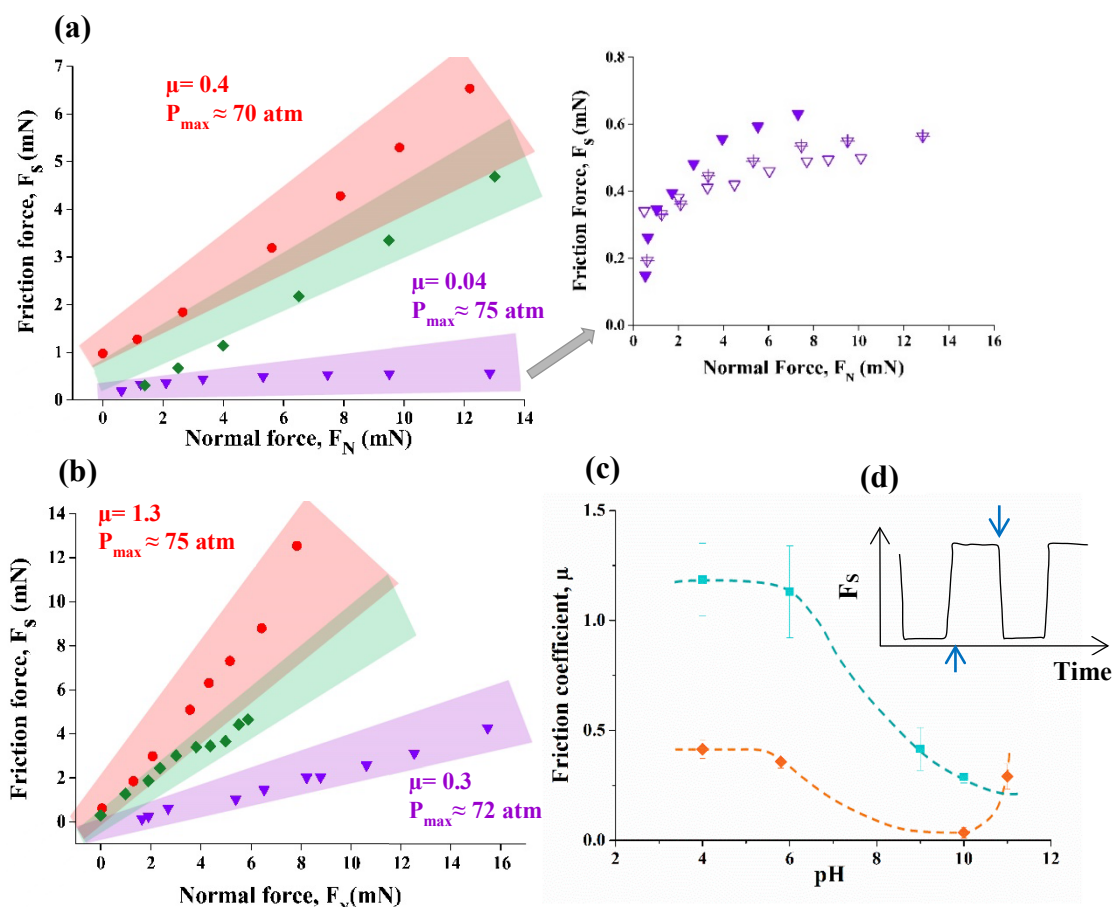


Figure 4.4 : Friction behavior of soft NP layers for a sliding velocity of $1.6 \mu\text{m/s}$. Friction force, F_S , as a function of the normal force, F_N , between two identical apposing layers of chemisorbed PAA-25% at $0.8 \text{ NPs} \pm 0.2$ (a) and $1.0 \pm 0.1 \text{ NPs}/\mu\text{m}^2$ (b) across water at pH 4 (red \bullet), 6 (green \blacklozenge), 9 (blue \blacktriangle) and 10 (purple \blacktriangledown). Inset graphic: close-up of friction traces of chemisorbed PAA-25% at $0.8 \text{ NPs} \pm 0.2$ at pH 10. (c) Friction coefficient (μ) as a function of pH between two apposing particle layers of chemisorbed PAA-25%, $1.0 \pm 0.1 \text{ NPs}/\mu\text{m}^2$ (cyan \blacksquare) and $0.8 \pm 0.2 \text{ NPs}/\mu\text{m}^2$ (orange \blacklozenge) (d). Typical friction traces of immobilized soft particles, with arrows illustrating the time at which the sliding direction was reversed. Dashed lines are guides for the eyes. Error bars correspond to the standard deviation of the measured friction coefficient at three different positions for one pair of samples. The shaded areas represent the variability in the measured F_S , and the most representative data are illustrated.

magnitude between pH 4 and 10 (**Figure 4.4a, b**), which is associated with a 2-fold increase in Q (**Figure 4.3a,b**). Such a significant decrease in the friction coefficient with polymer swelling has also been reported for surface-grafted responsive polymer brushes when going from collapsed (or nonperturbed) to swollen states,^{3, 43, 57} which is generally attributed to increasing osmotic pressure decreasing the mutual interpenetration between two apposing polymers layers and helping to keep the sliding countersurfaces separated.³ However, at high pH (≥ 11), an important change in particle morphology was observed (**Figure 4.S.6**), and the friction behavior deviates from this general trend (**Figure 4.4c**). The NPs appeared more flattened and were surrounded by an areola prior to friction but after being immersed in water of pH 11 compared to immersion in lower-pH water (**Figure 4.S.6c**).

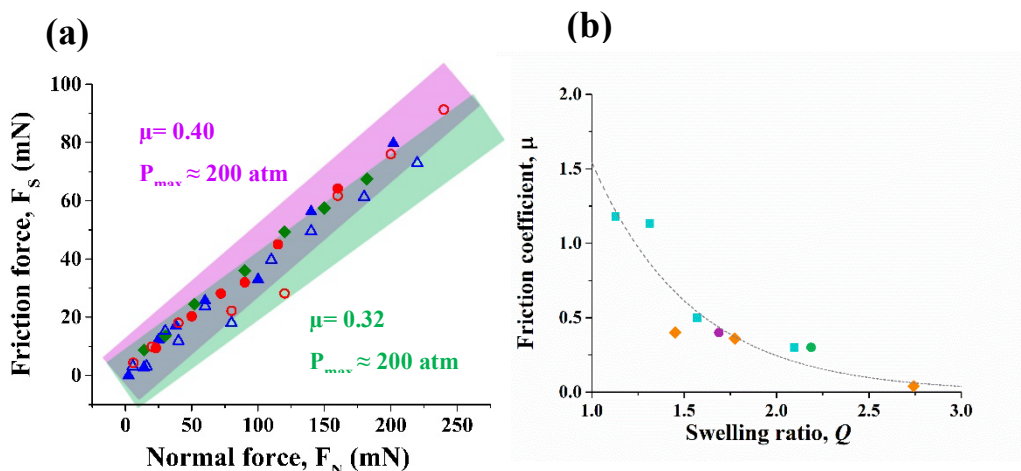


Figure 4.5 : Friction behavior of soft NP layers for a sliding velocity of $1.6 \mu\text{m/s}$. **(a)** Friction force, F_s , as a function of the normal force, F_N , between two identical apposing layers of chemisorbed PAA-80%, 26 ± 2 NPs/ μm^2 (filled symbols) and physisorbed PAA-80%, 7 ± 0.3 NPs/ μm^2 (open symbols) across water at pH 4 (red ●), 6 (green ◆) and 9 (blue ▲). **(b)** Friction coefficient (μ) as a function of swelling ratio (Q) between two apposing particle layers of chemisorbed PAA-25%, 1.0 ± 0.1 NPs / μm^2 (cyan ■) and 0.8 ± 0.2 NPs/ μm^2 (orange ◆), chemisorbed PAA-80%, 26 ± 2 NPs/ μm^2 (pink ●), and physisorbed PAA-80%, 7 ± 0.3 NPs/ μm^2 (green ●). Error bars correspond to the standard deviation of the measured friction coefficient at three different positions for one pair of samples. The shaded areas represent the variability in the measured F_s , and the most representative data are illustrated.

The lack of variation in Q with pH for the chemisorbed PAA-80% NPs (**Figure 4.3c**), despite the variation in their surface potential (**Figure 4.S.4**), resulted in pH-insensitive friction behavior (**Figure 4.5a**). However, the small difference in Q observed

between physisorbed (2.2) and chemisorbed PAA-80% (1.7) (**Figure 4.3c**) is associated with a small change in the friction coefficient, i.e., from 0.32 to 0.40 (**Figure 4.5a**). The correlation between Q and the friction coefficient for immobilized PAA-80% is similar to that observed with PAA-25% (**Figure 4.5b**). Indeed, a clear correlation between Q and the friction coefficient is observed regardless of the NPs, grafting density, and immobilization method (**Figure 4.5b**). This highlights the more significant impact of NP swelling on their tribological behavior compared to the change in the degree of ionization or surface density of the particles. Even though a correlation between the friction coefficient and Q is evidenced, the mechanism by which swelling controls the friction behavior under applied load remains unclear. The water retention and load-bearing capacities of polymer coatings play an important role in determining the maximum pressure that surfaces can sustain. Pressure has a significant effect on the lubricity of surface-grafted polymers and results from a combination of the surface asperities, substrate elasticity, and externally applied load. The substrate elasticity, closely related to the swelling of the polymer coating, is known to affect the energy dissipation during sliding.⁵⁸ To see whether NP elasticity played a role in controlling friction in the low compression regime, an arbitrary value of the elasticity of the NP layers (E) was estimated from the slope of the force profiles measured in the low load regime (<10 mN/m) :

$$E = \frac{\Delta \left(\frac{F_N}{R} \right)}{\Delta D} \quad (4.2)$$

An increase in Q is associated with a decrease in elasticity as expected and depicted in **Figure 4.6a** whereas the friction coefficient, μ , increases with the elasticity, E (**Figure 4.6b**).⁵⁸ These results correlate well with a previous study reporting an increase in the friction coefficient with an increase in elasticity of immobilized temperature-sensitive NPs.³¹ However, in our study, the change in elasticity is associated with changes in the degree of ionization rather than changes in temperature. The presence of charges on the polymer chains is known to prevent mutual interpenetration between two apposing polyelectrolytes layers.⁵⁹ Therefore, the electrosteric repulsions between the NP layers, the decrease in elasticity and the increase in chain hydration upon swelling ensuring water retention at the polymer/polymer interface all favor a decrease in friction (**Figure 4.5b**).

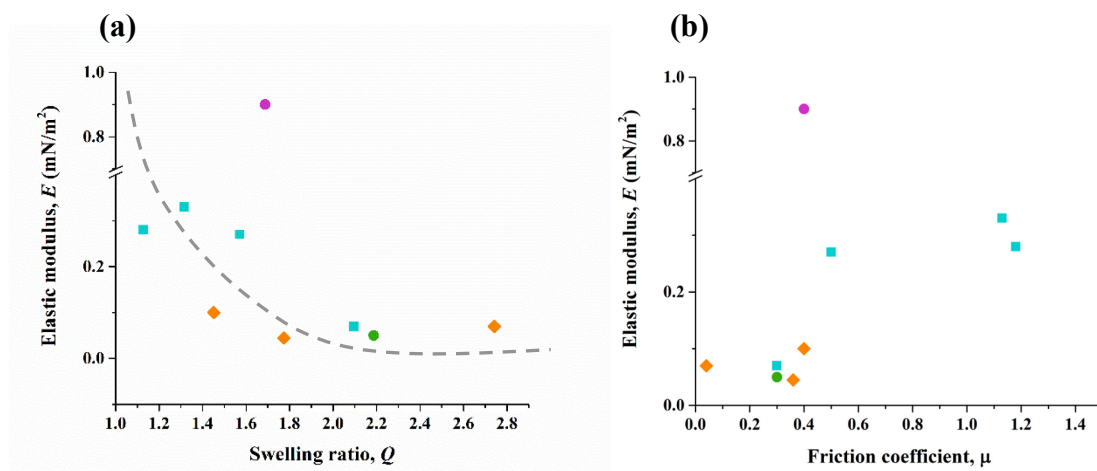


Figure 4.6 : Effect of elasticity on the behavior of soft NPs. **(a)** Elastic modulus (E), determined from Eq. 4.2 as a function of the swelling ratio (Q) determined from Eq. 4.1 and **(b)** friction coefficient (μ) as a function of the elastic modulus between two identical apposing soft NP layers made of chemisorbed PAA-25%, 1.0 ± 0.1 NPs/ μm^2 (cyan \blacksquare) or 0.8 ± 0.2 NPs/ μm^2 (orange \blacklozenge), chemisorbed PAA-80%, 26 ± 2 NPs/ μm^2 (pink \bullet), and physisorbed PAA-80%, 7 ± 0.3 NPs/ μm^2 (green \bullet). Dashed lines are guides for the eyes.

The load-bearing capability of both PAA-25% and PAA-80% layers appears to be significantly larger than that reported for most polymer coatings. For instance, the maximum pressure that a physisorbed polymer brush coating can sustain without being damaged and/or expelled from the surfaces is under few atm.^{3, 20, 23} A larger loading capability (up to 40 atm) was reported for irreversibly attached polyelectrolyte brushes but was also associated with a larger friction coefficient ($\mu = 0.3$).²⁷ The maximum pressures that could be applied to the PAA-25% and PAA-80% layers without any significant damage or NP degrafting, as evidenced from the position and shape of the FECO fringes (**Figure 4.S.5**) and from AFM imaging (**Figure 4.S.6a**), were 75 and 200 atm, respectively. These values were limited by the force-measuring spring, suggesting that the soft 2D arrays could support even higher pressure. The improved lubrication and load-bearing capacity of 2D soft NP arrays most probably arise from the physically cross-linked networks of the PAA shell together with the discontinuity of the structure, i.e. discrete particles. It has been shown that covalently cross-linking thin polymer coatings (brushes or nonstructured layers) can significantly improve the load-bearing capacity and reduce wear but only for limited sliding amplitudes.^{19, 24} This is explained by the deformation capacity of the

covalently cross-linked polymer layers that is limited as a consequence of the permanent continuous network nature; therefore, crack propagation and irreversible damage can occur over large sliding amplitudes.¹⁹ The reversible physically cross-linked PAA shells and the discontinuous nature of the colloidal arrays seem to offer a much better default tolerance and to minimize energy dissipation, allowing much larger loads and sliding amplitudes to be sustained with low friction and no wear. However, slight changes in the particle morphology during sliding under high applied loads were observed as evidenced by AFM imaging after friction experiments (**Figure 4.S.6**) and are supported by the change in the closest separation distance (ca. 15% decrease, **Figure 4.S.7a**). This morphology change is different from that observed after simple immersion in an extremely basic pH solution (pH 11, **Figure 4.S.6b**), suggesting that the sliding under such large pressure perturbed the surface morphology of the particles.

4.5.2 Hard Domed Structured Surfaces

4.5.2.1 Surface Characterization

The immersion of negatively charged mica substrates into a Si-8 (8 μm diameter) dispersion did not result in any particle immobilization (**Figure 4.S.8d**). However, the immobilization of Si-8 was possible on a surface-immobilized layer of PAA because the particles can deform the soft polymer layer, providing a maximum number of attachment points per particle. The attachment of Si-8 to the PAA layer was achieved by electrostatic interactions and/or covalent bonds. The covalent attachment of Si-8 was done using two different procedures. The first one used an aqueous NHS/EDC solution ensuring chemical bonds between the NH_2 groups of Si-8 and the COOH groups of the PAA layer. The second one used an aqueous solution containing TEA and might result in a combination of physisorbed and chemisorbed particles. In fact, the PAA layer, used as substrate for immobilizing Si-8, was chemically attached to the amino-functionalized mica substrates using NHS/EDC coupling agents (see Methodology). This step might have left some residual NHS groups on the PAA, which could react with the NH_2 groups on the Si-8 surface. However, NHS-ester group hydrolysis is known to be very fast in solution⁶⁰ and at the surface,^{61, 62} especially under basic conditions. Nevertheless, the hydrolysis of the ester group can compete with the amidization process that leads to the the immobilization

of Si-8. The force profiles and the tribological behavior of Si-8 particles immobilized using both methods (using NHS/EDC coupling agent and TEA) were similar, as described hereafter, suggesting a similar strength of particle attachment. Therefore, both immobilizing procedures were assumed to lead to chemisorbed particles. All immobilization methods used to physisorb or chemisorb Si-8 gave rise to similar surface coverage under similar immobilization conditions, i.e., similar immersion time and particle concentration (**Figure 4.S.8**). The Si-8 surface density varied with the particle concentration but not with the immersion time (data not shown). On another hand, the surface coverage of immobilized Si-07 could be easily tuned by controlling the immersion time during self-assembly, enabling full coverage to be reached, which was not possible with Si-8 (**Figure 4.7**). Chemisorbed and physisorbed Si-8 were hydrolytically stable and resisted detachment under extreme pH conditions (pH 2 and pH 10), high salt concentration (10 M), and the presence of detergent (20% w/w Triton X100) for more than 24 hours under stirring (data not shown). The extreme robustness specially observed for the physisorbed NPs can come from the difficulty of the ions penetrating the meniscus between the particle and the substrate failing to decrease the electrostatic interactions.

4.5.2.2 Normal Forces

As a reference, the force profile between two apposing surface-immobilized layers of PAA across water was measured and is illustrated in **Figure 4.S.9**. It exhibits long-range exponentially decaying electrostatic repulsions as well as short-range steric repulsions. After the immobilization of Si-8, the forces measured between two apposing chemisorbed or physisorbed Si-8 layers of comparable surface density were similar. (**Figure 4.7a**). Even though the Si-8 particles are expected to be positively charged in water because of the presence of surface amino groups, no long-range exponentially decaying electrostatic repulsions were observed (**Figure 4.7a**). This is explained by the resolution in measuring the normal forces and the separation distance as previously explained for the soft particles. On the very first approach, the apposing Si-8 layers exhibit steric repulsions at large separation distances of ca. 18 μm , corresponding to about twice the size of the Si-8 particles (**Figure 4.7a**). On decreasing the separation distance for this first approach, at ca. 10 μm , a discontinuity in the force profile was observed (**Figure 4.7a**). Such a discontinuity, which

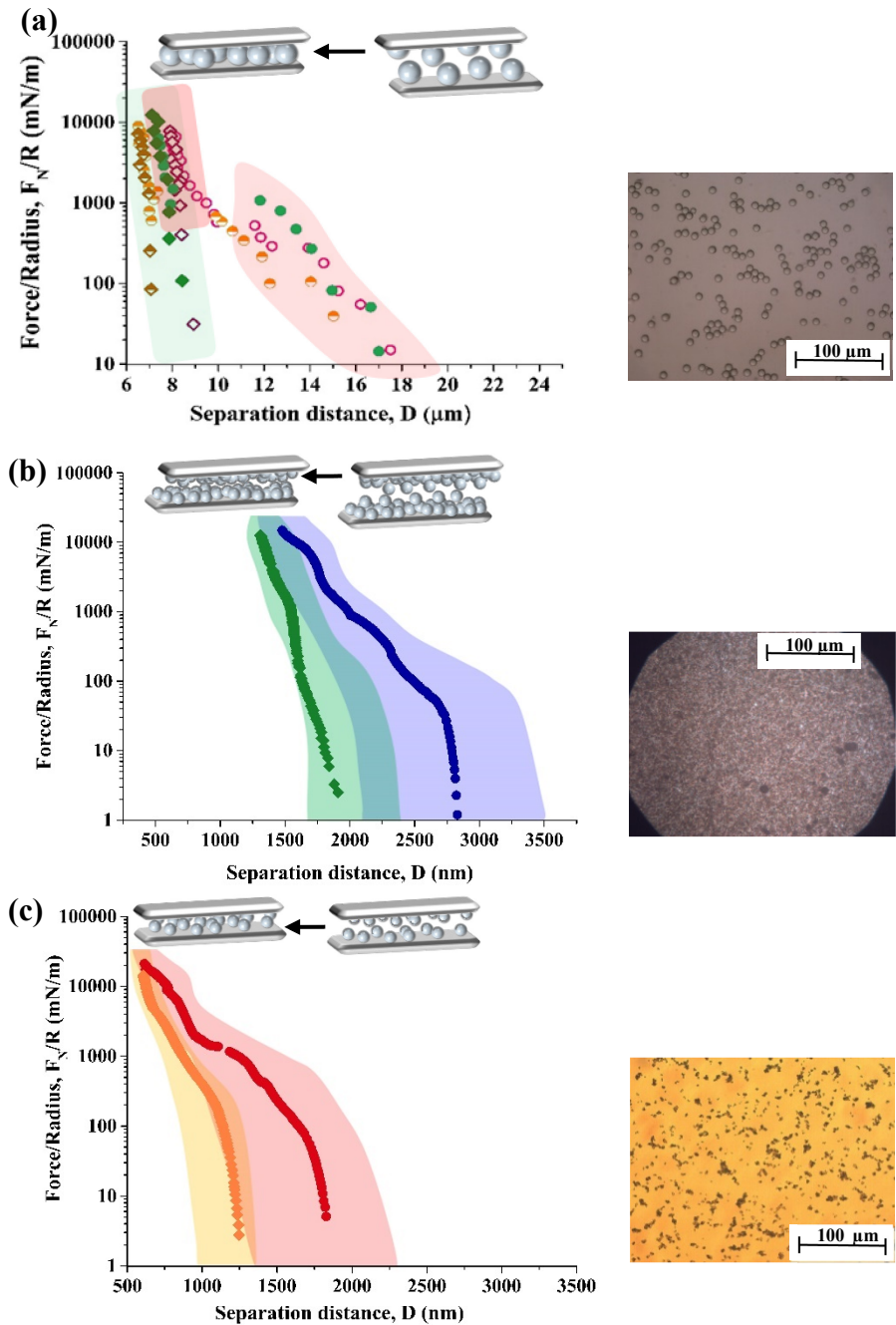


Figure 4.7 : Force profiles measured on the first (\bullet) and second compressions (\blacklozenge) between two identical chemisorbed hard particle layers across water (pH 5.8) and microscopic images in air of a reference surface used in SFA measurements prior to any experiment. The surfaces were made of chemisorbed and physisorbed Si-8 layers with a surface coverage of 13% (a) and chemisorbed Si-07 with surface coverages of 100% (b) and 15% (c). Filled, half-filled, and open symbols correspond to the particle layers prepared from an aqueous solution of NHS/EDC at pH 7 (chemisorbed), TEA at pH 10 (chemisorbed), and NaOH at pH 7 (physisorbed), respectively. The shaded areas represent the variability in the measured force profiles, and the most representative profile is illustrated.

arises when the gradient of force exceeds the restoring force of the measuring spring, indicates that the system rearranges into a more favorable conformation to minimize the total energy. The closest separation distance measured after this discontinuity or “jump in” corresponds to the size of one particle (8 μm), which clearly indicates that the two apposing particle layers merged into a single particle layer upon compression. The important difference observed between the first and subsequent reproducible approaches (**Figure 4.7a**) suggests that this rearrangement resulted from a permanent rupture of some attachment points between the Si-8 and the surface-immobilized layer of PAA. This rearrangement occurred only on the first compression (**Figure 4.7a**), and the subsequent force profiles, on the same contact position, were reproducible and did not show any hysteresis between the approach and separation. No adhesion on approach (**Figure 4.7a**) or on separation (data not shown) between the two Si-8 layers was observed. This can be attributed to the significant decrease in the real contact area compared to that of smooth substrates. It has been shown that the adhesion between domed surfaces made of immobilized silica particles and a bare surface decreases when increasing the surface particle density.^{33, 35}

Domed surfaces made of smaller silica particles, Si-07 (700 nm diameter), were investigated for high and low surface coverages corresponding to 100 and 15%, respectively. The Si-07 particles are assumed to be chemisorbed using TEA solution as previously discussed. The force profiles were mainly repulsive for both surface coverages (**Figure 4.7b, c**). A small discontinuity in the force profile at a separation distance of ca. 1200 nm was evidenced for the low surface coverage and could be attributed to some adhesion between both surfaces (**Figure 4.7c**). As for the Si-8 (**Figure 4.7a**), the first approach is different from the subsequent force profiles for high and low Si-07 surface coverages, suggesting an irreversible particle rearrangement upon the first compression (**Figure 4.7b, c**). In addition, the onset distances of repulsions for the first compression are 1800 and 2800 nm for the low and high surface coverages, respectively, corresponding to 2.6 and 4 times the particle diameter. Because the electrostatic interactions are expected to be negligible compared to the magnitude of the measured forces, the onset values suggest the presence of particle aggregates or multilayers for both surface coverages. For high surface coverage, the presence of multilayers was confirmed by AFM imaging, showing

asperities with height significantly larger (ca. 1250 nm) than the diameter of one Si-07 (ca. 700 nm) (**Figure 4.S.9d**). The particle rearrangement observed on the first compression most probably resulted from the partial expulsion of some particles forming the outermost layers. This is confirmed by the decrease in the range of interactions for the subsequent approaches for both surface coverages (**Figure 4.7b, c**). For the low coverage, the distance range of interactions varies between 0.9 to 1.7 times the particle diameter, suggesting that the spacing between adjacent particles allow interdigitation between apposing layers to occur upon compression (**Figure 4.7c**). Under maximal compression between the Si-07 layers of low coverage, the closest separation distance observed (ca. 650 nm) is relatively close to the diameter of one silica NP (ca. 700 nm), suggesting that the apposing particle layers undergo a rearrangement to adopt a fully interdigitated conformation as illustrated in **Figure 4.7c**. The fact that the force profiles measured after the first approach were reproducible on the same contact position suggests that the particle motion (interdigitation) upon compression is reversible after the initial and permanent rearrangement. This means that the randomly distributed particles have to move slightly to provide space for the approaching apposing particles. This motion probably arises from the elastic underlying PAA substrates rather than the particle detachment or rolling. Similar elastic behavior has been reported for hard metallic films deposited on soft polymer coatings known as "the cushioning effect", allowing the covalently attached films to slightly move laterally upon compression.⁶³ No interdigitation was observed between the surfaces of high coverage. The closest separation distance was approximately twice the particle diameter (**Figure 4.7b**), meaning that particle layers are noninterpenetrated. The reversible force profiles, excluding the first approach, and the distance range of interactions (1400 - 1900 nm) confirm the presence of relatively dense, irreversibly attached, and noninterpenetrated layers of particles.

4.5.2.3 Friction Forces

The reported friction forces, F_s , were obtained in the steady-state regime and compared for a constant sliding velocity of 1.6 $\mu\text{m/s}$ (unless another value is specified). As a reference, F_s was measured between two smooth surface-immobilized PAA layers (**Figure 4.8**) and follows Amontons' law with a relatively large friction coefficient, i.e. $\mu=$

2.4 (**Figure 4.8**). The PAA layers could not sustain large applied loads and surface damaged appeared at ca 25 atm. The friction forces between two hard structured layers were measured during the second and/or third approaches, after the particle rearrangement caused by the first compression. The separation distance remained constant during sliding, except when degrafting occurred, and corresponded to the minimum separation distance reported on the normal force profiles suggesting that sliding does not induce additional interdigitation (in addition to that observed upon compression) or complete expulsion of

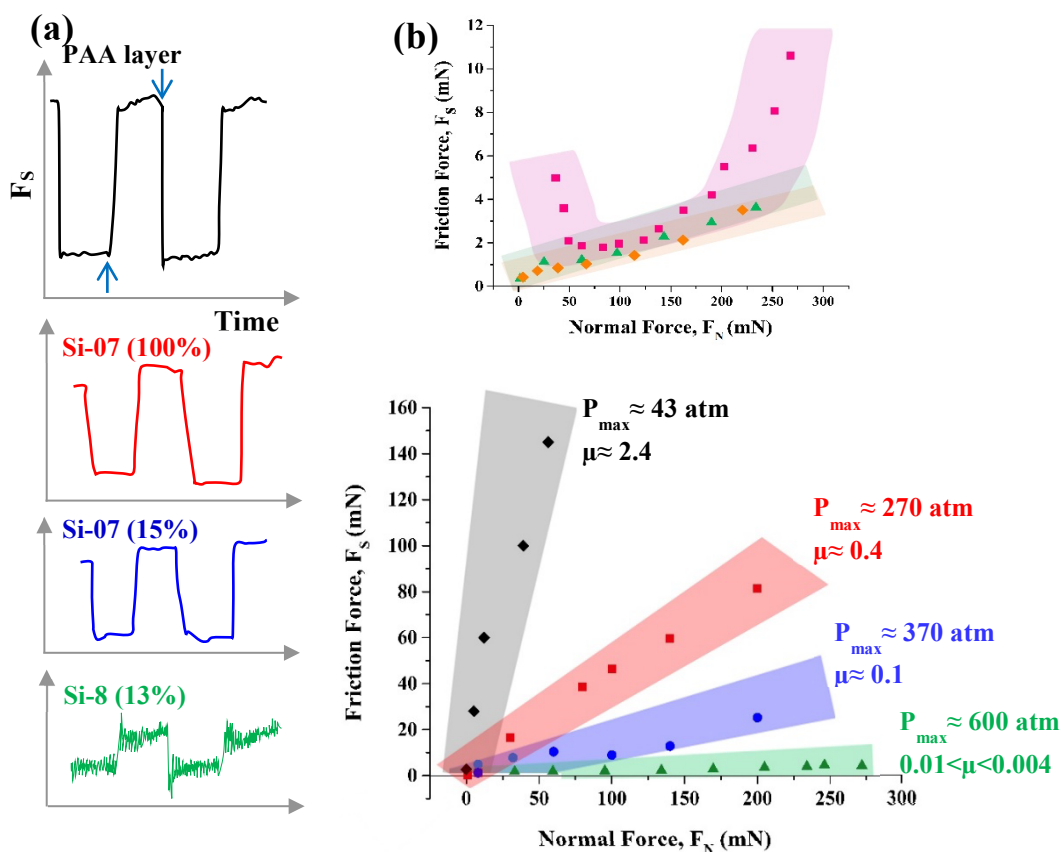


Figure 4.8 : Friction behavior of hard domed surfaces. **(a)** Friction traces and friction force, F_s , as a function of the normal force, F_N , across water (pH 5.8) between two identical surfaces of soft surface-immobilized layers of PAA (\blacklozenge), hard chemisorbed particle layers made of Si-8 with a surface coverage of 13% (green \blacktriangle), Si-07 with a surface coverage of 100% (blue \bullet), Si-07 with a surface coverage of 15% (red \blacksquare). **(b)** F_s as a function of F_N between two identical apposing Si-8 layers chemisorbed using a solution of NHS/EDC at pH 7 (green \blacktriangle), using TEA at pH 10 (chemisorbed) (orange \blacklozenge) and using NaOH at pH 7 (physisorbed) (pink \blacksquare). Friction experiments were done at a sliding velocity of $1.6 \mu\text{m/s}$. The shaded areas represent the variability in the measured F_s , and the most representative data are illustrated.

the particles (**Figure 4.S.10a**). For all hard-structured surfaces, the friction behavior follows Amontons' law over a relatively large range of applied loads (**Figure 4.8**).

A particularly low friction coefficient was measured between the chemisorbed Si-8 layers (ca; $\mu = 10^{-2}$ - 10^{-3}). The constant separation distance observed during sliding, the absence of stiction (static friction that needs to be overcome to enable relative motion) when initiating the sliding, and the extremely low friction coefficient ($10^{-2} < \mu < 10^{-3}$) suggest a rolling mechanism between the two surfaces (**Figure 4.8**). It is known that rolling elements usually generate less friction and are characterized by low starting torque compared to hydrodynamic bearings.⁶⁴ However, such a rolling mechanism would imply that the particles are not strongly attached to the substrates. To elucidate the role of particle attachment on the friction response, the friction forces between chemisorbed and physisorbed Si-8 were compared for similar surface coverages, applied loads, and sliding velocity (**Figure 4.8b**). For the physisorbed particles, the friction forces do not follow Amontons' law and are larger than those measured between chemisorbed Si-8. Furthermore, the degrafting of physisorbed Si-8 was observed at applied loads of ca. 350 mN as evidenced by an abrupt decrease in the separation distance during sliding and by the changes in the shape of the FECO fringes (data not shown). On the other hand, the chemisorbed Si-8 layers did not show any significant damage and sustained much higher loads (up to 600 atm), compared to the soft NP layers, before being removed from the contact zone. These results confirm that the covalent attachment of Si-8 provides a stronger resistance to particle detachment upon compression and sliding. These results strongly suggest that covalent bonds play a role in the friction behavior. However, for particles to roll, covalent bonds have to break. It is possible that some particles remain covalently bound to the surfaces whereas others roll across the interdigitated layers. For such mechanisms, collisions between the entrapped Si-8 particles are inevitable. The erratic stick-slips observed in the friction traces of the Si-8 layers could be associated with random collisions (**Figure 4.8**). Random lateral collisions during rolling and/or translation are the two commonly observed mechanisms for initiating and maintaining the motion of hard systems, such as reported for physisorbed ZnO nanowire onto silica wafers.⁶⁵ The effect of sliding velocity on the friction behavior was investigated and showed an asymptotic increase in the friction force with a velocity of up to 20 $\mu\text{m/s}$ (**Figure 4.S.10b**), as expected

from the rolling mechanism.^{64, 66} Above 20 $\mu\text{m/s}$, complete particle degrafting from the contact area and an important increase in the friction coefficient were observed (**Figure 4.S.10b**). Particle degrafting was evidenced by the shape and position of FECO fringes during the friction experiments and from imaging the contact after friction experiments (**Figure 4.S.10a**). For sliding velocity lower than 20 $\mu\text{m/s}$, the absence of surface damage (**Figure 4.S.10a**) and the similarity of the force profiles measured before and after friction experiments (**Figure 4.S.9b, c, d**) confirm the robustness of the chemisorbed Si-8 layers. The synergic effects of the rolling motion together with the low increase in the contact area upon compression (data not shown) are most probably the key parameters for this remarkable lubrication.

The friction coefficients measured between the smaller particles, Si-07, are larger than these observed with Si-8 (**Figure 4.8**). Furthermore, the chemisorbed Si-07 particles degrafted more easily when increasing the sliding velocity ($\geq 6 \mu\text{m/s}$, data not shown) compared to the chemisorbed Si-8 ($\geq 20 \mu\text{m/s}$, **Figure 4.S.10b**). The friction coefficients are 0.1 and 0.4 for the high and low Si-07 surface coverages, respectively. The difference in the friction coefficients can be explained by a difference in the interactions of the Si-07 particles with the two apposing surfaces. At low surface coverage, there is attraction between some immobilized negatively charged Si-07 particles and the apposing negatively charged areas, free of particles (i.e., PAA layer). The possible presence of such attractions is supported by the presence of a small discontinuity in the first approach (ca. 1200 nm, **Figure 4.7c**). Therefore, to initiate and maintain rolling, the particles on the surfaces of low coverage have to overcome these attractive interactions between the particles and the PAA substrates. No discontinuity in the force profiles was observed for the Si-07 layers of high coverage, suggesting the absence of adhesion between compressed layers of high surface coverage. Therefore, the presence of adhesion within the layers of low coverage might be responsible for the larger friction coefficient (**Figure 4.8**).

The friction forces between the hard and the soft domed surfaces cannot be reliably compared in terms of an elasticity effect because they arise from different mechanisms but both give rise to very low friction coefficients. The friction behavior of soft polymer domed surfaces mainly depends on the swellability of the particles, which can be triggered by

changes in pH, whereas that of the hard structured surfaces is mainly governed by a rolling mechanism. The absence of evidence of rolling for the soft particles is supported by the fact that no degrafting was observed during friction experiments and by the absence of particle rearrangement during the very first compression (absence of discontinuity in the force profiles), both suggesting that the soft NPs remain strongly attached to the substrate. As previously mentioned, the strong anchorage is made possible by the large deformability of the soft particles, ensuring an important number of anchorage points (**Figure 4.2**).

4.6 Conclusion

The normal and lateral forces between two apposing supported 2D colloidal arrays immersed in water were investigated. Soft and hard arrays were produced through the chemisorption and physisorption of pH-sensitive polymer and silica particles, respectively. The results show that hard and soft structured surfaces can sustain significantly larger applied loads (up to 600 atm) with low friction coefficients (10^{-3}) compared to the smooth polymer-coated surfaces reported so far. The friction behavior of soft pH-responsive structured surfaces can be controlled by tuning the pH and appears to be mainly dependent on the swellability of the immobilized arrays. An increase in the swelling ratio of immobilized soft polymer NPs was directly correlated with a decrease in the friction coefficient regardless of the surface density and the immobilization method (i.e., physisorbed or chemisorbed particles). No significant degrafting of the soft NPs during sliding was evidenced for applied pressure of up to 200 atm. This maximal pressure was limited by the experimental setup and not by the robustness of the NP anchorage. The nondeformable hard domed surfaces, made of silica particle layers, could also give rise to very low friction coefficient (10^{-3}) because of particle rolling. Such a rolling motion involved the rupture of physical or covalent bonds between the particles and the surface. The maximal applied pressure that the hard domed surfaces could sustain during sliding (ca. 600 atm) was associated with the expulsion of the particles from the contact area. This study demonstrated that hard and soft 2D non-close-packed arrays can be used control the lubricant properties of aqueous-based materials with higher efficiency than for smooth polymer coatings.

4.7 Acknowledgements

Financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, and Centre de Recherche sur les Matériaux Auto-Assemblés is acknowledged. Professor X. X. Zhu is also thanked for providing resources for polymeric nanoparticle synthesis.

4.8 Supporting Information

Size distribution of dispersed soft NPs in water. AFM images of chemisorbed soft NP layers on amino-functionalized mica surfaces. Force profiles of chemisorbed and physisorbed soft NP layers and corresponding AFM images. Optical microscopy images in air of positively charged Si-8 particles physisorbed onto chemisorbed soft NP layers through electrostatic interactions. Images of mica FECO fringes of chemisorbed soft NP layers after friction measurements. AFM images in air of chemisorbed PAA-25% before and friction measurements. Force profiles of chemisorbed and physisorbed soft NP layers before and after friction measurements. Optical microscopy images in air of chemisorbed and physisorbed Si-8 particles. Force profiles of surface-immobilized layer of PAA, chemisorbed Si-8 and Si-07 before and after friction measurements and corresponding AFM. Microscopic images and FECO fringes of the surface contact between two chemisorbed Si-8 layers before and after friction measurements and friction forces between two apposing Si-8 layers as a function of sliding velocity and applied load.

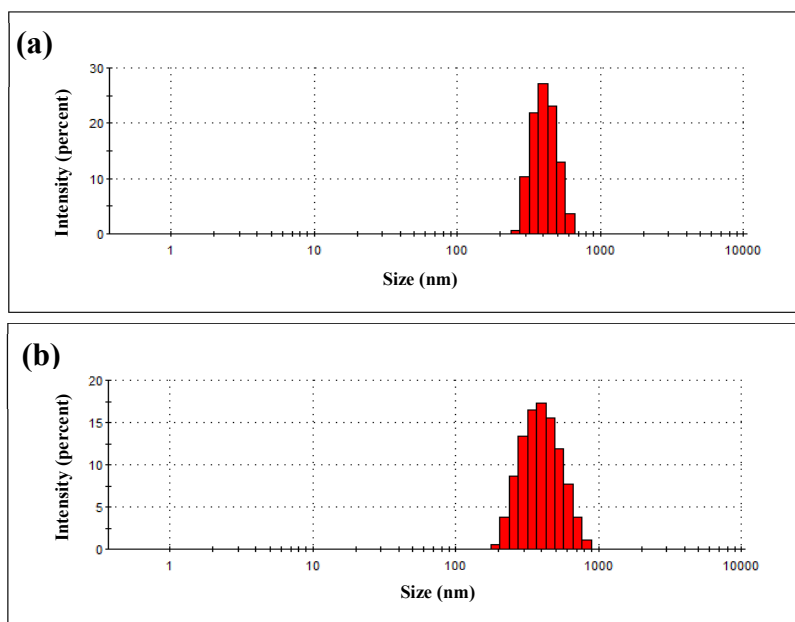


Figure 4.S.1 : Hydrodynamic diameter distribution of dispersed PAA-25% **(a)** and PAA-80% **(b)** at pH 5 and 20 °C.

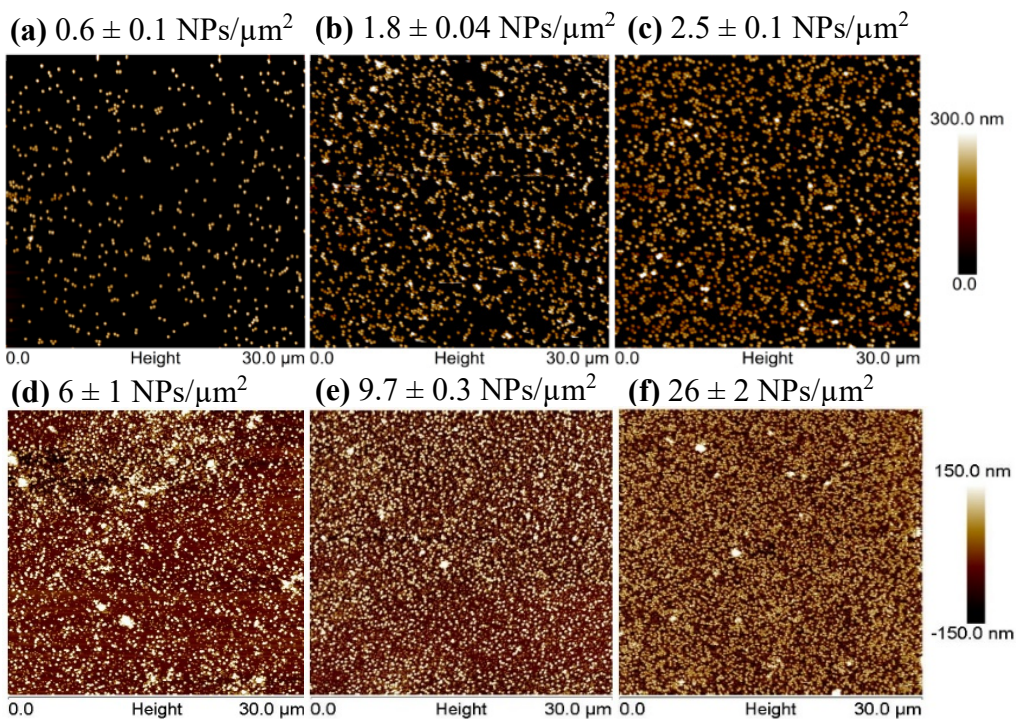


Figure S.2 : AFM images in air of chemisorbed PAA-25% from a NP suspension of 0.1% w/w **(a)**, 0.2% w/w **(b)** and 0.3% w/w **(c)** and chemisorbed PAA-80% from a NP suspension of 0.05 % w/w **(d)**, 0.1% w/w **(e)** and 0.3% w/w **(f)**. Self-adsorption from a NP suspension were done for an immersion time of 20 h at 20 °C.

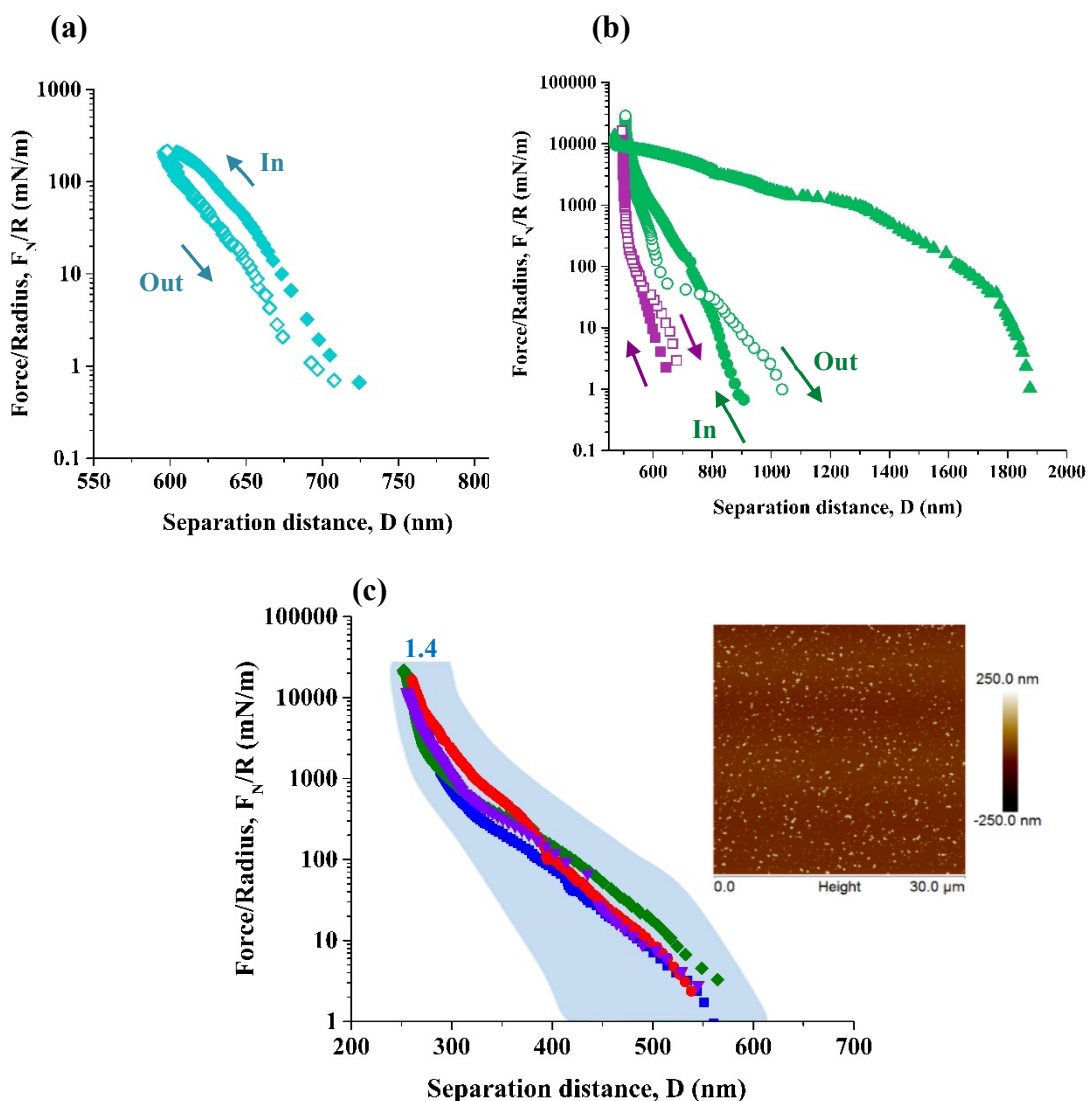


Figure 4.S.3: Force profiles measured on the first surface compression (filled symbols) and decompression (open symbols) across water at pH 4 between two identical apposing soft NP layers of chemisorbed PAA-25%, 1.0 ± 0.1 NPs/ μm^2 (a) and chemisorbed PAA-80%, 26 ± 2 NPs/ μm^2 (■) and physisorbed PAA-80%, 7.0 ± 0.3 NPs/ μm^2 layers immediately after immersion (●) and after 1 h (▲) (b). (c) Force profiles measured on the first compression between two identical chemisorbed PAA-80% layers, 3.7 ± 0.4 NPs/ μm^2 , across water at different pH levels: 2 (●), 6 (◆), 9 (▲) and 11 (▼) and AFM images in air of a reference surface used in SFA measurement prior to force measurements. The shaded areas represent the variability in the measured force profiles and the most representative profiles are illustrated. Q corresponds to the swelling ratio calculated using Eq. 4.1.

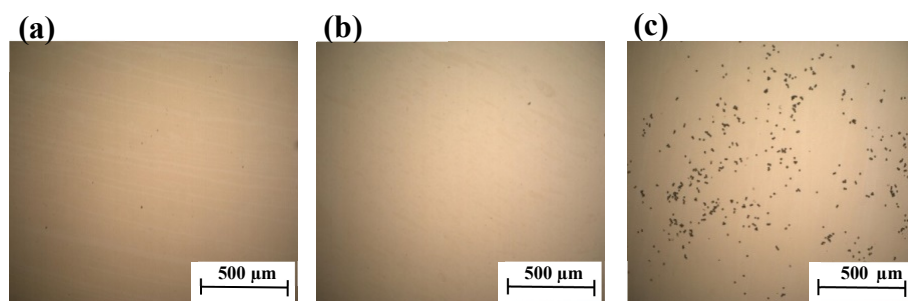


Figure 4.S.4 : Optical microscopy images in air of chemisorbed PAA-80% layers at a grafting density of 26 ± 2 NPs/ μm^2 before **(a)** and after immersion in positively charged Si-8 aqueous suspension at pH 4 **(b)** and pH 9 **(c)**. Immersion of immobilized PAA-80% on functionalized mica substrates in Si-8 suspension was carried out for 2 h at 20 °C. Adsorption of positively charged Si-8 particles onto chemisorbed PAA-80% layers **(c)** confirms the negative charges of the soft NPs layers at pH 9. The absence of Si-8 particles adsorption at pH 4 suggests a low degree of ionization of PAA-80% layers.

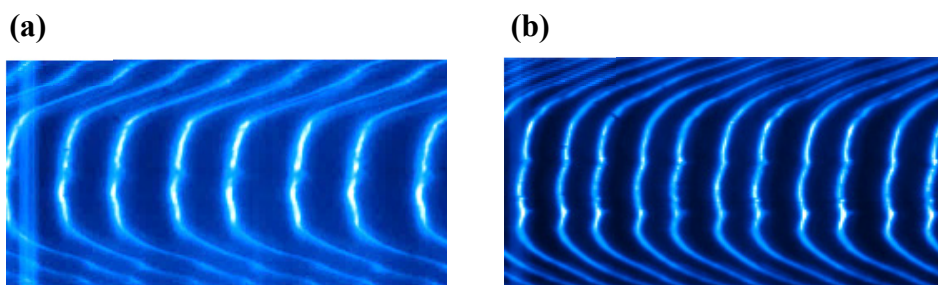


Figure 4.S.5: Images of mica FECO fringes in water after friction measurements at maximal applied pressure between two apposing chemisorbed particle layers made of PAA-25%, 75 atm **(a)** and PAA-80%, 200 atm **(b)**. The discontinuities in the FECO of compressed areas were also present prior to friction measurements and result from the heterogeneous surface topography of the soft colloidal arrays. Therefore, they are not attributed to friction-induced damage.

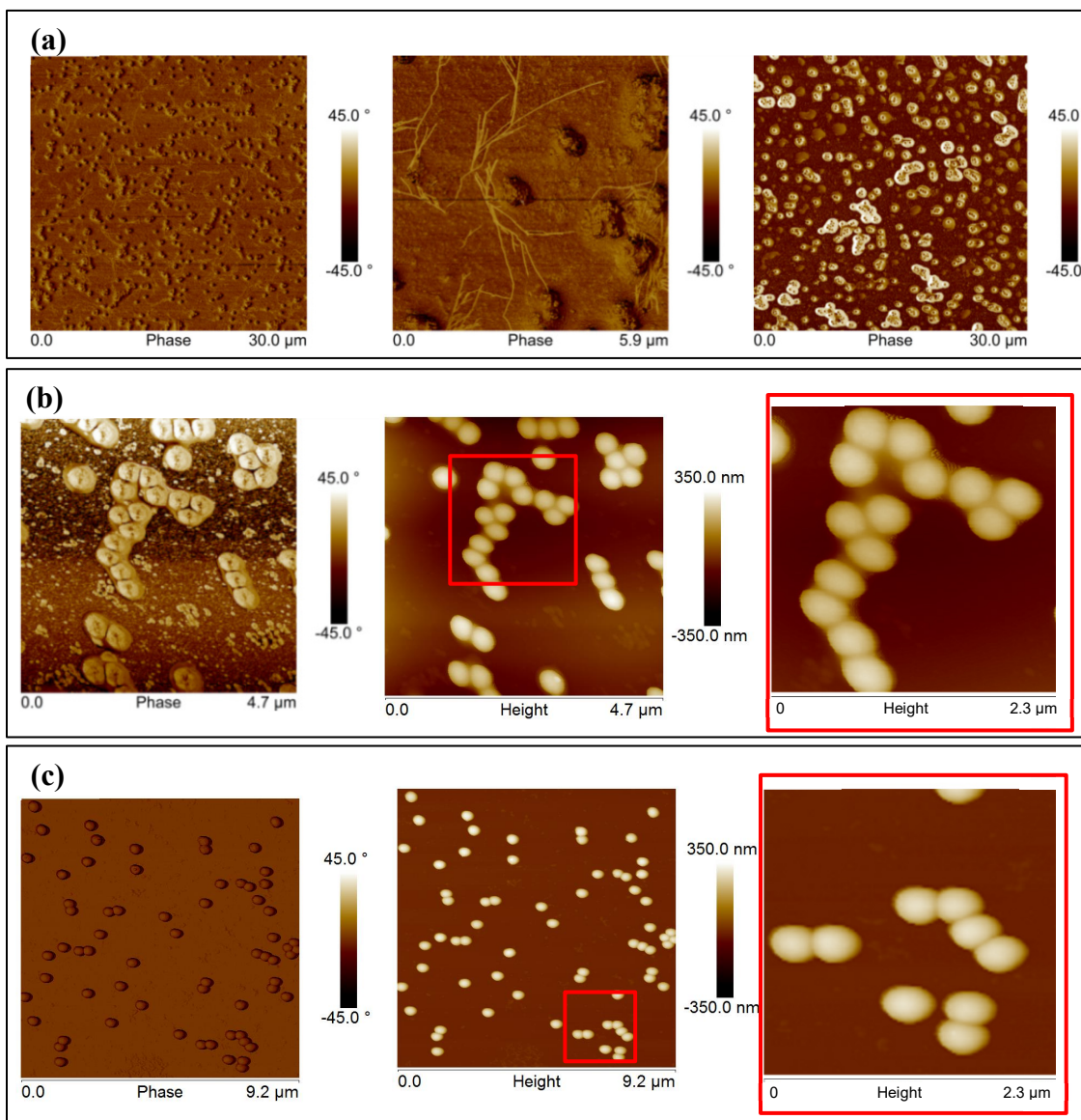


Figure 4.S.6: AFM images, in phase mode, of chemisorbed PAA-25% in air after friction measurements **(a)**. AFM images, in phase and height modes, of chemisorbed PAA-25% after 24 h of immersion in pH 11 **(b)** and 10 **(c)**.

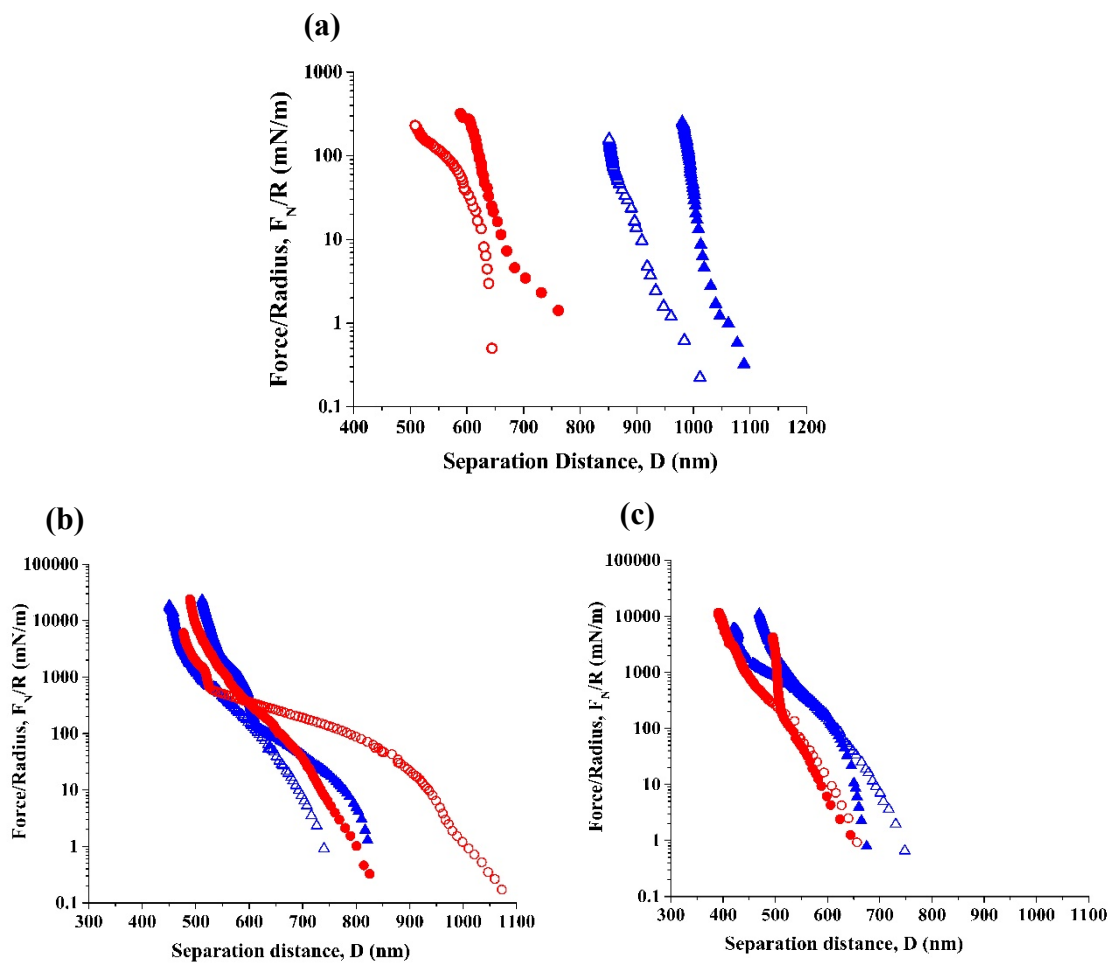


Figure 4.S.7: Force profiles measured on the first compression (filled symbols) and after friction measurements (open symbols) between two identical soft NP layers across water at different pH levels: 4 (●) and 9 (▲). The layers were made of chemisorbed PAA-25%, $0.8 \text{ NPs}/\mu\text{m}^2$ (a), chemisorbed PAA-80%, $26 \pm 2 \text{ NPs}/\mu\text{m}^2$ (b) and physisorbed, $7 \pm 0.3 \text{ NPs}/\mu\text{m}^2$ (c).

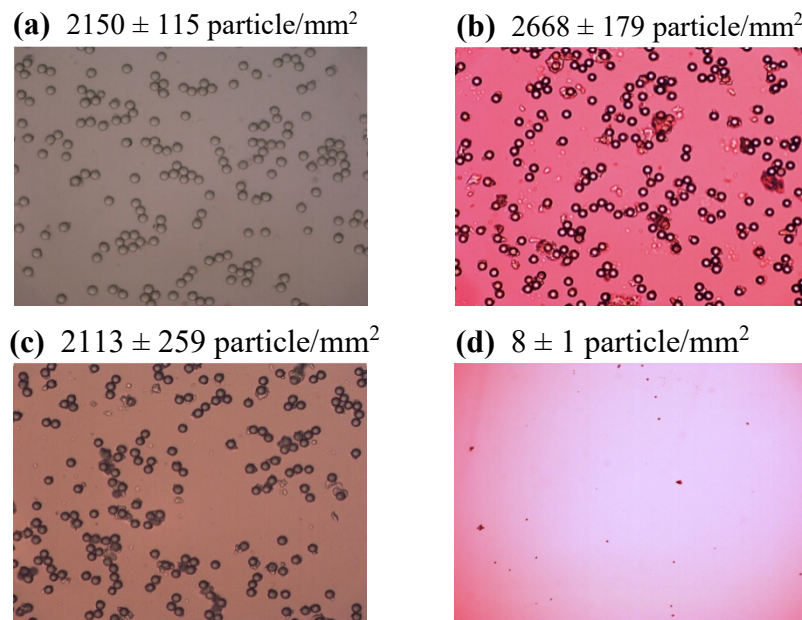


Figure 4.S.8 : Optical microscopy images in air of chemisorbed Si-8 using a solution of NHS/EDC at pH 7 **(a)**, a solution of TEA at pH 10 **(b)** and of physisorbed Si-8 particles using a solution of NaOH at pH 7**(c)**. Physisorbed Si-8 particles a onto bare mica surface **(d)**.

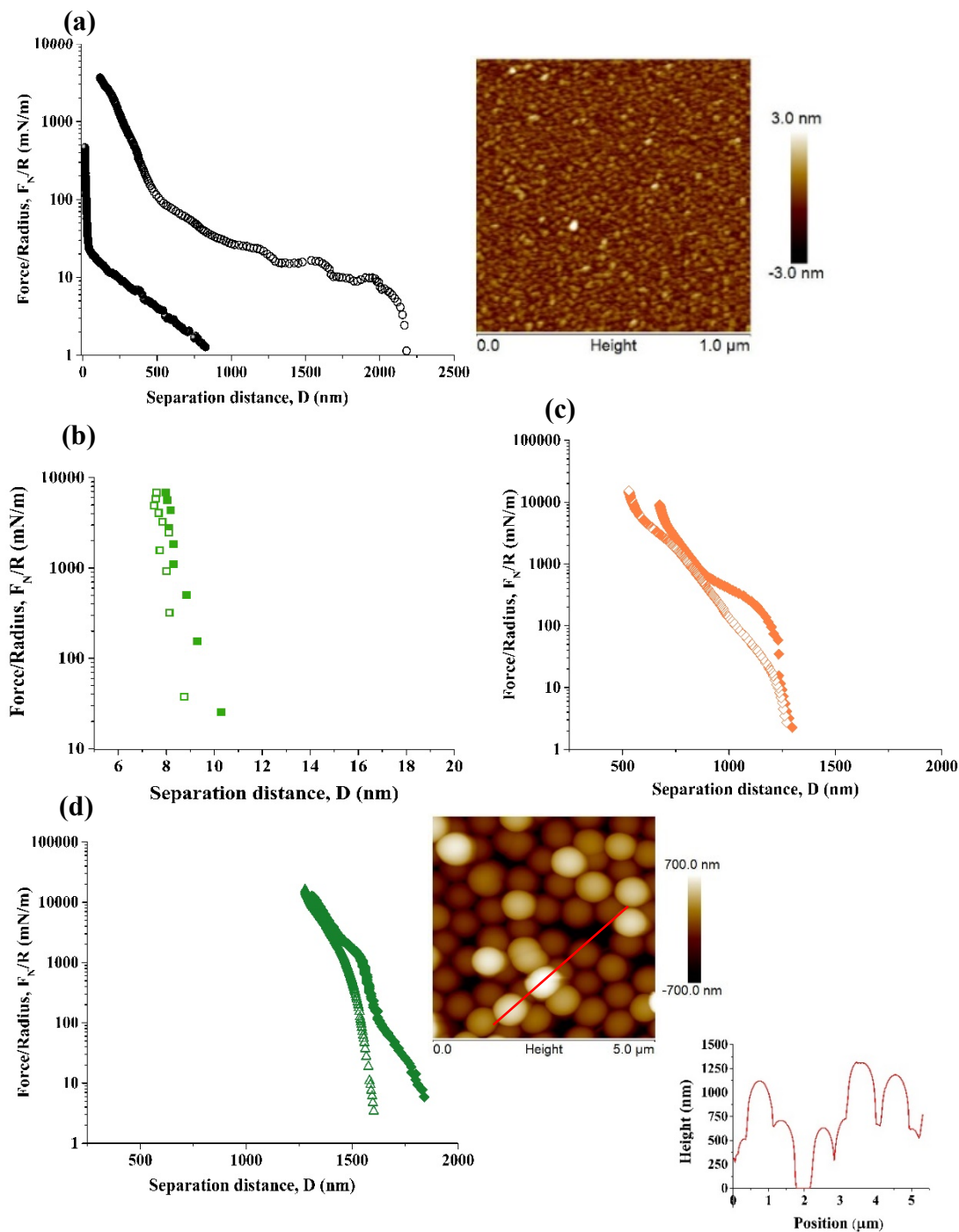


Figure 4.S.9 : Force profiles measured on the first compression (filled symbols) and after friction measurements (open symbols) across water (pH 5.8) and microscopic or AFM images in air of a reference surface used for the SFA experiments prior to force measurements. The surfaces are: soft surface-immobilized layer of PAA **(a)**, chemisorbed Si-8 layers with a surface coverage of 13% **(b)** and Si-07 with a surface coverage of 15% **(c)** and 100% **(d)**.

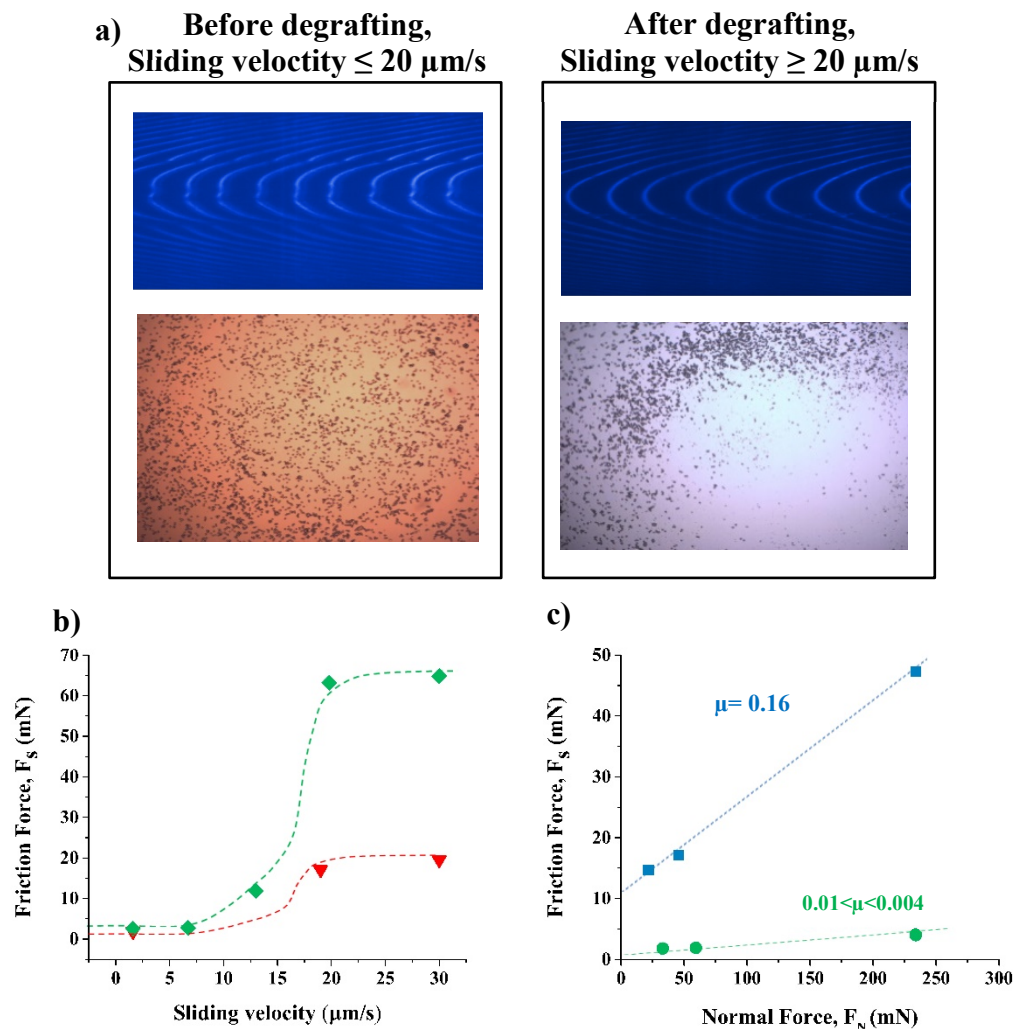


Figure 4.S.10: Tribological data between chemisorbed Si-8 layers across water. **(a)** Images of mica FECO fringes and microscopic images of surfaces with chemisorbed Si-8 layers with a surface coverage of 13% before and after surface damaged caused by friction measurement at sliding velocity of $20 \mu\text{m/s}$. **(b)** Friction force, F_s , between two apposing supported Si-8 layers as a function of sliding velocity for a applied load of 20 mN (◆) and 220 mN (▼) and **(c)** F_s as a function of normal load for a sliding velocity of 19 $\mu\text{m/s}$ (■) and 1.6 $\mu\text{m/s}$ (●). Dashed lines are guides for the eyes.

4.9 References

1. K. Ishihara, Highly Lubricated Polymer Interfaces for Advanced Artificial Hip Joints Through Biomimetic Design. *Polymer Journal* **47**, 585-597 (2015).
2. A. Dédinaïté, Biomimetic Lubrication. *Soft Matter* **8**, 273-284 (2012).
3. U. Raviv *et al.*, Lubrication by Charged Polymers. *Nature* **425**, 163-165 (2003).
4. T. Kang *et al.*, Mussel-Inspired Anchoring of Polymer Loops That Provide Superior Surface Lubrication and Antifouling Properties. *ACS Nano* **10**, 930-937 (2016).
5. J. Sotres, T. Arnebrant, Experimental Investigations of Biological Lubrication at the Nanoscale: The Cases of Synovial Joints and the Oral Cavity. *Lubricants* **1**, 102-131 (2013).
6. H. A. Ching, D. Choudhury, M. J. Nine, N. A. Abu Osman, Effects of Surface Coating on Reducing Friction and Wear of Orthopaedic Implants. *Sci. Tech. Adv. Mater.* **15**, 014402 (014421pp) (2016).
7. M. Roba, E. G. Duncan, G. A. Hill, N. D. Spencer, S. G. P. Tosatti, Friction Measurements on Contact Lenses in Their Operating Environment. *Tribol. Lett.* **44**, 387-397 (2011).
8. S. M. Rowland, R. B. Wright, Catheter and Hydrophilic Friction Reducing Coating Thereon. *U.S Patent No.*, 5,041,100 (1991).
9. S. Lee, N. D. Spencer, Materials science. Sweet, Hairy, Soft, and Slippery. *Science* **319**, 575-576 (2008).
10. J. Seror, L. Zhu, R. Goldberg, A. J. Day, J. Klein, Supramolecular Synergy in the Boundary Lubrication of Synovial Joints. *Nat. Commun.* **6**, 1-7 (2015).
11. B. Bhushan, Bioinspired Structured Surfaces. *Langmuir* **28**, 1698-1714 (2012).
12. M. J. Baum, L. Heepe, S. N. Gorb, Friction Behavior of a Microstructured Polymer Surface Inspired by Snake Skin. *Beilstein J. Nanotechnol.* **5**, 83-97 (2014).
13. B. McDonald, P. Patel, B. Zhao, Micro-Structured Polymer Film Mimicking the Trembling Aspen Leaf. *Chem. Eng. Process. Tech.* **1**, 1012-1020 (2013).
14. S. Ma *et al.*, Nanoporous Substrate-Infiltrated Hydrogels: a Bioinspired Regenerable Surface for High Load Bearing and Tunable Friction. *Adv. Funct. Mater.* **25**, 7366-7374 (2015).
15. H. A. Abdel-Aal, On Surface Structure and Friction Regulation in Reptilian Limbless Locomotion. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **22**, 115-135 (2013).
16. D. Labonte, J. A. Williams, W. Federle, Surface Contact and Design of Fibrillar 'Friction Pads' in Stick Insects (*Carausius morosus*): Mechanisms for Large Friction Coefficients and Negligible Adhesion. *J. R. Soc. Interface* **11**, 20140034 (2014).
17. X. Liu *et al.*, Low Friction and High Load Bearing Capacity Layers Formed by Cationic-Block-Non-Ionic Bottle-Brush Copolymers in Aqueous Media. *Soft Matter* **9**, 5361-5371 (2013).
18. A.-S. Bouchet, C. Cazeneuve, N. Baghdadli, G. S. Luengo, C. Drummond, Experimental Study and Modeling of Boundary Lubricant Polyelectrolyte Films. *Macromolecules* **48**, 2244-2253 (2015).
19. S. Giasson, J. M. Lagleize, J. Rodriguez-Hernandez, C. Drummond, Boundary Lubricant Polymer Films: Effect of Cross-linking. *Langmuir* **29**, 12936-11249 (2013).
20. U. Raviv *et al.*, Normal and Frictional Forces Between Surfaces Bearing Polyelectrolyte Brushes. *Langmuir* **24**, 8678-8687 (2008).

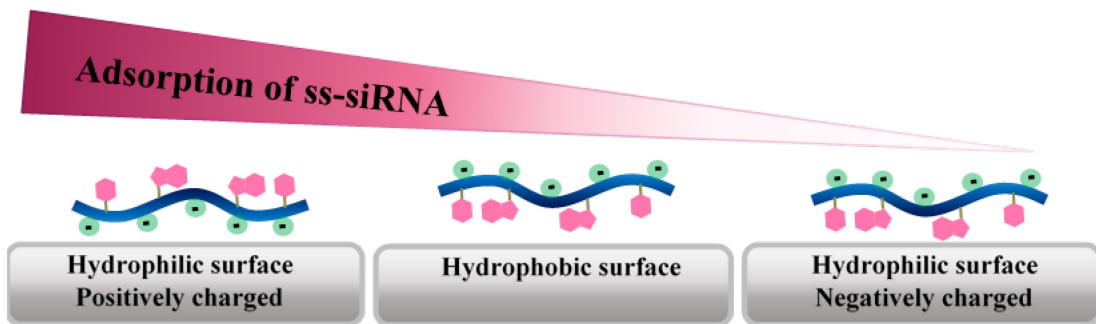
21. M. Kobayashi, M. Terada, A. Takahara, Polyelectrolyte Brushes: a Novel Stable Lubrication System in Aqueous Conditions. *Farad. Discuss.* **156**, 403-412 (2012).
22. Q. Wei, M. Cai, F. Zhou, W. Liu, Dramatically Tuning Friction Using Responsive Polyelectrolyte Brushes. *Macromolecules* **46**, 9368-9379 (2013).
23. M. Benz, N. Chen, J. Israelachvili, Lubrication and Wear Properties of Grafted Polyelectrolytes, Hyaluronan and Hylan, Measured in the Surface Forces Apparatus. *J. Biomed. Mater. Res. A* **71**, 6-15 (2004).
24. N. D. Spencer, Aqueous Lubrication: Natural and Biomimetic Approaches. *Singapore, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.*, (2014).
25. K. J. Rosenberg, T. Goren, R. Crockett, N. D. Spencer, Load-induced Transitions in the Lubricity of Adsorbed Poly(L-lysine)-g-dextran as a Function of Polysaccharide Chain Density. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **3**, 3020-3025 (2011).
26. N. Nordgren, M. W. Rutland, Tunable Nanolubrication between Dual-Responsive Polyionic Grafts. *Nano Letters* **9**, 2984-2990 (2009).
27. B. Liberelle, S. Giasson, Friction and Normal Interaction Forces between Irreversibly Attached Weakly Charged Polymer Brushes. *Langmuir* **24**, 1550-1559 (2008).
28. O. Borozenko, V. Machado, W. G. Skene, S. Giasson, Organophosphonic Acids as Viable Linkers for the Covalent Attachment of Polyelectrolyte Brushes on Silica and Mica Surfaces. *Polym. Chem.* **5**, 5740-5750 (2014).
29. M. A. Plunkett, A. Feiler, M. W. Rutland, Atomic Force Microscopy Measurements of Adsorbed Polyelectrolyte Layers. 2. Effect of Composition and Substrate on Structure, Forces, and Friction. *Langmuir* **19**, 4180-4187 (2003).
30. M. Chen, W. H. Briscoe, S. P. Armes, J. Klein, Lubrication at Physiological Pressures by Polyzwitterionic Brushes. *Science* **323**, 1698-1701 (2009).
31. X. Banquy, E. Charrault, S. Giasson, Normal and Lateral Interactions between Thermosensitive Nanoparticle Monolayers in Water. *J. Phys. Chem. B* **114**, 9721-9728 (2010).
32. P. A. Smyth, R. E. Rifkin, R. L. Jackson, R. R. Hanson, A Surface Roughness Comparison of Cartilage in Different Types of Synovial Joints. *J. Biomech. Eng.* **134**, 021006 (2012).
33. S. N. Ramakrishna, R. M. Espinosa-Marzal, V. V. Naik, P. C. Nalam, N. D. Spencer, Adhesion and Friction Properties of Polymer Brushes on Rough Surfaces: A Gradient Approach. *Langmuir* **29**, 15251-15259 (2013).
34. Z. Burton, B. Bhushan, Hydrophobicity, Adhesion, and Friction Properties of Nanopatterned Polymers and Scale Dependence for Micro- and Nanoelectromechanical Systems. *Nano Letters* **5**, 1607-1613 (2005).
35. M. Zou, L. Cai, H. Wang, Adhesion and Friction Studies of a Nano-Textured Surface Produced by Spin Coating of Colloidal Silica Nanoparticle Solution. *Tribol. Lett.* **21**, 25-30 (2006).
36. X. Wang, K. Kato, Improving the Anti-seizure Ability of SiC Seal in Water with RIE Texturing. *Tribol. Lett.* **14**, 275-280 (2003).
37. N. P. Suh, M. Mosleh, P. S. Howard, Control of Friction. *Wear* **175**, 151-158. (1994).
38. B. He, W. Chen, Q. Jane Wang, Surface Texture Effect on Friction of a Microtextured Poly(dimethylsiloxane) (PDMS). *Tribol Lett.* **31**, 187-197 (2008).

39. M. Kang, Y. M. Park, B. H. Kim, Y. H. Seo, Micro- and Nanoscale Surface Texturing Effects on Surface Friction. *Appl. Surf. Sci.* **345**, 344-348 (2015).
40. M. Wakuda, Y. Yamauchi, S. Kanzaki, Y. Yasuda, Effect of Surface Texturing on Friction Reduction Between Ceramic and Steel Materials Under Lubricated Sliding Contact. *Wear* **254**, 356-363 (2003).
41. E. Gualtieri, A. Borghi, L. Calabri, N. Pugno, S. Valeri, Increasing nanohardness and reducing friction of nitride steel by laser surface texturing. *Tribology International* **42**, 699-705 (2009).
42. C. Greiner, M. Schafer, U. Popp, P. Gumbsch, Contact Splitting and the Effect of Dimple Depth on Static Friction of Textured Surfaces. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 7986-7990 (2014).
43. L. Han *et al.*, Tunable Stimulus-responsive Friction Mechanisms of Polyelectrolyte Films and Tube Forests. *Soft Matter* **8**, 8642–8650 (2012).
44. C. Pacholski, Two-Dimensional Arrays of Poly(N-Isopropylacrylamide) Microspheres: Formation, Characterization and Application. *Z. Phys. Chem.* **229**, 283-300 (2015).
45. Q. Meng, Z. Li, G. Li, X. X. Zhu, Effect of Hydrophilic Shells on the Formation of Colloidal Crystals by Monodisperse Core-Shell Polymer Microspheres. *Macromol. Rapid Commun.* **28**, 1613–1618 (2007).
46. B. Liberelle, X. Banquy, S. Giasson, Stability of Silanols and Grafted Alkylsilane Monolayers on Plasma-Activated Mica Surfaces. *Langmuir* **24**, 3280-3288 (2008).
47. J. N. Israelachvili, Thin Film Studing Using Multiple-Beam Interferometry. *J. Colloid Interface Sci.* **44**, 259-272 (1972).
48. J. Israelachvili *et al.*, Recent Advances in the Surface Forces Apparatus (SFA) Technique. *Rep. Prog. Phys* **73**, 1-16 (2010).
49. A. Albert, E. Serzhent, Constants of Ionization of Acids and Bases. *Chemistry, Leningrad, USSR*, (1964).
50. G. Bazin, X. X. Zhu, Responsive Properties of Crystalline Colloidal Arrays Formed by Core-Shell Microspheres With pH and Temperature Sensitivities. *Can. J. Chem.* **90**, 131–137 (2012).
51. L. Giraud *et al.*, Amino-functionalized Monolayers Covalently Grafted to Silica-Based Substrates as a Robust Primer Anchorage in Aqueous Media. *Appl. Surf. Sci* **370C**, 476-485 (2016).
52. X. Banquy, X. X. Zhu, S. Giasson, Mechanical and Frictional Properties of Nanoparticle Monolayers Grafted on Functionalized Mica Substrates. *J. Phys. Chem. B* **112**, 12208–12216 (2008).
53. P. Gong, T. Wu, J. Genzer, I. Szleifer, Behavior of Surface-Anchored Poly(acrylic acid) Brushes with Grafting Density Gradients on Solid Substrates: 2. Theory. *Macromolecules* **40**, 8765-8773 (2007).
54. C.-J. Tsai, D. Y. H. Pui, B. Y. H. Liu, Elastic Flattening and Particle Adhesion. *Aerosol Sci. Technol.* **15**, 239-255 (1991).
55. J. Gensel *et al.*, Surface Immobilized Block Copolymer Micelles with Switchable Accessibility of Hydrophobic Pockets. *Soft Matter* **7**, 11144–11153 (2011).
56. T. Kang *et al.*, Mussel-Inspired Anchoring of Polymer Loops That Provide Superior Surface Lubrication and Antifouling Properties. *ACS Nano* **10**, 930–937 (2015).

57. X. Liu *et al.*, Low friction and high load bearing capacity layers formed by cationic-block-non-ionic bottle-brush copolymers in aqueous media. *Soft Matter* **9**, 5361–5371 (2013).
58. N. S. Tambe, B. Bhusnan, Nanoscale Friction and Wear Maps. *Phil. Trans. R. Soc. A* **366**, 1405–1424 (2008).
59. M. Sirchabesan, S. Giasson, Mesoscale Simulations of the Behavior of Charged Polymer Brushes Under Normal Compression and Lateral Shear Forces. *Langmuir* **23**, 9713-9721 (2007).
60. E. J. M. Tourniera, J. Wallachc, P. Blonda, Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-1-cyclohexane carboxylate as a Bifunctional Immobilization agent. Optimization of the Coupling Conditions. *Anal. Chim. Acta* **361**, 33-44 (1998).
61. C. Y. Lim *et al.*, Succinimidyl Ester Surface Chemistry: Implications of the Competition between Aminolysis and Hydrolysis on Covalent Protein Immobilization. *Langmuir* **30**, 12868–12878 (2014).
62. M. R. Lockett, M. F. Phillips, J. L. Jarecki, D. Peelen, L. M. Smith, A Tetrafluorophenyl Activated Ester Self-Assembled Monolayer for the Immobilization of Amine-Modified Oligonucleotides. *Langmuir* **24**, 69–75. (2008).
63. J. M. Lackner, L. Major, M. Kot, Microscale Interpretation of Tribological Phenomena in Ti/TiN Soft-Hard Multilayer Coatings on Soft Austenite Steel Substrates. *B. Pol. Acad. Sci-Tech* **59**, 343-355 (2011).
64. B. Bhushan, Modern Tribology Handbook *CRC Press Two Volume Set*, (2000).
65. H. J. Kim, K. H. Kang, D. E. Kim, Sliding and Rolling Frictional Behavior of a Single ZnO Nanowire During Manipulation with an AFM. *Nanoscale* **5**, 6081-6087 (2013).
66. M. R. Falvo *et al.*, Nanometre-scale Rolling and Sliding of Carbon Nanotubes. *Nature* **397**, 236-238 (1999).

Chapitre 5

Single Stranded siRNA Complexation through Non-electrostatic Interactions



5.1 Contexte et résumé

Les monocouches d'AUTES présentées au *Chapitre 3* sont chargées positivement et ce même à des pH très élevés. Ces charges positives permettent ainsi à ces SAMs d'immobiliser des systèmes anioniques via des interactions électrostatiques. Beaucoup d'études s'intéressent au développement de biomatériaux (implantables ou injectables) aux surfaces cationiques pour la complexation de principes actifs anioniques et notamment la délivrance de gènes. En effet, les oligonucléotides sont fortement chargés négativement et se complexent très facilement à des nanovecteurs chargés positivement. Cependant, la forte toxicité de ces systèmes cationiques limite leur utilisation.

L'étude présentée au *Chapitre 5* s'intéresse à la délivrance de simple brin de siARN à l'aide de vecteurs cationiques et non-cationiques. En effet, les simples brins de siARN ont démontré une activité de silençage comparable à la forme double brin. En revanche, la structure simple brin d'oligonucléotide permet une plus grande variété d'interaction permettant d'envisager l'emploi de nanovecteurs non-cationiques pour leur délivrance.

La complexation de simples brins de siARN via différentes natures d'interactions avec des surfaces modèles de chimie variable a été étudiée à l'aide d'un appareil de mesure de forces de surface (SFA). Les résultats issus de cette étude démontrent qu'un simple brin de siARN peut s'adsorber sur des surfaces hydrophiles (chargées positivement ou négativement) ainsi que sur des surfaces hydrophobes suggérant que la complexation se produit via des interactions hydrophiles et hydrophobes. De plus, la force d'interaction ainsi que la conformation du simple brin de siARN dépendent de la nature de l'interaction avec le substrat. Des interactions hydrophobes et les liaisons hydrogènes ont par la suite pu être employées pour complexer cet acide nucléique avec des formulations micellaires et liposomales non-cationiques.

Cette étude a permis de démontrer la possibilité d'adsorber des simples brins de siARN via des interactions non-électrostatiques avec des surfaces permettant d'envisager la conception de nanovecteurs non-cationiques et donc moins toxiques pour la délivrance de simples brins de siARN.

5.2 Abstract

As double stranded, single stranded siRNA (ss-siRNA) has demonstrated gene silencing activity but still requires efficient carriers to reach its cytoplasmic target. To better understand the fundamental aspect driving the complexation of ss-siRNA with nanocarriers, the interactions between surfaces of various compositions across a ss-siRNA solution were investigated using the Surface Forces Apparatus. The results show that ss-siRNA can adsorb onto hydrophilic (positively and negatively charged) as well as on hydrophobic substrates suggesting that the complexation can occur through hydrophobic interactions and hydrogen bonding in addition to electrostatic interactions. Moreover, the binding strength and the conformation of ss-siRNA depend on the nature of the interactions between the ss-siRNA and the surfaces. The binding of ss-siRNA with nanocarriers, such as micelles or liposomes through non-electrostatic interactions was also evidenced by a SYBR[®] Gold cyanine dye. We evidenced the presence of interactions between the dye and oligonucleotides already complexed to non-cationic nanovectors biasing the quantification of the encapsulation. These results suggest that non-electrostatic interactions could be exploited to complement electrostatic interactions in the design of nanocarriers. In particular, the different highlighted interactions can be used to complex ss-siRNA with uncharged or anionic carriers which are related to lower toxicity compared to cationic carriers.

Keywords: *single stranded RNA, Surface Forces Apparatus, hydrophobic interactions, hydrogen bonding*

5.3 Introduction

Small interfering ribonucleic acids (siRNA) are small double strand RNA molecules of 20-30 base pairs¹ capable of inhibiting specific gene expression in plants² and animals³ by causing cleavage of specific messenger RNA (mRNA) after transcription. The specific gene silencing activity of double stranded siRNA (ds-siRNA) is currently clinically assessed to treat large variety of diseases, such as genetic disorders,⁴ cancer⁵ or infectious diseases.⁶ Compared to other gene silencing strategies, such as single-stranded antisense RNA or steric-blocking oligonucleotides,⁷ siRNA require a lower dosage, since a single molecule can cleave a large number of target mRNA. Interestingly, several studies have shown that only one RNA strand is required to activate the RNAi pathway and that single stranded siRNA (ss-siRNA) can bypass the ds-siRNA form.^{8, 9} Lima *et al.* have recently optimized the ss-siRNA structure to silence protein expression with potency similar to the duplex.¹⁰ Moreover, ds-siRNA are known to induce non-specific gene silencing,¹¹ a phenomenon caused by the saturation of the endogenous RNAi machinery by sense and antisense siRNA strands¹², resulting in toxic phenotypes.¹³ Therefore, delivering ss-siRNA prevents from administrating the sense strand of ds-siRNA, which would contribute to reduce the non-specific gene silencing¹⁴ and other toxicity issues.^{7, 15, 16}

Because of its high negative charge and hydrophilic nature, siRNA does not cross biological membranes easily, which limits its bioavailability.¹⁷ In some clinical applications, naked siRNA can be administered locally, such as in lung, eyes, and muscles.^{18, 19} However, many tissues can only be reached after systemic administration, such as the liver, a major target of siRNA therapeutics in clinics.¹⁸ In physiological conditions, siRNA can be rapidly eliminated by endogenous nucleases degradation,²⁰ by the reticuloendothelial system²¹ or by glomerular filtration. Therefore, many recent efforts have focused on the careful design of drug delivery systems (DDS), able to overcome each of the biological barriers encountered until the cytoplasm of the cell, i.e. the siRNA's site of action.^{17, 18, 21}

Viral vectors are among the first vehicles studied for small oligonucleotides delivery but can induce unacceptable toxicity.²¹ The complexation of ds-siRNA with synthetic vectors such as lipid nanoparticles,²²⁻²⁴ cyclodextrin based polymeric nanoparticles^{25,26} or polymeric nanoparticles^{27,28} have been extensively studied and some of them are currently under clinical trials.^{18,29} Whatever the nanocarrier, they are generally positively charged and involve complexation of the negatively charged siRNA through electrostatic interactions.^{23,30,31} However, this cationic feature has been related to higher toxicity compared to uncharged or anionic carriers. Such toxicity is associated with non-specific interactions and internalization with cells, a high rate of opsonisation and a short blood circulation half-life.^{32,33} To optimize the nanocarrier design, extensive chemical diversity has been explored. High throughput screening of cationic lipids, for instance, has shown that too many or too strong (*e.g.* quaternary amines) cationic groups can significantly impede the cytosolic release of the siRNA payload, and limit the transfection efficiency.³⁴ Interestingly, several studies have demonstrated that ds-siRNA and ss-mRNA do not require the same carrier for optimized delivery.³⁵ However, structure-activity relationships are not deeply understood, and more in-depth knowledge about siRNA and the nanocarrier interactions would be a great advantage for the design of efficient and safe DDS.

Theoretical studies have shown that double and single stranded oligonucleotides can interact with hydrophilic and hydrophobic surfaces through different kind of interactions.³⁶⁻³⁹ However, experimental investigation of single stranded oligonucleotides complexation with surfaces and more particularly with DDS has been less reported. Because of the short sequence, 3D structure of ss-siRNA is quite simple or inexistent⁴⁰ and most probably lost during adsorption onto the surface. Nevertheless, thanks to its variety of chemical groups, ss-siRNA can be a partner for hydrogen bonding, hydrophobic and/or electrostatic interactions, as illustrated in **Figure 5.S.1**. Hydrophobic interactions are possible⁴¹ and probably via the aromatic cycle, hydrogen bonding via the hydroxyl carried by ribose or amino groups of nucleobases and electrostatic interactions via the negatively charged phosphate groups of ribose or positively charged amino groups of the nucleobases. In this study, the binding mechanisms of ss-siRNA with surfaces was

investigated by measuring the adsorption of ss-siRNA onto hydrophilic (positively and negatively charged) and hydrophobic surfaces using the Surface Forces Apparatus (SFA). The ability of charged and uncharged DDS to encapsulate ss-siRNA using electrostatic and non-electrostatic interactions was then demonstrated with micelles and liposomes of various chemical nature and surface charges using fluorescence assays.

5.4 Materials and Methods

Ruby mica sheets were purchased from S & J Trading, Inc. (Glen Oaks, NY, USA). Plasma Prep II from SPI Supplies was used to activate freshly cleaved mica surfaces using argon (5.0 grade). Milli-Q quality water was obtained from a Millipore Gradient. Aminoundecyltriethoxysilane (AUTES) was purchased from *Gelest, Inc. (Morrisville, PA, USA)*. Dodecyltrichlorosilane was purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Single stranded siRNA (5'-UAAGGCUAUGAAGAGAUAC-3') was purchased from *Fidelity Systems, Inc., (Gaithersburg, MD, USA)*. Cholesterol, 1-2-dioleoyl-sn-glycerol (DAG), 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (chloride salt) (DOTAP) and 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1-rac-glycerol) (sodium salt) (DMPG) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Poly (styrene-block-N-methyl-4-vinyl pyridinium iodide, (PS_{3.5}-b-PM4VPI_{11.6}), poly (styrene-block-acrylic acid) (PS_{3.2}-b-PAA_{12.5}) and poly (styrene-block-ethylene glycol) (PS_{3.2}-b-PEG_{12.5}), the indexed values correspond to the molecular weight in kDa, were purchased from Polymer Source Inc. (*Montréal, QC, Canada*). SYBR[®] Gold fluorescent cyanine dye was purchased from Thermo Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada).

5.4.1 Liposome preparation

Stock solutions (10-20 mg/mL) of commercial lipids and cholesterol were prepared in chloroform. The lipid stock solutions were combined in a 5 mL round-bottom flask at a 50/50 molar ratio (5 μ mol of lipid and 5 μ mol of cholesterol). The chloroform was removed under reduced pressure and the lipid film was further dried for 1 h under high vacuum to remove any residual solvent. The dried lipid film thus obtained was hydrated with 1 mL of Milli-Q water. This solution was heated to 65 °C and vortexed 2 min to obtain a homogenous suspension of large multilamellar liposomes. The solution was then extruded

11 times through a 200 nm polycarbonate membrane using a LiposoFast manual extruder (Avestin Inc., Ottawa, ON, Canada). Liposome preparations were stored in darkness at 4 °C in microcentrifuge tubes. Cholesterol, DOTAP, DMPG and DAG successfully incorporated in the liposomal formulations were quantified by HPLC-UV/MS using an Agilent 1260 Infinity HPLC equipped with a UV detector and a 6120 single-quad mass spectrometer (Mississauga, ON, Canada). Detailed procedures are summarized in **Table 5.S.1**.

5.4.2 Micelle preparation

Cationic, anionic and uncharged micelles were prepared in water by direct dissolution using PS_{3.5}-b-PM4VPI_{11.6}, PS_{3.2}-b-PAA_{12.5} and PS_{3.2}-b-PEG_{12.5}, respectively. Block copolymers were dissolved in Milli-Q water (0.2 g/L) at pH 10 for PS_{3.2}-b-PAA_{12.5} and pH 5.8 for PS_{3.5}-b-PM4VPI_{11.6} and PS_{3.2}-b-PEG_{12.5}. The resulting micellar suspensions were adjusted to pH 5.8 when required and sonicated for 1h prior to use.

5.4.3 DDS characterization

The hydrodynamic diameter and zeta potential of suspended liposomes and micelles in Milli-Q water before and after co-incubation with ss-siRNA were determined using a dynamic light scattering (DLS, Zetasizer Nano ZS, Malvern Instrument Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) at 20 °C in back-scattering mode. Mean values of triplicates are reported in the result section.

5.4.4 ss-siRNA complexation with DDS and encapsulation efficiency

A SYBR[®] Gold assay was used to quantify the ss-siRNA encapsulation efficiency of the formulations.⁴²⁻⁴⁴ Stock solutions of DDS (liposomes or micelles) and ss-siRNA were diluted in Milli-Q water at appropriate concentrations, for given lipid/ss-siRNA or copolymer/ss-siRNA ratio. DDS suspensions and ss-siRNA solutions were all prepared for a final ss-siRNA concentration of 250 nM. ss-siRNA solutions were added to the DDS suspension followed by brief vortexing. Complexation was allowed to occur for 30 min at room temperature. After complexation, the solutions were centrifuged at 20,000 g for 30

min. ss-siRNA in the supernatant was quantified against a calibration curve of ss-siRNA (20-250 nM), using an excess of SYBR[®] Gold fluorescent cyanine dye ($\lambda_{\text{ex/em}} = 495/537$ nm) and a Safire microplate reader (Tecan, Seestrasse, Switzerland). ss-siRNA encapsulation efficiency (%) was calculated assuming that measured fluorescence intensity at 537 nm corresponds to the unencapsulated ss-siRNA as follow:

$$EE(\%) = \frac{250 \text{ nM} - \text{ss. siRNA in the mixture after centrifugation (nM)}}{250 \text{ nM}} \quad (5.1)$$

The fluorescence emission spectra of SYBR[®] Gold intercaling ss-siRNA with and without DDS were recorded in Safire microplate reader.

The anisotropy of emission fluorescence of SYBR[®] Gold intercaling ss-siRNA with and without DDS were acquired using a Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Varian) and a manual polarizer accessory with an excitation wavelength of 495 nm in Milli-Q water at 20 °C. The fluorescence anisotropy (r) is defined according to the following equation:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2G \cdot I_{VH}} \quad (5.2)$$

where I_{\parallel} and I_{\perp} are the parallel and perpendicular fluorescence and can be accessed by measuring the I_{VV} and I_{VH} which are the fluorescence intensities obtained using vertically polarized excitation light and recording the horizontal (I_{VH}) or the vertical (I_{VV}) fluorescence polarized emission, respectively. The G factor is an instrumental parameter that corrects polarization effects introduced by the fluorescence detecting system and is defined as:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (5.3)$$

where I_{HV} and I_{HH} are the fluorescence intensities, obtained using horizontal polarized exciting light and recording the vertical (I_{HV}) and horizontal (I_{HH}) fluorescence polarized emission, respectively.

5.4.5 Surface preparation

Bare mica, amino-functionalized and hydrophobized mica surfaces were used as model for negatively charged, positively charged and hydrophobic surfaces respectively. All surface manipulations were performed in a clean laminar airflow cabinet in order to prevent dust deposition on the surfaces. All glassware was carefully cleaned in a bath of KOH-saturated isopropyl alcohol and then rinsed intensively with Milli-Q water and ethanol.

Surface activation of mica substrate: Water/argon plasma activation was used to generate silanol groups on the mica surfaces as previously reported.⁴⁵ Briefly, freshly cleaved mica surfaces were placed in a plasma chamber under a vacuum pressure of 0.5 mTorr. Argon and water vapor were then introduced at partial pressures of 80 mTorr and 300 mTorr respectively. Plasma activation was performed for 5 min at 40 W then, mica surfaces were left in the plasma chamber under vacuum (0.5 mTorr) for 5 min. The mica surfaces were removed from the chamber and immediately used for grafting procedures.

Amino-functionalization of mica substrates: AUTES solution of 1 mM was prepared in absolute ethanol and stirred for 30 min. Immediately after this step, activated mica substrates were immersed into the AUTES solution for 20 min. The resulting AUTES-functionalized surfaces were thoroughly rinsed with anhydrous ethanol. The AUTES grafting was completed by annealing the substrates for 30 min at 120 °C under atmospheric pressure.

Hydrophobization of mica substrate: Hydrophobic monolayers made of dodecyltrichlorosilane were grafted to activated mica substrates. A solution of 100 mM of dodecyltrichlorosilane in dry toluene was stirred 1 h then filtered on 0.2 µm polytetrafluoroethylene (PTFE) filter. Immediately after the activation, the substrates were immersed in the dodecyltrichlorosilane solution under inert atmosphere. After 2 h, the substrates were removed and rinsed with dry toluene, dried with nitrogen and annealed for 1 h in 120 °C under atmospheric pressure.

ss-siRNA adsorption on substrate: A drop of ss-siRNA solution (5 μM in Milli-Q water, filtered with a sterile Anotop 10 syringe filter, 0.02 μm) was deposited on the substrates and covered with a glass slide to spread it. After 2h of adsorption, the surfaces were gently washed with Milli-Q water and dried with nitrogen.

5.4.6 Surface characterization

5.4.6.1 Atomic Force Microscopy (AFM)

AFM imaging was carried out using a Multimode microscope equipped with a Nanoscope V extend controller (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) at room temperature and in ambient air. The surfaces were imaged in the tapping-mode using a silicon cantilevered tip from AppNano with a resonance frequency of 200-400 kHz and a spring constant between 25 and 75 N/m. AFM images were treated and analyzed using Nanoscope Analysis (version 1.4) software. All the AFM topography images presented in the result section are representative of several areas of a given substrate. The roughness of the surfaces was determined and averaged by extracting the root mean square (RMS) on a minimum of three different areas of various scan size.

5.4.6.2 Contact angle measurement

Static water contact angle on the different functionalized substrates were measured using a FTA200 dynamic contact angle analyzer (First Ten Angstrom). All measurements were carried out in the static mode. A droplet of Milli-Q water (3-5 μL) was deposited on the surfaces and a clear picture of it was taken and used to determine the contact angle within an error of $\pm 0.6^\circ$. Fta32 Video software was used for data analyses. The contact angles were measured on three different areas of a given substrate and the mean value is reported in the result section. An increase in water contact angle is expected to occur after the immobilization of alkylsilane owing to the hydrophobic character of the grafted alkyl chain.⁴⁶

5.4.6.3 Zeta potential measurements on planar surfaces

Zeta potential on flat bare mica and AUTES-functionalized mica substrates were done using Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instrument Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) at 25 °C using the Surface Zeta Potential Cell with a solution of tracer. The pH of tracer solution was adjusted using HCl.

5.4.6.4 Force-Distance measurements

The normal interaction forces between the surfaces were measured as a function of separation distance using a SFA 2000 and a Mark II Surface Forces Apparatus (SFA) at 25°C. The SFA and detailed experimental procedures for measuring the normal forces are well described elsewhere.⁴⁷ In brief, back-silvered molecularly smooth mica surfaces are glued onto two cylindrically curved silica lenses of radius $R = 2$ cm. A force–distance profile between the surfaces is obtained by changing the position of the lower surface, using a nanopositioner. An interferometry technique using Fringes of Equal Chromatic Orders (FECO) is used to determine the separation distance between the surfaces with subnanometric resolution.⁴⁸ The interaction forces is then determined from the deflection of the spring using Hooke’s law. Prior to all experiments, two bare substrates (mica surfaces) were brought into adhesive contact in air in order to determine the reference position ($D=0$). The SFA disks were dismounted under a laminar-flow cabinet when surface modification was required. After the surface functionalization, the disks were mounted back in the SFA chamber for determining the force-distance profiles between the two surfaces. For the force measurements across water, a droplet of pure water (Milli-Q water) was injected between the surfaces and the system was allowed to equilibrate for 1 h prior to measurements. After the force measurements, water was replaced by ss-siRNA solution of 5 μ M in Milli-Q water (filtered with a sterile Anotop 10 syringe filter, 0.02 μ m) and the system was allowed to equilibrate for 2 h. The force-distance profiles across ss-siRNA solution were measured step-wise during approach and separation of the two surfaces. Each separation distance was measured at equilibrium, which was arbitrarily set for a distance variation of less than 0.3 nm/min.

The directly measured force F between the cylindrically curved surfaces can be related to the free energy of interaction per unit area between two infinite flat surfaces E_{Flat} using the Derjaguin approximation:⁴⁹

$$E_{Flat} = \frac{F}{2\pi R} \quad (5.4)$$

where F is the measured force and R the radius of the surfaces. The electrostatic forces were analyzed using the nonlinear Poisson-Boltzmann equation (PB) using constant surface potential boundary conditions. The Debye length was extracted from the exponential decay slope of the force-distance measurements at long separation distance and the surface potential was used as variable parameter. To calculate the apparent electrostatic force across the adsorbed ss-siRNA layers, they were considered as homogeneous layers of thickness corresponding to half the separation distance at close contact (D_c). Therefore, the exponential fitting to the long-ranged forces was done assuming that the effective surface potential is at $D_c/2$ away from each substrate.

5.5 Results and Discussion

5.5.1 Substrate characterization

The three model surfaces were characterized in order to confirm their difference in surface properties especially the hydrophilicity and surface potential. The smooth freshly cleaved mica substrate resulted in a purely hydrophilic surface with a water contact angle of 0° (**Table 5.1, Figure 5.1b**). As expected, the mica surface was negatively charged in aqueous media at pH 7 with a zeta potential of -48 mV (**Table 5.1**). Mica substrates were then functionalized in order to prepare hydrophobic and positively charged supported SAMs. The hydrophobized mica substrate resulted in a smooth hydrophobic monolayer with a water contact angle of 107° and a thickness of 2.1 nm (**Table 5.1**). The positively charged amino-functionalized mica substrate also displayed a smooth surface with a water contact angle of 78° , a surface zeta potential of $+40$ mV and a thickness of 1.5 nm (**Table 5.1**). The non-null contact angle is associated with a small portion of the alkyl chain of aminoalkylsilane molecules which can be exposed to the aqueous surrounding

environment, as previously demonstrated.⁵⁰ Hydrophobic monolayers remained stable in water over several days (**Figure 5.S.2**) as also observed for amino-functionalized monolayers.⁵⁰

Table 5.1 : Characterization of the substrates.

Surface	Static water contact angle, $\theta_{\text{water}} (^{\circ})$	Surface zeta potential, ζ (mV) ¹	Thickness (nm) ²	Surface roughness, RMS (nm) ³
Bare mica	0	-48 ± 2	0	0.07 ± 0.01
Amino-functionalized mica	78 ± 2	$+40 \pm 4$	1.5 ± 0.2	0.08 ± 0.01
Hydrophobized mica	107 ± 3	-	2.1 ± 0.4	0.20 ± 0.05

¹determined by Zetasizer with flat surface cell at pH 7.

²determined from the distance of closest approach in water by SFA.

³Root Mean Square, RMS: determined from AFM images $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ scan size. Each experimental data represents the mean from a minimum of three measurements on two independent samples and the errors (\pm) represent the standard deviation of the mean.

5.5.2 ss-siRNA interactions with the surfaces

To establish a well-defined reference frame for the experiments, the forces between the bare and the functionalized substrates in water in absence of ss-siRNA were first measured. The reported force-distance profiles correspond to the first surface approach across Milli-Q water or ss-siRNA solution. The forces were also measured on separating the surfaces but are not reported as the system could be perturbed during the first compression and would not been representative of the non-perturbed ss-siRNA/substrate interactions. Briefly, adhesion was observed on separation for the three model surfaces and decreased after exposure to ss-siRNA (**Figure 5.S.3**).

5.5.2.1 Mica surface

The force-distance profile measured between two bare mica surfaces across Milli-Q water clearly exhibits the long-range exponential decay that is characteristic of electrostatic double-layer interactions (**Figure 5.1a**). The effective negative surface potential (ψ_0) was estimated to 90 ± 22 mV using Poisson-Boltzmann equation with a Debye length of 27 ± 11 nm. This value is in good agreement with the previously reported

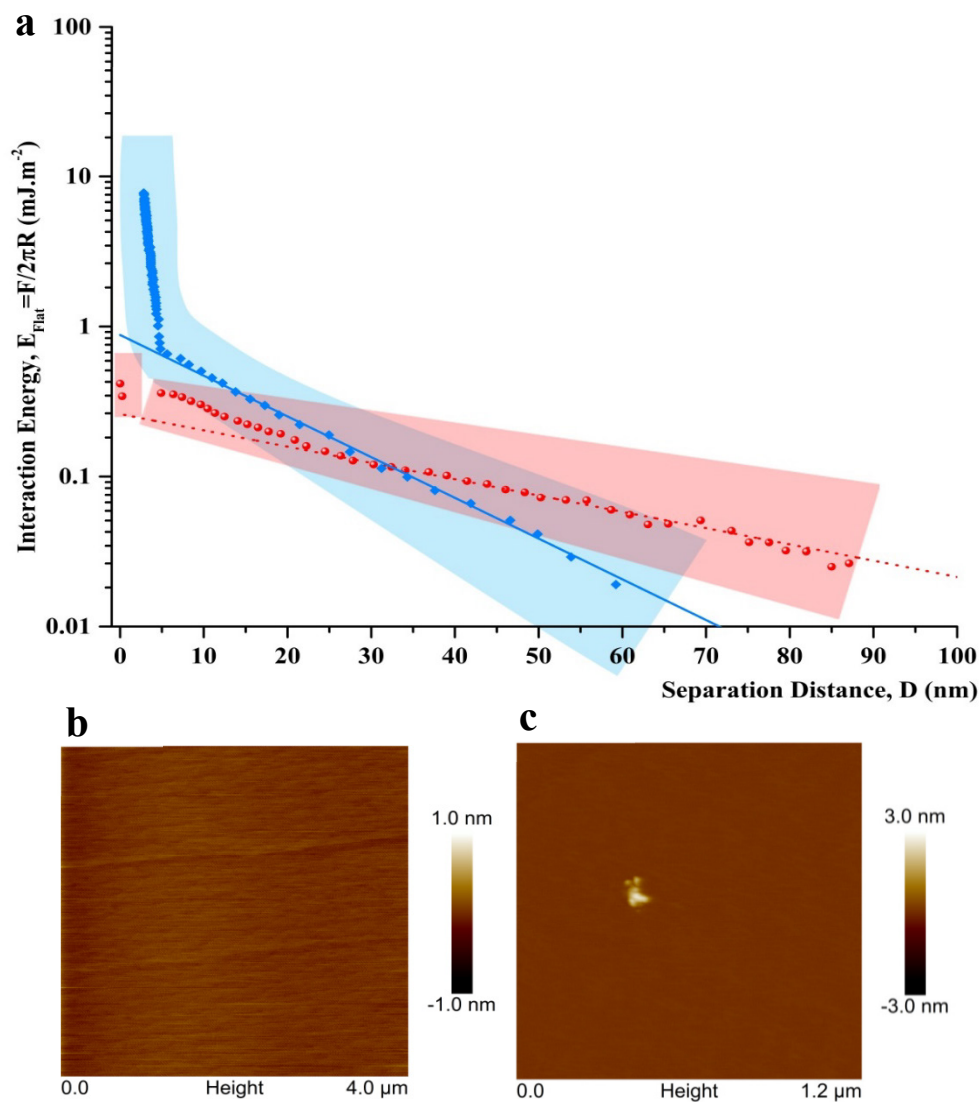


Figure 5.1 : (a) Normalized force profiles between two mica surfaces measured on the very first approach, across Milli-Q water (●) and across the ss-siRNA solution after 2 h of immersion (◆). $D = 0$ corresponds to the contact between mica surfaces in air. The dotted and solid curves correspond to the calculated electrostatic interactions using the Poisson-Boltzmann (PB) equation with a negative surface potential ψ_0 of 115 mV (...) and 155 mV (—) and a Debye length κ^{-1} of 40 nm (...) and 16 nm (—) at room temperature. The shaded areas represent the variability in the measured force profiles and the most representative profile is illustrated. AFM images in air of (b) mica (c) mica after 20 h of immersion in the ss-siRNA solution followed by water rinsing.

surface potential between mica surfaces across water.⁵¹ At short separation distances, the attraction between mica surfaces is evidenced by a discontinuity in force profile from 5.0

± 0.4 nm to $D = 0$ nm due to van der Waals attractive interactions (**Figure 5.1a**). Such discontinuity arises when the gradient of the force (dF/dD) exceeds the stiffness of the force measuring spring. The force-distance profile measured between mica surfaces across ss-siRNA solution is purely repulsive and also exhibits long-range electrostatic forces (**Figure 5.1a**). However, at smaller separation distances ($D < 5$ nm) the force deviates significantly, becoming increasingly repulsive upon decreasing separation distance. The additional repulsive force (compared to the forces in water) and the absence of discontinuity in the force profile indicate that the ss-siRNA is adsorbed to the mica surfaces. Attraction between oligonucleotides and mica in the presence of multivalent cations has already been predicted from counterion condensation theory.⁵²⁻⁵⁴ However, to the best of our knowledge, this is the first experimental evidence of attractive interaction (or adhesion) between negatively charged mica surfaces and oligonucleotides in water. As ss-siRNA is expected to adsorb on both mica surfaces, the distance of closest approach (ca 3.3 nm) is assumed to correspond to twice the thickness of immobilized oligonucleotides. The thickness of one adsorbed layer is close to the estimated radius of gyration (R_g) of 19-bases RNA single strand in water ($R_g = 1.5$ nm)⁵⁵ suggesting that adsorbed ss-siRNA forms a monolayer. The effective negative surface potential ψ_0 at the ss-siRNA/water interface was estimated to 147 ± 8 mV using Poisson-Boltzmann equation with a Debye length κ^{-1} of 15.5 ± 0.5 nm (**Figure 5.1a**). The relatively large surface potential, compared that of the bare mica substrate, can be attributed to the exposure of charged PO_3^{3-} groups of RNA strands at the water/surface interface. Therefore, the interaction of ss-siRNA with mica most probably occurs through a combination of (i) attractive hydrogen bonding between the nucleobases and ribose of the ss-siRNA and the SiO^-/SiOH groups of mica and (ii) attractive electrostatic interactions between the expected charged amino groups of nucleobases⁵⁶ and the SiO^- groups of mica. The presence of hydrogen bonding between ss-DNA and an uncharged hydrophilic surface (composed of hydroxyl-terminated oligoethyleneglycol) has been evidenced by a simulation study.³⁶ Such interactions would suggest that the ss-siRNA interact with mica surfaces through the opposite nucleobases face as illustrated in **Figure 5.2c**. However, the adsorbed ss-siRNA was easily removed from the mica surface by water rinsing as the substrate recovered the bare mica topography

(Figure 5.1c). This suggests that the electrostatic repulsions between the negatively charged mica and the negatively charged ss-siRNA prevail over the hydrogen bonding.

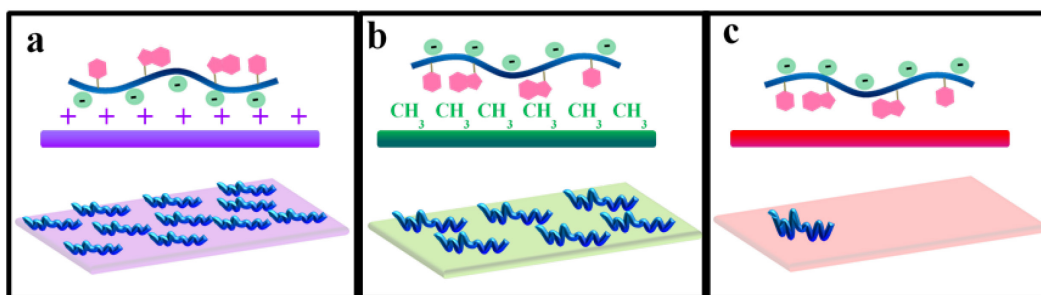


Figure 5.2 : Schematic representations of the conformation of adsorbed ss-siRNA on (a) amino-functionalized mica, (b) hydrophobized mica and (c) bare mica deduced from surface force measurements and AFM images.

5.5.2.2 Hydrophobized-mica surface

The force-distance profile measured between two hydrophobized mica surfaces (prepared from dodecyltrichlorosilane) across Milli-Q water is purely attractive (**Figure 5.3a**). The long-range attraction is evidenced by a discontinuity in force profile from 3000 nm to $D = 4.0 \pm 0.4$ nm. This long-range attractive interaction is characteristic of hydrophobic interactions across polar media.⁵⁷⁻⁵⁹ The distance of closest approach (4 nm) corresponds to twice the thickness of one hydrophobic monolayer (**Figure 5.3a**). The force-distance profile between hydrophobized surfaces across the ss-siRNA solution is purely repulsive and well described by the electrostatic double-layer forces shown by the solid line fitted to the data points in **Figure 5.3a**. The force deviates from the double-layer repulsions for separation distance smaller than 30 nm and becomes increasingly repulsive upon decreasing separation distance. This additional repulsive force (compared to the forces in water) and the presence of well-defined hard wall at ca 8 nm clearly indicate the presence of adsorbed ss-siRNA on the hydrophobized substrates. The distance of closest approach is close to twice the estimated radius of gyration of ss-siRNA in water⁵⁵ suggesting the adsorption of ss-siRNA into a monolayer under high compression. The adsorption of ss-siRNA is also evidenced by a change in the surface topography upon ss-siRNA exposition, which persisted even after intensive water rinsing (**Figure 5.3b and c**).

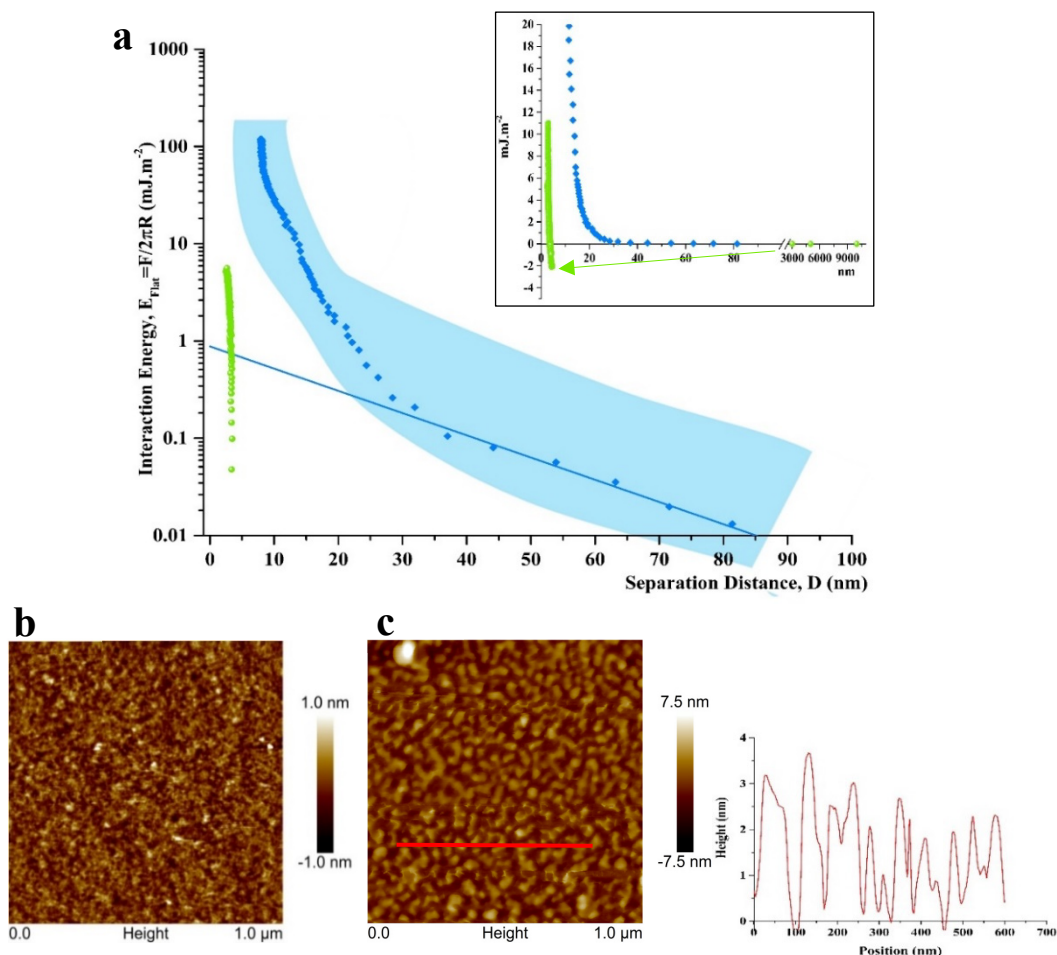


Figure 5.3 : (a) Normalized force profiles between two hydrophobized mica surfaces, measured on the very first approach, across Milli-Q water (●) and across the ss-siRNA solution after 2 h of immersion (◆). The long-range forces across Milli-Q water, illustrated in the inset, are purely attractive as evidenced by a discontinuity in the force profile from $D=3 \mu\text{m}$ to $D=4 \text{ nm}$ represented by the arrow. $D=0$ corresponds to the contact between mica surfaces in air. The solid curve corresponds to the calculated electrostatic interactions using the Poisson-Boltzmann (PB) equation with a negative surface potential ψ_0 of 140 mV (—) and a Debye length κ^{-1} of 19 nm (—) at room temperature. The shaded areas represent the variability in the measured force profiles and the most representative profiles are illustrated. AFM images in air of (b) hydrophobized mica and (c) hydrophobized mica after 2 h of immersion in the ss-siRNA solution followed by water rinsing, with the corresponding cross section analysis.

The effective negative surface potential ψ_0 estimated from the Poisson-Boltzmann equation ($133 \pm 8 \text{ mV}$) and can be attributed to the exposure of the charged PO_3^{3-} groups of RNA strands to the aqueous environment. Here again, these results suggest that the oligonucleotide interacts with hydrophobized mica surfaces through the opposite

nucleobases face as illustrated in **Figure 5.2b**. Hydrophobic interactions most probably occur through the alkyl chains of hydrophobic SAMs and the aromatics groups of the bases. These results correlate well with the previously reported simulation study showing attractive hydrophobic interactions between the strand face carrying nucleobases and a hydrophobic surface.³⁶

5.5.2.3 Amino-functionalized mica surface

The force-distance profile measured between two amino-functionalized mica surfaces across Milli-Q water is illustrated in **Figure 5.4a**. An effective positive surface potential was observed on these surfaces (**Table 5.1**) suggesting that the amino groups of the AUTES monolayers are protonated in Milli-Q water, as previously reported,⁵⁰ and should give rise to exponentially decaying electrostatic repulsions. However, such interactions were not detectable because of the important contribution of long-ranged attractive interactions (ca 300 nm) most probably arising from hydrophobic interactions between the apposing alkyl chains of the two AUTES monolayers. At short separation distances (< 10 nm), the strong attraction between the surfaces is evidenced by a discontinuity in force profile from $D = 10 \pm 1$ nm to 5.0 ± 0.5 nm which also includes van der Waals interactions (**Figure 5.4a**). The distance of the closest approach between the amino-functionalized substrates is observed at 3.0 ± 0.2 nm (**Figure 5.4a**) corresponding to twice the thickness of an AUTES monolayer previously determined.⁵⁰ The force-distance profile between two amino-functionalized mica surfaces across the ss-siRNA solution is purely repulsive but does not exhibit long-range exponential decaying forces (**Figure 5.4a**) suggesting the presence of steric forces associated with the adsorbed ss-siRNA. The distance of closest approach is shifted from 3.0 ± 0.2 nm (in pure water) to 6.0 ± 0.2 nm (**Figure 5.4a**). This shift corresponds to two ss-siRNA adsorbed layers of 1.5 nm each. The ss-siRNA adsorption was confirmed by the obvious change in the surface topography of the amino-functionalized substrates observed after ss-siRNA exposition (**Figure 5.4b and c**). In addition, ss-siRNA remained adsorbed after water rinsing indicating the robustness of the adsorption (**Figure 5.4c**). The absence of long-range electrostatic repulsions between the ss-siRNA covered amino-functionalized surfaces suggests a neutral ss-siRNA/water interface that could be associated with the exposition of

the nucleobase face to the aqueous environment as illustrated in **Figure 5.2a**. In such a conformation, ss-siRNA is likely adsorbed via electrostatic interactions between the positively charged amino groups of the SAMs and the negatively charged phosphate ribbon as previously reported for double strand DNA.⁶⁰ This would lead to a neutralization and/or screening of the charges across the adsorbed ss-siRNA layer on each surface.

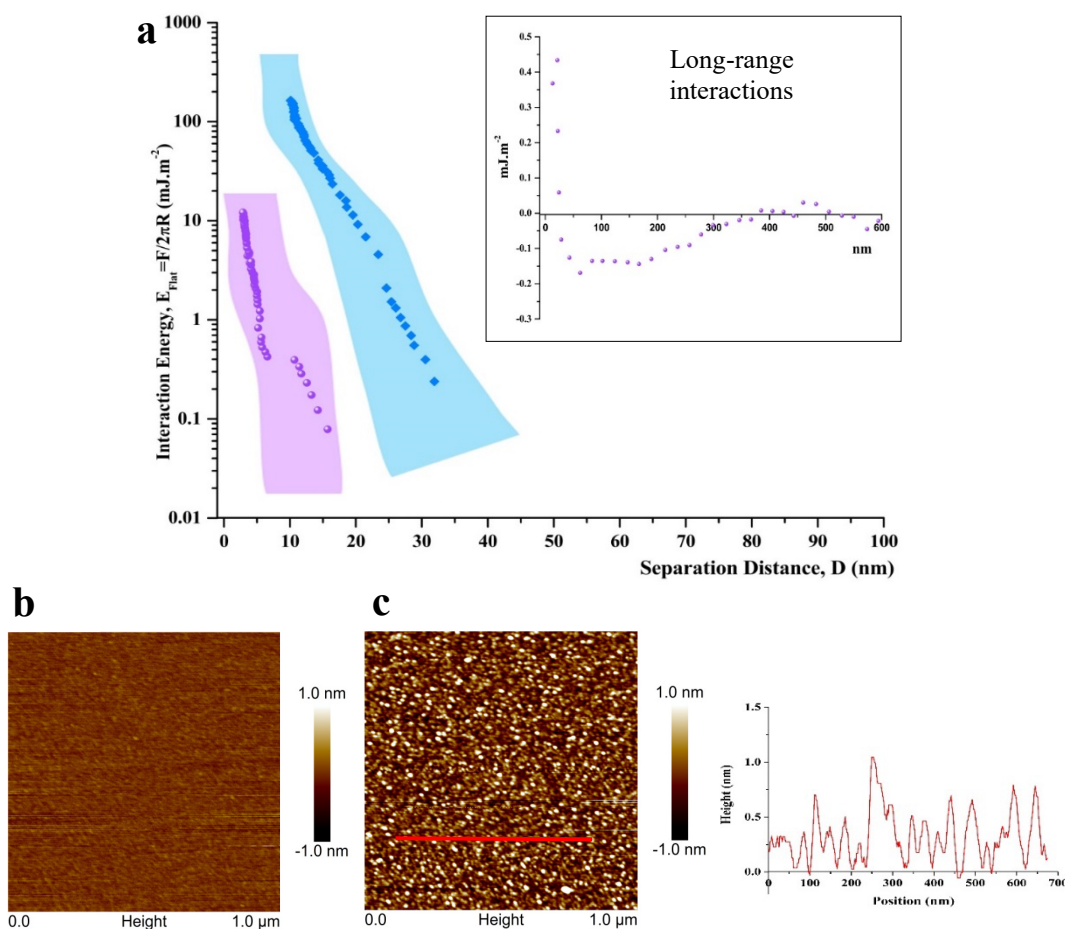


Figure 5.4 : (a) Normalized force profiles between two amino-functionalized mica surfaces, measured on the very first approach, across Milli-Q water (●) and across the ss-siRNA solution after 2 h of immersion (◆). Inset graphic corresponds to the long-range forces across Milli-Q water. $D = 0$ corresponds to the contact between mica surfaces in air. The shaded areas represent the variability in the measured force profiles and the most representative profiles are illustrated. AFM images in air of (b) amino-functionalized mica and (c) amino-functionalized mica after 2 h of immersion in the ss-siRNA solution following by water rinsing with the corresponding cross section analysis.

5.5.3 ss-siRNA interactions with DDS

SFA experiments allowed the contribution of hydrogen bonding and hydrophobic interactions in the ss-siRNA adsorption, in addition to electrostatic forces, to be confirmed. To verify whether these interactions could also be observed on more complex systems, such a DDS, and affect their loading capacity, liposomes and micelles of different compositions and surface charges were prepared, as illustrated in **Figure 5.5**. 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (chloride salt) (DOTAP) and 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1-*rac*-glycerol) (sodium salt) (DMPG), 1-2-dioleoyl-*sn*-glycerol (DAG) were used to prepare cationic, anionic and uncharged liposomes respectively using cholesterol as co-lipid (**Table 5.S.2**). Zeta potential measurements confirmed their surface charge prior to ss-siRNA (**Table 5.2**). The unexpected negative potential measured for the DAG liposomes most probably arises from the hydroxyl group of the hydrophilic head of DAG. Polymeric micelles were prepared using copolymers composed of a poly(styrene) (PS) hydrophobic block and a longer hydrophilic block of poly(N-methyl-4-vinyl pyridinium iodide) (PM4VPI), polyacrylic acid (PAA) and polyethyleneglycol) (PEG) to prepare cationic, anionic and uncharged micelles, respectively. Here again, the surface charge before ss-siRNA complexation was confirmed by zeta potential measurements (**Table 5.2**). Although incubation of ss-siRNA with DDS induced slight modifications of the diameter and charge of the DDS, all liposomal and micellar formulations loaded with ss-siRNA were stable at least over one day in Milli-Q water (**Table 5.2**).

ss-siRNA complexation was assessed indirectly by the interaction of unencapsulated ss-siRNA with the SYBR[®] Gold fluorescent dye. SYBR[®] Gold is an unsymmetrical cyanine dye positively charged due to the presence of tertiary amine groups that exhibits >1000-fold fluorescence enhancement upon intercalating to nucleic acids (double- or single-stranded DNA or to RNA).^{42, 61-63} Fluorescence intensity is therefore directly correlated to the amount of accessible ss-siRNA in the solution and is normalized by the fluorescence of a 250 nM ss-siRNA solution with an excess of dye (**Figure 5.5**)

Unsurprisingly, cationic DDS were very efficient to complex ss-siRNA, reaching 95% and 100% of encapsulated material (**Equation 5.1**) for cationic liposomes and

Table 5.2 : Characterization of DDS formulations before and after ss-siRNA complexation in Milli-Q water

	Before co-incubation		After 30 min of co-incubation		After 24 h of co-incubation	
	Diameter (nm)	Zeta potential (mV)	Diameter (nm)	Zeta potential (mV)	Diameter (nm)	Zeta potential (mV)
Liposomal formulation						
Cationic (DOTAP)	263 ± 3	22 ± 2	113 ± 1	-20 ± 1	115 ± 1	-18 ± 1
Anionic (DMPG)	212 ± 8	-30 ± 1	311 ± 7	-40 ± 1	302 ± 3	-40 ± 1
Uncharged (DAG)	165 ± 3	-24 ± 2	238 ± 1	-43 ± 2	236 ± 3	-43 ± 3
Micellar formulation						
Cationic (PS-b-PM4VPI)	95 ± 1	58 ± 1	99 ± 1	48 ± 2	99 ± 1	50 ± 2
Anionic (PS-b-PAA)	238 ± 6	-39 ± 1	170 ± 3	-38 ± 2	164 ± 3	-41 ± 2
Uncharged (PS-b-PEG)	93 ± 1	-12 ± 1	96 ± 1	-12 ± 1	95 ± 1	-11 ± 1

ss-siRNA/DDS complexations were done in Milli-Q water at room temperature for 14.3 μ M lipids, 11.9 μ M copolymers and 250 nM ss-siRNA. Each experimental data represents the mean from a minimum of three measurements on one sample and the errors (\pm) represent the standard deviation of the mean.

micelles, respectively (**Figure 5.5a and d**). This is consistent with the widespread knowledge that an excess of cationic charge enables full complexation of oligonucleotides and promotes colloidal stability. The interaction most probably results from the complementary electrostatic nature of nucleic acid with cationic DDS as previously reported for double stranded siRNA complexation.⁶⁴ This is confirmed by the change in the formulation size and the decrease in zeta potential for both systems (**Table 5.2**). The larger decrease in the surface potential of the liposomes compared to micelles is attributed to the significant difference in the charge excess between cationic liposomes (nitrogen/phosphorus ratio, N/P: 1.5) and micelles (N/P: 100). In fact, the surface charge of cationic micelles/ss-siRNA complex decreases with a decrease in N/P ratio and becomes negative for N/P lower than 1.5 (**Figure 5.S.4**). The different variations in the formulation size for the cationic DDS (**Table 5.2**) suggest different complexation mechanisms. The size of cationic liposomes decreased when incubated with ss-siRNA whereas cationic micelles diameter slightly increased. The systematic decrease in zeta potential of the

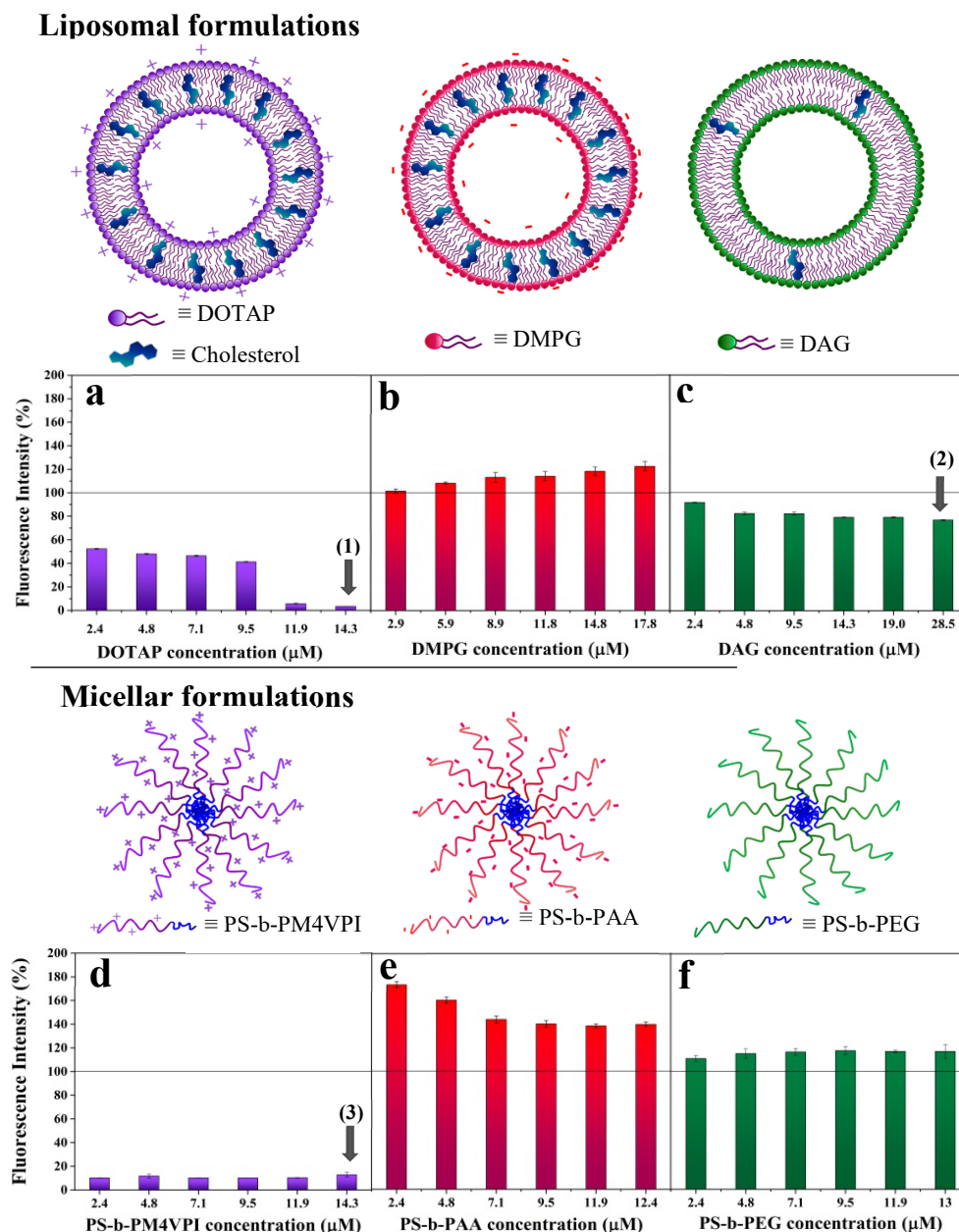


Figure 5.5 : Normalized fluorescence intensity (%) of the dye/ss-siRNA system in Milli-Q water with DDS as a function of concentration of (a) DOTAP, (b) DMPG and (c) DAG lipids for cationic, anionic and uncharged liposomes, respectively with their schematic representations and (d) PS-b-PM4VPI, (e) PS-b-PAA and (f) PS-b-PEG for cationic, anionic and uncharged micelles, respectively with their schematic representations. Fluorescence intensity was recorded at 537 nm and normalized to that of the dye/ss-siRNA system in Milli-Q for ss-siRNA concentration of 250 nM without DDS corresponding to 100% (indicated by horizontal dashed lines). Black arrows (1), (2) and (3) correspond to ss-siRNA encapsulation efficiency of 95%, 20% and 100%, respectively calculated using Equation 5. 1.

cationic DDS upon ss-siRNA complexation (**Table 5.2**) suggests that ss-siRNA interacts with the hydrophilic head groups at the surface of the DDS. Therefore, the interactions between ss-siRNA and the cationic DDS most probably occur through electrostatic interactions between the negatively charged ss-siRNA and the positively charged headgroups of the DDS as usually observed with cationic carriers.^{23, 28, 65} The variation in size of self-assembled structures can be explained by surface curvature changes. A decrease in micelle size is usually explained by a relative reduction of the hydrophobic volume forming the core, a reduction of the aggregation number or an increase in the effective head group area, which corresponds to the area occupied by the hydrophilic moiety of the amphiphilic molecule. For the liposomes, the size decrease may arise from an increase in the effective area of the hydrophilic head groups in the outermost membrane layer due to the partial insertion of the ss-siRNA between the head groups. The slight increase in micelle size upon complexation can be attributed to a reduction in the effective area of the hydrophilic head groups, which would imply a minimal insertion of the nucleotide within the hydrophilic shell. This would suggest that the nucleotide remains complexed at the outermost micelle surface. Such reduction in the effective head group area can be due to charge neutralization, as evidenced by the slight decrease in zeta potential (**Table 5.2**), leading to a reduction of the electrostatic repulsions between the head groups. This proposed mechanism is supported by the fact that an increase in the quantity of complexed ss-siRNA led to a decrease in the surface potential together with an increase in the formulation size (**Figure 5.S.4**).

With the uncharged liposomes, the normalized fluorescence intensity decreased with increasing lipid concentration and suggests a maximum encapsulation efficiency of 20% (**Figure 5.5c**). ss-siRNA association with uncharged liposomes was confirmed by the significant swelling of the liposomes and their stronger negative surface potential (-43 mV, **Table 5.2**). The swelling is most probably due to a change in the bilayer curvature caused by the partial insertion of the nucleotide and an increase in the membrane rigidity. This would suggest the presence of interactions between the nucleotide and the neutral lipids. These interactions can be hydrogen bonding between the nucleobases and the lipid head groups and/or hydrophobic interactions between the nucleobases and the hydrophobic core

of the lipid bilayer as deduced from the force measurements (**Figure 5.2b**). Surprisingly, the behaviour was significantly different for uncharged micelles. Indeed, for the uncharged micelles as well as the anionic DDS (both liposomes and micelles), the fluorescence intensity exceeds 100% (**Figure 5.5b, e and f**) indicating that the fluorescence quantum yield of the dye/ss-siRNA system is larger than that of the reference system. It has to be noted that all samples were centrifuged after incubation with ss-siRNA in order to sediment DDS. However, neither aggregation nor precipitation was evidenced even after an extended period of centrifugation (2 h at 20 000 g, data not shown) for all liposome and micelle formulations. Therefore, ss-siRNA/DDS complexes can be present in the solution biasing the fluorescence measurements. As a control, no fluorescence of ss-siRNA/DDS or dye/DDS mixtures was detected for all DDS as presented for the anionic liposomes (**Figure 5.S.5b and c**). We further investigated this unexpected phenomenon by recording the full emission spectrum of the three mixtures, uncharged micelles as well as the anionic DDS (**Figure 5.6**). Interestingly, compared to the reference, the maximum in the fluorescence emission spectra of the dye/ss-siRNA/anionic DDS mixture is clearly shifted to red and blue wavelengths for the anionic liposomes and micelles, respectively (**Figure 5.6a and b**) suggesting that the nucleotide is localized closer to a polar and a less polar environment for the liposomes and the micelles respectively. The increase in quantum yield and the shift in the maximum wavelength evidence a close interaction between the three partners (dye, ss-siRNA and anionic DDS). These control experiments (**Figure 5.S.5**) suggest that the three partners are required to interact closely, resulting in a higher quantum yield of the dye/ss-siRNA/DDS system than the dye/ss-siRNA. Since SYBR[®] Gold possesses tertiary amines, its interaction with negatively charged ss-siRNA and anionic DDS could be enhanced by electrostatic interactions.

To confirm that the dye and the ss-siRNA are complexed together with the DDS, the fluorescence anisotropy was measured. This technique has been used to monitor the behaviour of lipid membranes and self-assemblies. It is sensitive to the motion of the probe itself as well as the motion of whole self-assemblies when the probe is associated with them.^{66,67} The fluorescence anisotropy of ss-siRNA complexed to SYBR[®] Gold with and without the presence of the different DDS were compared (**Figure 5.6d**). A small value of

anisotropy (referred to r , see **Equation 5.2**) indicates a low degree of polarization, and therefore, a less rigid environment of the probe.⁶⁷ The dye/ss-siRNA exhibited a low r value of 0.063 in the absence of DDS (**Figure 5.6d**), indicating a high mobility of the ss-siRNA in solution. In the presence of cationic liposomes, anionic liposomes and neutral micelles, the r values were close to this reference value suggesting that the fluorescence emission mainly comes from the remaining dye/ss-siRNA complex localized outside of the DDS. However, with the uncharged liposomes as well as with the anionic DDS (both micelles and liposomes), significantly larger r values were observed (**Figure 5.6d**), reaching 0.20 for anionic micelles. These higher values mean that the dye/ss-siRNA exhibited a lower mobility, suggesting that the dye interacted with ss-siRNA already complexed to the DDS. These results confirm that the fluorescent emission of the dye/ss-siRNA system does not result only from non-complexed ss-siRNA but also from the ss-siRNA complexed with DDS. Therefore, the change in fluorescence quantum yield of the dye/ss-siRNA system immobilized in DDS does not allow accurate quantification of the encapsulation. In particular, the complexation efficiency of uncharged liposomes (ca; 20 %, **Figure 5.5c**) was most probably underestimated as the measured fluorescence can result from encapsulated and free dye/ss-siRNA system. The fluorescence anisotropy of the dye/ss-siRNA system can also provide information about the localization of the ss-siRNA in the DDS. The hydrophobic core of a micelle is known to be more rigid than its hydrophilic shell,⁶⁷ and could contribute to the large r values observed with the anionic micelles, in addition to increasing amounts of complexed dye/ss-siRNA/DDS. In addition, the blue shift of the maximum of fluorescence emission of the dye/ss-siRNA/anionic micelle system indicates a less polar environment of the dye (**Figure 5.6b**). Therefore, fluorescence data clearly indicate that the ss-siRNA is localized inside the hydrophobic core. The variation in zeta potential of the anionic micelles upon ss-siRNA encapsulation (**Table 5.2**) supports that observation. The fluorescence anisotropy is relatively less pronounced for the other DDS and therefore, it is not possible to use such data to conclude about the localization of the nucleotide in these DDS.

The complexation of ss-siRNA with anionic liposomes (DMPG) and with anionic micelles led to an increase and a decrease in the formulation size, respectively (**Table 5.2**).

This suggests that the nature of the interactions and the localization of the nucleotide are different for both formulations. In the case of liposomes, the increase in the formulation size is most probably due to a change in the bilayer curvature, i.e., a decrease in the effective head group area, caused by the ss-siRNA complexation of the nucleotide and an increase in the membrane rigidity. As fluorescence data suggested that the nucleotide is localized closer to a polar environment (**Figure 5.6a**), the interactions between the nucleotide and

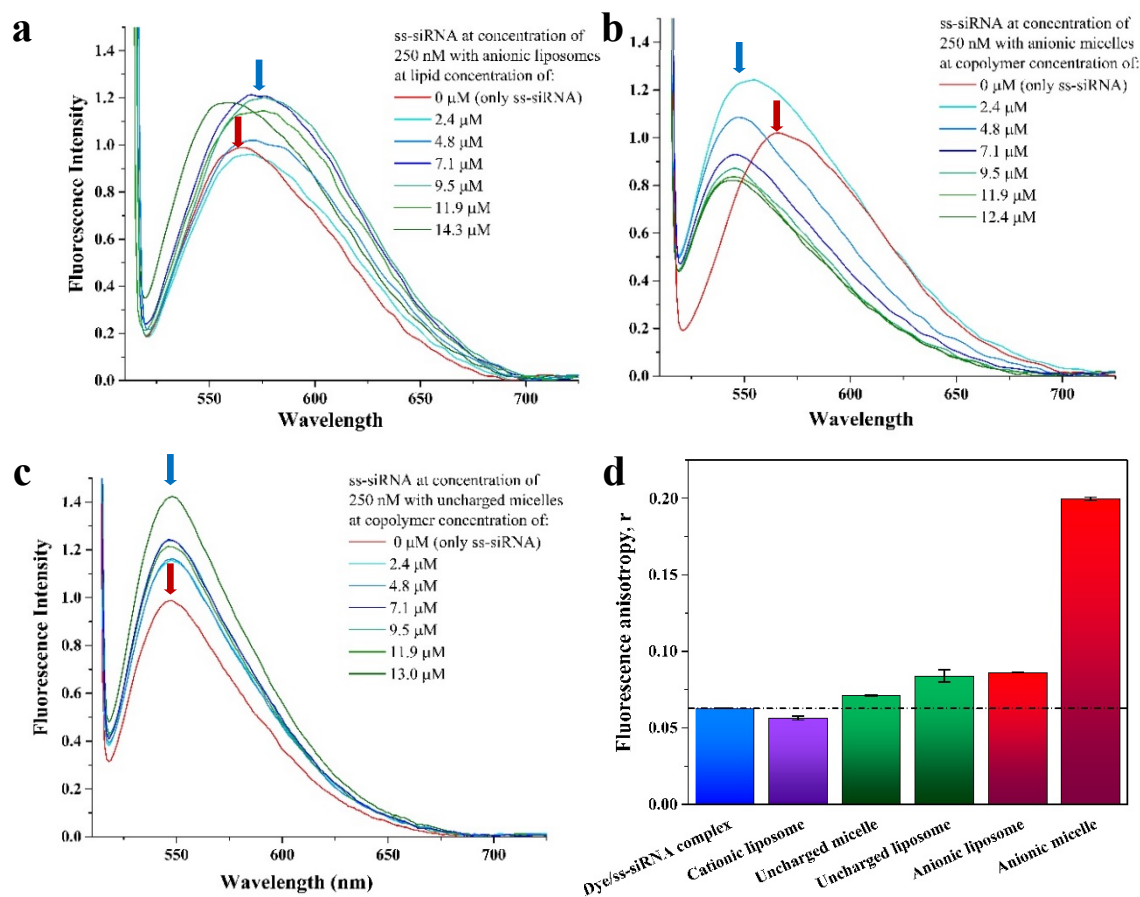


Figure 5.6 : Normalized fluorescence emission spectra resulting from dye/ss-siRNA system in Milli-Q water in the presence of **(a)** anionic liposomes, **(b)** anionic micelles and **(c)** uncharged micelles. Fluorescence intensity was normalized to that of the dye/ss-siRNA system in Milli-Q for ss-siRNA concentration of 250 nM without DDS. **(d)** Fluorescence anisotropy (r) of the dye/ss-siRNA system without and with DDS with a lipid and copolymer concentrations of 11.9 μM and a ss-siRNA concentration of 250 nM. Dashed-dot line indicated the fluorescence anisotropy resulting of the free dye/ss-siRNA system for a ss-siRNA concentration of 250 nM. Fluorescence anisotropy (r) of the dye/ss-siRNA system with cationic micelles is not reported as any significant fluorescence intensity can be measured as presented in **Figure 5.5d**.

the anionic headgroups of the lipids most probably prevail. These interactions can be hydrogen bonding and electrostatic interactions between the positively charged nucleobases and the negatively charged lipids as deduced from the force measurements (**Figures 5.2c and 5.1a**). The attractive electrostatic interactions between the oppositely charged entities would decrease the effective charge of the anionic head groups leading to a decrease in the head group area. This proposed mechanism is supported by the variation in zeta potential as the conformation of ss-siRNA resulting from these interactions would decrease the effective charge of the lipid head groups but also bring important negative charges at the liposome surface. The decrease in the anionic micelles size occurred concomitantly with the loading of the nucleotide into the hydrophobic core as confirmed by the fluorescence anisotropy results (**Figure 5.6d**). The decrease in the formulation size could be explained by enhanced hydrophobic interactions in the presence of the nucleotide and/or expulsion of some copolymers from the micelles both leading to a shrinkage of the hydrophobic core.

In summary, the combined data from fluorescence, zeta potential, size and force measurements clearly demonstrate the ability of non-cationics DDS to complex the nucleotide via different interactions. The hydrophobic interactions seem to prevail for the complexation of ss-siRNA with anionic micelles whereas hydrogen bonding and/or electrostatic interactions seem to dominate over the hydrophobic interaction for the complexation with anionic liposomes. On the other hand, the lack of changes in fluorescence properties (maximum of emission and anisotropy) or size and zeta potential (**Table 5.2**) of uncharged micelles upon ss-siRNA incubation clearly confirm the inability of PEG shell to complex ss-siRNA. The complexation of ss-siRNA with neutral liposomes most probably occurs through hydrogen bonding and/or hydrophobic interactions.

5.6 Conclusion

This study demonstrates for the first time that ss-siRNA can complex with non-cationic micelles and liposomes through different interactions. This finding was first evidenced by measuring the interaction forces between model substrates across ss-siRNA solutions using the Surface Forces Apparatus. Such measurements showed that ss-siRNA

can complex through hydrogen bonding, hydrophobic and electrostatic interactions onto hydrophobic and negatively charged surfaces. Moreover, the surface force measurements demonstrated that the nucleotide conformation depends on the nature of the interactions between the ss-siRNA and the surfaces. The complexation of ss-siRNA through various interactions was further evidenced with DDS such as micelles and liposomes using SYBR[®] Gold cyanine dye. Contrary to cationic DDS, the quantification of the ss-siRNA encapsulation efficiency with non-cationic DDS can be biased as the dye can interact with ss-siRNA already complexed to the nanovectors. However, the changes in fluorescence properties (amplitude and shift of the maximum of emission and anisotropy) as well as changes in the size and zeta potential highlight the ability of anionic DDS and uncharged liposomes to load ss-siRNA using hydrophobic and electrostatic interactions. This fundamental investigation opens up new possibilities for designing DDS with controlled interactions for enhancing the efficiency in ss-siRNA complexation and its controlled release.

5.7 Acknowledgements

Financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament and Centre de Recherche sur les Matériaux Auto-Assemblés are acknowledged. Professor Michel Lafleur is also thanked for providing fruitful discussion about fluorescence anisotropy results.

5.8 Supplementary data

Chemical structure and schematic illustration of ss-siRNA; hydrolytic stability of hydrophobized-mica; SFA measurements on separation between models surfaces across water and a solution of ss-siRNA; characterization of ss-siRNA complexed to cationic micelles as a function of N/P ratio; fluorescence emission spectra of control experiments; HPLC methods used for the quantification of incorporated lipid into liposomes and the resulting incorporation.

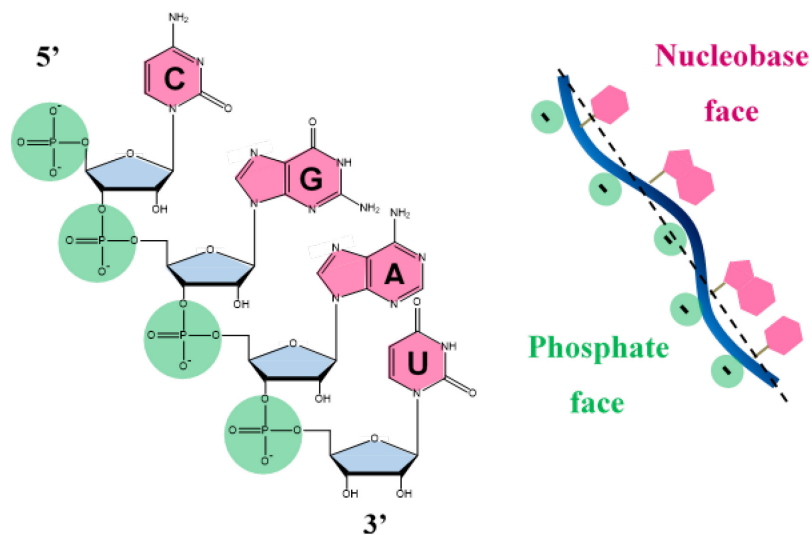


Figure 5.S.1 : Chemical structure and schematic illustration of ss-siRNA.

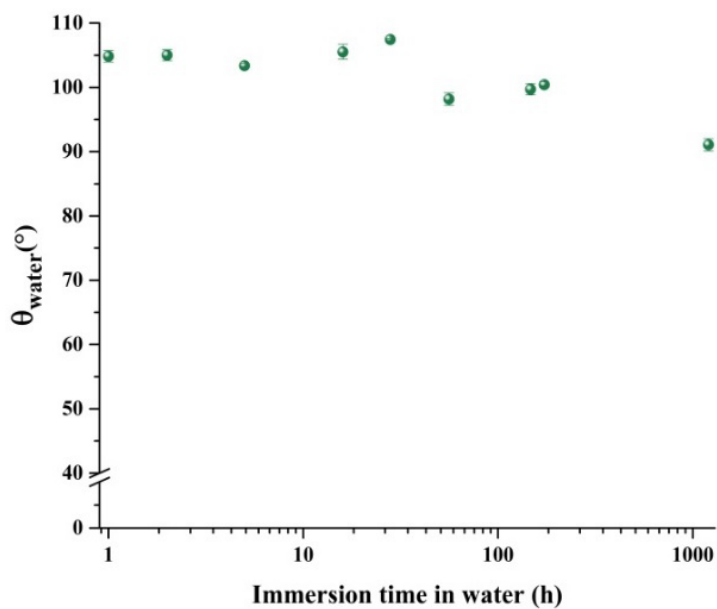


Figure 5.S.2 : Variation of static water contact angle (θ_{water}) on hydrophobized-mica as a function of immersion time in Milli-Q water.

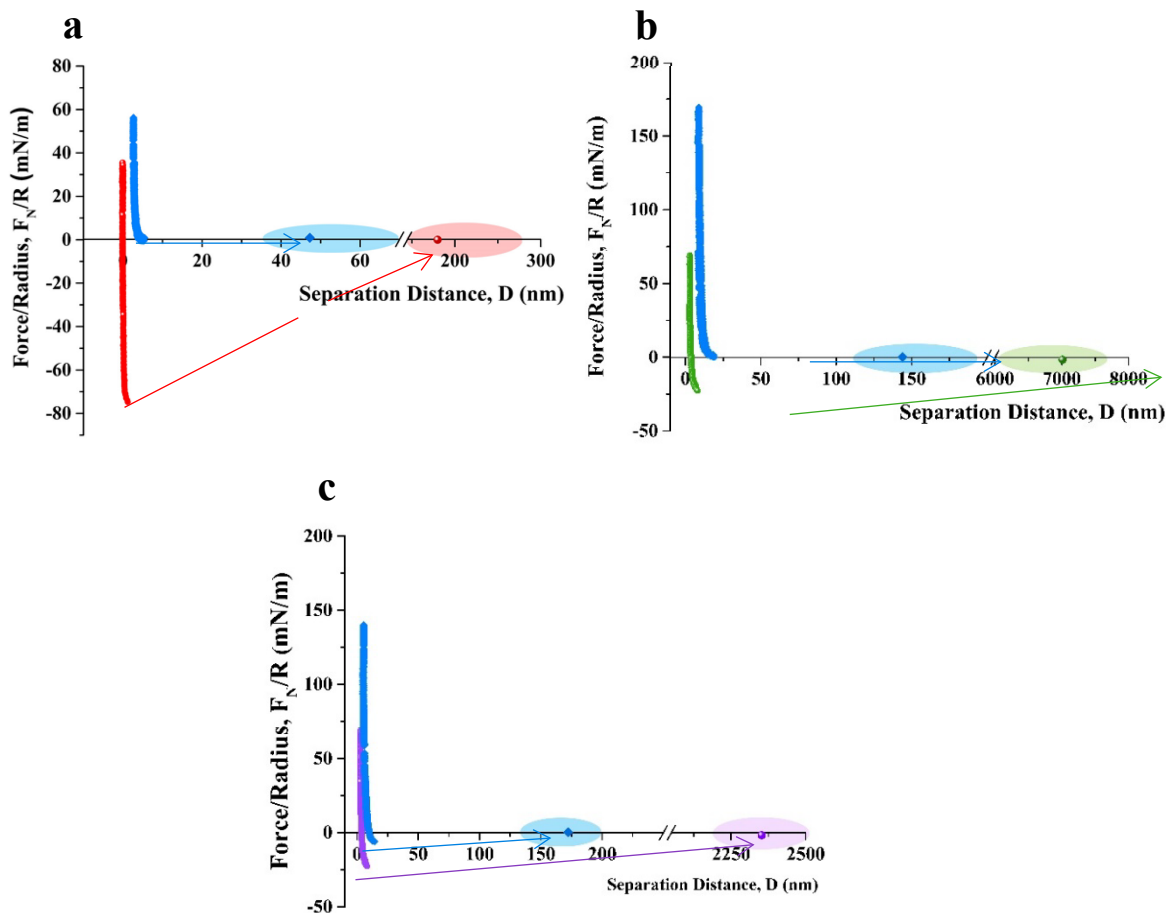


Figure 5.S.3 : Normalized force profiles, measured on the first separation between two (a) mica substrates across Milli-Q water (●) and across the ss-siRNA solution (◆), (b) hydrophobized mica substrates across across Milli-Q water (●) and across the ss-siRNA solution (◆) and (c) amino-functionalized mica substrates across Milli-Q water (●) and across the ss-siRNA solution (◆). $D = 0$ corresponds to the contact between mica surfaces in air. The most representative profile is illustrated and the shaded areas represent the variability in the measured discontinuities.

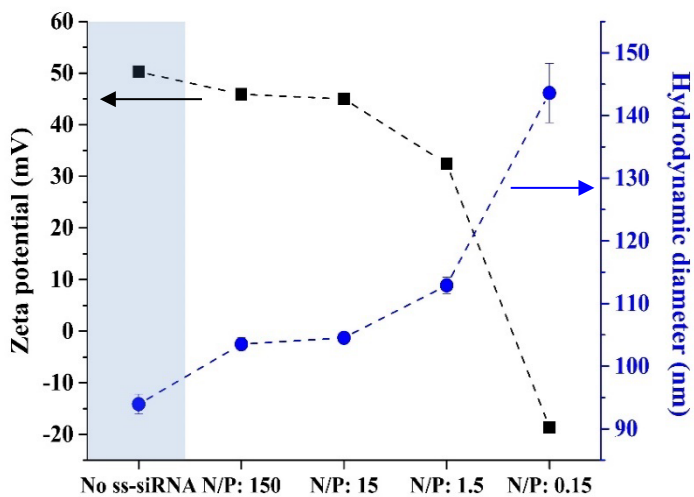


Figure 5.S.4 : Surface potential (■) and hydrodynamic diameter (●) of cationic micelles before and after complexation with ss-siRNA as a function of N/P ratio. Dashed lines are guide to the eyes. Reported data are the mean of three measurements and errors bars correspond to standard deviation of these measurements.

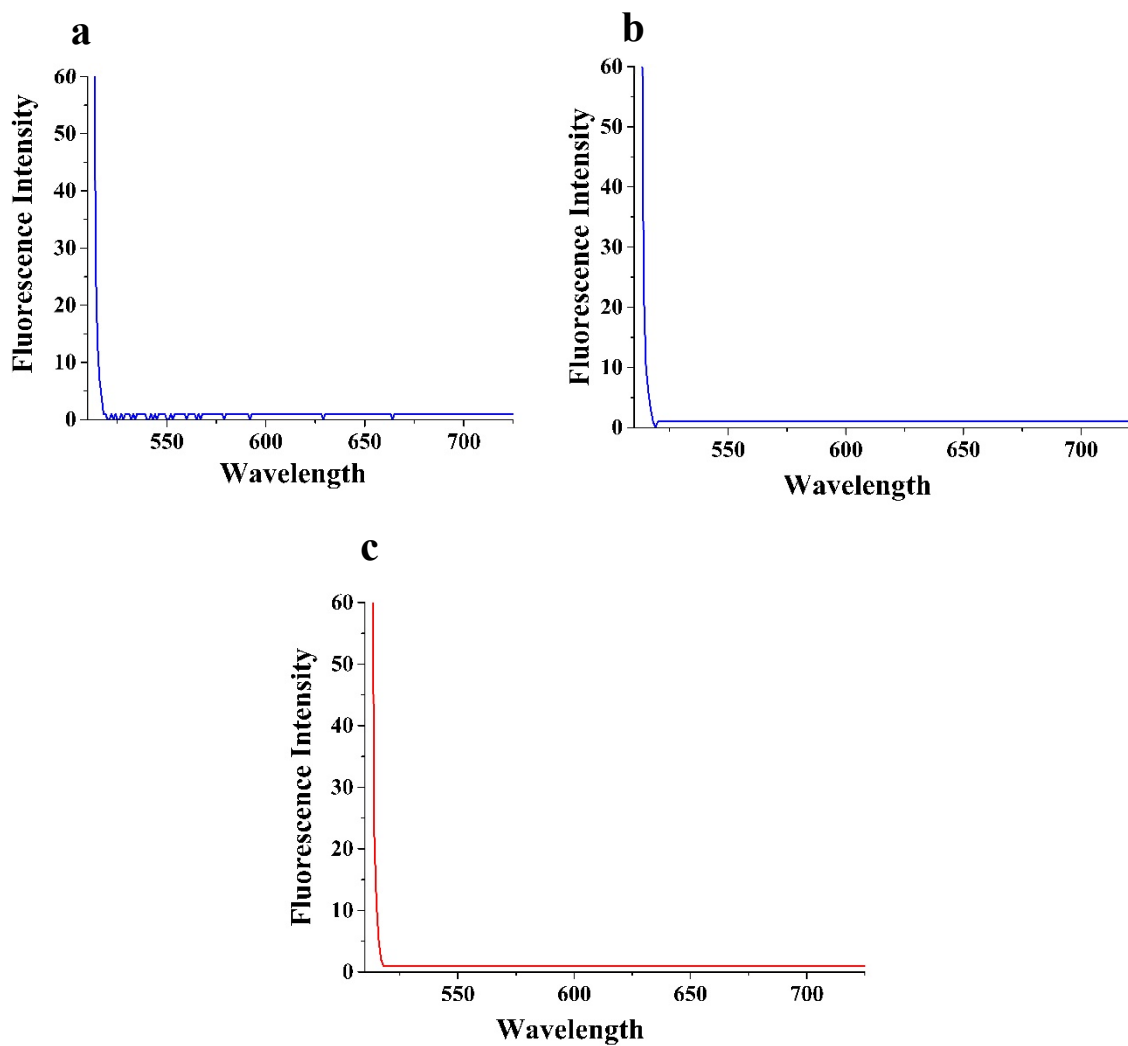


Figure S.5 : Fluorescence intensity spectra resulting from **(a)** the dye alone, **(b)** the dye/anionic liposomes (14.3 μM) mixture and **(c)** the dye/ss-siRNA (250 nM)/anionic liposomes (14.3 μM) mixture. Similar fluorescence emission spectra were obtained for co-incubation with the other liposomal or micellar formulations than these in (b) and (c) but are not presented for more clarity.

Table 5.S.1 : HPLC methods used for the quantification of the different lipids used in liposomal formulations.

Lipid	Column	Column temperature (°C)	Mobile phase A	Mobile phase B	Gradient	Flow rate (mL/min)	Injection volume (µL)	Detection	Retention time (min)	Calibration curve linearity range (µg/mL)
Cholesterol	Agilent Poroshell 120 EC-C8 3x30mm, 2.7µm particle size	25	Water/acetonitrile 95:5 + 0.1% acetic acid	Acetonitrile + 0.1% acetic acid	0 to 100% B in 1min. Total run length is 3 min.	1.5	5	UV 205 nm	1.9	25 to 500
DOTAP	Phenomenex Luna C18 4.6x50mm, 5µm particle size	50	Water + 0.1% trifluoroacetic acid	Methanol + 0.1% trifluoroacetic acid	85 to 100% B in 5min. Total run length is 7 min.	2	30	UV 205 nm	3.0	75 to 600
DAG	Agilent Poroshell 120 EC-C8 3x30mm, 2.7µm particle size	25	Water/acetonitrile 95:5 + 0.1% acetic acid	Acetonitrile + 0.1% acetic acid	0 to 100% B in 1min. Total run length is 3 min.	1.5	5	UV 200 nm	2.6	25 to 300
DMPG	Waters Acquity HSS T3 2.1x50mm, 1.8µm particle size	65	Water/acetonitrile 60:40 + 10 mM ammonium acetate pH 5.0	Isopropanol/acetonitrile 90:10 + 10 mM ammonium acetate pH 5.0	40 to 95% B in 4min. Total run length is 7 min.	0.6	5	Agilent 6120 Quadrupole + Multimode Source ESI Negative Single Ion Monitoring (SIM) [M-H] = 665.4	3.1	1 to 100

All analysis were performed on a Agilent 1260 Infinity system equipped with a 6120 single quad mass spectrometer or on a Agilent 1100 HPLC system (Mississauga, ON, Canada). Calibration curves were obtained from the chloroform stock solution of each lipids.

Table 5.S.2 : Liposomal formulations.

Liposome name	Formulation	Molar composition ratio (%) ^a
Cationic liposome	Cholesterol/ DOTAP	52/48
Anionic liposome	Cholesterol/ DMPG	61/39
Uncharged liposome	Cholesterol/DAG	3/97

^a determined by HPLC, see **Table 5.S.1** for more details.

5.9 References

1. E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, G. J. Hannon, Role of bidentate ribonuclease in the initiation of step of RNA interference *Nature* **409**, 363-366 (2001).
2. A. Fire *et al.*, Potent and Specific Genetic Interference by Double-stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature* **391**, 806-811 (1998).
3. S. M. Elbashir *et al.*, Duplexes of 21-nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells. *Nature* **411**, 494-498 (2001).
4. S. Crunkhorn, Success in Amyloidosis Trials Supports Potential of Systemic RNAi. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **12**, 818-818 (2013).
5. J. Li *et al.*, A Reduction and pH Dual-Sensitive Polymeric Vector for Long-Circulating and Tumor-Targeted siRNA Delivery. *Adv. Mater.* **26**, 8217–8224 (2014).
6. E. P. Thi *et al.*, Lipid Nanoparticle siRNA Treatment of Ebola-virus-Makona-infected Nonhuman Primates. *Nature* **521**, 362-365 (2015).
7. R. Kole, A. R. Krainer, S. Altman, RNA Therapeutics: Beyond RNA Interference and Antisense Oligonucleotides. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **11**, 125-140 (2012).
8. B. L. Davidson, A. M. Monteys, Singles Engage the RNA Interference Pathway. *Cell* **150**, 873-875 (2012).
9. T. Holen, M. Amarzguioui, E. Babaie, H. Prydz, Similar behaviour of single-strand and double-strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2401-2407 (2003).
10. W. F. Lima *et al.*, Single-Stranded siRNAs Activate RNAi in Animals. *Cell* **150**, 883–894 (2012).
11. A. L. Jackson, P. S. Linsley, Recognizing and Avoiding siRNA Off-target Effects for Target Identification and Therapeutic Application. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 57-67 (2010).
12. Y. Fedrov *et al.*, Off-target Effects by siRNA Can induce Toxic Phenotype. *RNA* **12**, 1188–1196 (2006).
13. A. L. Jackson *et al.*, Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* **21**, 635-637 (2003).
14. J. B. Bramsen *et al.*, Improved silencing properties using small internally segmented interfering RNAs. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5886–5897 (2007).

15. N. Dias, C. A. Stein, Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms. *Mol. Cancer. Ther.* **1**, 347-355 (2002).
16. Y. Xia, J. Tian, X. Chen, Effect of Surface Properties on Liposomal siRNA Delivery. *Biomaterials* **79**, 56-68 (2016).
17. K. A. Whitehead, R. Langer, D. G. Anderson, Knocking Down Barriers: Advances in siRNA Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 129-138 (2009).
18. R. Kanasty, J. R. Dorkin, A. Vegas, D. Anderson, Delivery Materials for siRNA Therapeutics. *Nat. Mat.* **12**, 967-977 (2013).
19. D. H. Kim, J. J. Rossi, Strategies for Silencing Human Disease Using RNA Interference. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 173-184 (2007).
20. J. M. Layzer *et al.*, In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA (2004)* **10**, 766-771 (2004).
21. J. Wang, Z. Lu, M. G. Wientjes, J. L.-S. Au, Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers. *AAPS J.* **12**, 492-503 (2010).
22. K. T. Love *et al.*, Lipid-like Materials for Low-dose, in Vivo Gene Silencing. *PNAS* **107**, 1864-1869 (2010).
23. H.-K. Kim, E. Davaa, C.-S. Myung, J.-S. Park, Enhanced siRNA Delivery Using Cationic Liposomes with New Polyarginine-conjugated PEG-lipid. *Int. J. Pharm.* **392**, 141-147 (2010).
24. D. Zhi *et al.*, The Headgroup Evolution of Cationic Lipids for Gene Delivery. *Bioconjugate Chem* **24**, 487-519 (2013).
25. M. E. Davis, The First Targeted Delivery of siRNA in Humans via a Self-Assembling, Cyclodextrin Polymer-Based Nanoparticle: From Concept to Clinic. *Mol. Pharm.* **6**, 659-668 (2009).
26. V. D. Badwaik *et al.*, Structure-property Relationship for in Vitro siRNA Delivery Performance of Cationic 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: PEG-PPG-PEG Polyrotaxane Vectors. *Biomaterials* **84**, 86-98 (2016).
27. M. E. Davis *et al.*, Evidence of RNAi in Humans from Systemically Administered siRNA via Targeted Nanoparticles. *Nature* **464**, 494-498 (2010).
28. D. C. Forbes, N. A. Peppas, Polycationic Nanoparticles for siRNA Delivery: Comparing ARGET ATRP and UV-initiated Formulations. *ACS Nano* **8**, 2908-2917 (2014).
29. J. E. Zuckerman, M. E. Davis, Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 843-856 (2015).
30. S.-Y. Lee *et al.*, Stability and Cellular Uptake of Polymerized siRNA (poly-siRNA)/polyethylenimine (PEI) Complexes for Efficient Gene Silencing. *J. Control. Release* **141**, 339-346 (2010).
31. H. J. Haringsma *et al.*, mRNA Knockdown by Single Strand RNA is Improved by Chemical Modifications. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4125-4136 (2012).
32. A. Malek *et al.*, In vivo Pharmacokinetics, Tissue Distribution and Underlying Mechanisms of Various PEI(-PEG)/siRNA Complexes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **236**, 97-108 (2009).
33. F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, O. C. Farokhzad, Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **5**, 505-515 (2008).

34. S. C. Semple *et al.*, Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery. *Nat. Biotechnol.* **28**, 172-176 (2010).
35. S. T. Crowley, J. A. Poliskey, N. J. Baumhover, K. G. Rice, Efficient expression of stabilized mRNA PEG-peptide polyplexes in liver. *Gene Ther* **22**, 993-999 (2015).
36. R. M. Elder, A. Jayaraman, Structure and thermodynamics of ssDNA oligomers near hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Soft Matter* **9**, 11521–11533 (2013).
37. M. Kastantin, D. K. Schwartz, DNA Hairpin Stabilization on a Hydrophobic Surface. *Small* **9**, 933–941 (2013).
38. J. H. Monserud, D. K. Schwartz, Effects of Molecular Size and Surface Hydrophobicity on Oligonucleotide Interfacial Dynamics. *Biomacromolecules* **13**, 4002–4011 (2012).
39. G. Wang *et al.*, Studying Different Binding and Intracellular Delivery Efficiency of ssDNA Single-Walled Carbon Nanotubes and Their Effects on LC3- Related Autophagy in Renal Mesangial Cells via miRNA-382. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 25733–25740 (2015).
40. V. Patzel *et al.*, Design of siRNAs producing unstructured guide-RNAs results in improved RNA interference efficiency. *Nat Biotechnol* **23**, 1440-1444 (2005).
41. F. Xia *et al.*, On the binding of cationic, water-soluble conjugated polymers to DNA: electrostatic and hydrophobic interactions. *J Am Chem Soc* **132**, 1252-1254 (2010).
42. R. S. Tuma *et al.*, Characterization of SYBR Gold nucleic acid gel stain: a dye optimized for use with 300-nm ultraviolet *Anal. Chem.* **268**, 278-288 (1999).
43. M. Zheng *et al.*, Enhancing in vivo circulation and siRNA delivery with biodegradable polyethylenimine-graft-polycaprolactone-block-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials* **33**, 6551-6558 (2012).
44. T. Lobovkina *et al.*, In Vivo Sustained Release of siRNA from Solid Lipid Nanoparticles. *ACS Nano* **5**, 9977–9983 (2011).
45. B. Liberelle, X. Banquy, S. Giasson, Stability of Silanols and Grafted Alkylsilane Monolayers on Plasma-Activated Mica Surfaces. *Langmuir* **24**, 3280-3288 (2008).
46. Y. Yang, A. M. Bittner, S. Baldelli, K. Kern, Study of Self-Assembled Triethoxysilane Thin Films Made by Casting Neat Reagents in Ambient Atmosphere. *Thin Solid Films* **516**, 3948-3956 (2008).
47. J. Israelachvili *et al.*, Recent Advances in the Surface Forces Apparatus (SFA) Technique. *Rep. Prog. Phys* **73**, 1-16 (2010).
48. J. N. Israelachvili, Thin Film Studing Using Multiple-Beam Interferometry. *J. Colloid Interface Sci.* **44**, 259-272 (1972).
49. B. Derjaguin, Untersuchungen über die Reibung und Adhäsion, IV. *Kolloid-Z.* **69**, 155-164 (1934).
50. L. Giraud *et al.*, Amino-functionalized Monolayers Covalently Grafted to Silica-Based Substrates as a Robust Primer Anchorage in Aqueous Media. *Appl. Surf. Sci* **370C**, 476-485 (2016).
51. S. Giasson, T. L. Kuhl, J. N. Israelachvili, Adsorption and Interaction Forces of Micellar and Microemulsion Solutions in Ultrathin Films. *Langmuir* **14**, 891-898 (1998).
52. H. G. Hansma, D. E. Laney, DNA Binding to Mica Correlates with Cationic Radius: Assay by Atomic Force Microscopy. *Biophysical J.* **70**, 1933-1939 (1996).

53. Y. Kan, Q. Tan, G. Wu, W. Si, Y. Chen, Study of DNA Adsorption on Mica Surfaces Using a Surface Force Apparatus. *Sci. Rep.* **5**, 1-6 (2015).
54. J. Adamcik, D. V. Klinov, G. Witz, S. K. Sekatskii, G. Dietler, Observation of Single-stranded DNA on Mica and Highly Oriented Pyrolytic Graphite by Atomic Force Microscopy. *FEBS Letters* **580**, 5671–5675 (2006).
55. A. Werner, Predicting translational diffusion of evolutionary conserved RNA structures by the nucleotide number. *Nucleic Acids Res.* **39**, e17 (2011).
56. M. Blackburn, *Nucleic acid in chemistry and biology 3rd edition*, p16 (2006).
57. F. Despa, R. S. Berry, The Origin of Long-Range Attraction between Hydrophobes in Water. *Biophysical Journal* **92**, 373–378 (2007).
58. E. E. Meyer, K. J. Rosenberg, J. Israelachvili, Recent progress in understanding hydrophobic interactions. *PNAS* **103**, 15739–15746 (2006).
59. S. H. Donaldson, Jr. *et al.*, Asymmetric Electrostatic and Hydrophobic-Hydrophilic Interaction Forces Between Mica Surfaces and Silicone Polymer Thin Films. *ACS Nano* **7**, 10094-10104 (2013).
60. L. S. Shlyakhtenko, A. A. Gall, Y. L. Lyubchenko, Mica Functionalization for Imaging of DNA and Protein-DNA Complexes with Atomic Force Microscopy. *Methods Mol Biol.* **931**, 295-312 (2013).
61. S. T. Yue *et al.*, *U.S Patent No. 5,658,751*, (1997).
62. R. P. Haugland, S. T. Yue, P. J. Millard, B. L. Roth, *U.S Patent No. 5,436,134*, (1995).
63. W. R. Strapps *et al.*, The siRNA sequence and guide strand overhangs are determinants of in vivo duration of silencing. *Nucleic Acids Res.* **38**, 4788–4797 (2010).
64. S. Xu *et al.*, Direct Force Measurements between siRNA and Chitosan Molecules Using Force Spectroscopy. *Biophysical Journal* **93**, 952–959 (2007).
65. Y. Sato, H. Hatakeyama, Y. Sakurai, M. Hyodo, b. Hidetaka Akitaa, Hideyoshi Harashima, A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal siRNA and gene silencing activity in vitro and in vivo. *J. Control. Release* **10**, 267-276 (2012).
66. H. M. Burt, J. K. Jackson, Monosodium Urate Monohydrate Crystal Induced Changes in Membrane Fluidity: a Fluorescence Polarization Study. *Rheumatology* **15**, 1144-1151 (1988).
67. X. Zhang, J. K. Jackson, H. M. Burt, Determination of Surfactant Critical Micelle Concentration by a Novel Fluorescence Depolarization Technique. *Biochem. Biophys. Methods* **31**, 145-150 (1996).

Chapitre 6

Discussion Générale et Perspectives

Ce manuscrit rapporte les propriétés physico-chimiques de surface en milieu aqueux de substrats modélisant la surface de biomatériaux. L'auto-assemblage de petites molécules, d'oligonucléotides et de systèmes colloïdaux a permis la préparation d'une grande variété de surface. Les surfaces modèles préparées ont permis l'étude des biomatériaux amino-fonctionnalisés, des biomatériaux autolubrifiants et des biomatériaux pour la complexation d'oligonucléotides. Le chapitre qui suit détaille les contributions majeures issues de ces recherches, les perspectives d'applications ainsi que les études futures pouvant être conduites pour permettre une meilleure compréhension des phénomènes énoncés.

6.1 Biomatériaux amino-fonctionnalisés

Le **Chapitre 3** présente l' amino-fonctionnalisation de substrats de silicate via le greffage d'une monocouche d'AUTES auto-assemblée. L'étude de la stabilité hydrolytique et la caractérisation de ces monocouches ont été largement investiguées durant ces travaux. La stabilité hydrolytique de cette monocouche permet son utilisation prolongée (> 8 jours) dans des solutions aqueuses allant de pH 2 à 10. Jusqu'à présent, la grande instabilité hydrolytique rapportée pour des monocouches à base d'alkylsilanes et plus particulièrement d'aminoalkylsilanes limitait grandement leur utilisation en milieu aqueux. Les SAMs d'AUTES présentées sont non seulement extrêmement stables en milieu aqueux, mais permettent également l'immobilisation chimique et physique d'un grand nombre de systèmes avec la même stabilité.

6.1.1 Caractérisation des SAMs amino-fonctionnalisées

Les SAMs d'AUTES ont été obtenues facilement par auto-assemblage à partir de solutions en utilisant une faible quantité d'aminoalkylsilanes. D'autres types de SAMs préparées sur des substrats de silicate via des liens $\text{Si}_{\text{surface}}\text{-O-C}_{\text{adsorbate}}$ ou $\text{Si}_{\text{surface}}\text{-C}_{\text{adsorbate}}$ ont été rapportés comme ayant une bonne stabilité hydrolytique, néanmoins de nombreuses précautions doivent être prises pour préparer ce type de monocouches (manipulations sous atmosphère inerte dans une boîte à gant ou sous flux d'argon).^{1,2} Les SAMs préparées à partir d'AUTES que nous présentons dans le **Chapitre 3** peuvent être obtenues simplement par immersion des substrats dans une solution d'AUTES dans de l'éthanol absolu, pour des

temps d'immersion courts (20 min). Hormis, l'utilisation d'éthanol absolu aucune autre précaution particulière n'est nécessaire.

Les valeurs de rugosité obtenues pour les monocouches d'AUTES sont parmi les plus faibles rapportées, regroupant les SAMs préparées par phase liquide ou vapeur.³⁻⁶ La phase vapeur est généralement rapportée comme permettant l'obtention de monocouches plus homogènes et de plus faible rugosité, comparativement à celles obtenues en phase liquide.³ Néanmoins, comme démontré au **Chapitre 1**, l'emploi de faibles concentrations d'aminoalkylsilanes combiné à de faibles temps d'immersion permettent l'obtention de surface hautement homogènes par auto-assemblage en phase liquide. Ces conditions peuvent également être employées pour la préparation d'une grande variété de SAMs composées d'alkylsilanes fonctionnalisés ou non.

La formation des SAMs d'AUTES en fonction du temps d'immersion a été suivie par les mesures d'angle de contact. La variation d'angle de contact a permis de mettre en évidence une cinétique de réaction rapide entre les silanes de surface du mica et l'aminoalkylsilane permettant de greffer les SAMs d'AUTES avec un recouvrement maximal en 20 min. Ces temps de réaction sont beaucoup plus courts que ceux généralement requis pour les SAMs d'alkylsilanes (2 h)⁷ et sont attribués à la présence du groupement aminé sur le silane permettant de catalyser la réaction de silanisation. Une étude rapportant l'adsorption préférentielle d'aminoalkylsilanes en compétition avec des alkylsilanes dans un mélange binaire supporte cette conclusion.⁸

Les densités de greffage des SAMs d'AUTES obtenues sont parmi les plus hautes rapportées et peuvent s'expliquer par la structure hautement ordonnée de ce type d'auto-assemblage.⁹⁻¹² Un certain contrôle dans la densité de greffage est obtenu en modulant la concentration de la solution d'AUTES servant à l'immersion. Une deuxième approche pour contrôler la densité de greffage en AUTES serait d'utiliser un mélange binaire d'AUTES et d'alkylsilane (tel que le dodecyltriéthoxysilane) durant l'auto-assemblage en solution. L'utilisation de cette approche suppose le plus souvent que la proportion de chaque silane présent en solution soit conservée à la surface. Cependant, l'adsorption préférentielle rapportée d'aminoalkylsilanes par rapport aux alkylsilanes s'oppose à cette condition et

nécessiterait la confirmation de la densité relative de chaque silane à la surface. L'estimation de la densité de greffage est le plus souvent étudiée à partir de la variation de l'angle de contact à l'eau. Néanmoins, comme nous le rapportons, les variations de l'angle de contact à l'eau seules peuvent s'avérer non suffisantes pour quantifier cette densité. En effet, la rugosité, la densité de greffage ainsi que la proportion des chaînes carbonées exposées à l'eau sont autant de paramètres pouvant influencer sur l'angle de contact.

6.1.2 Stabilité hydrolytique des SAMs amino-fonctionnalisés

L'hydrolyse du lien $\text{Si}_{\text{surface}}\text{-O-Si}_{\text{silane}}$ a été rapportée pour des SAMs d'alkylsilanes, mais l'est d'autant plus pour celles composées d'aminoalkylsilanes.¹³⁻¹⁵ La plus grande instabilité des SAMs d'aminoalkylsilanes résulte de deux phénomènes. Premièrement, la majorité des aminoalkylsilanes employés possèdent de courtes chaînes alkyle (ex : l'APTES) permettant la pénétration d'eau dans la couche. Deuxièmement, l'hydrolyse amino-catalysée intra- et inter-moléculaire de la liaison $\text{Si}_{\text{surface}}\text{-O-Si}_{\text{silane}}$ favorise le dégreffage de la monocouche en milieu aqueux. La molécule d'APTES est la plus largement utilisée pour l'amino-fonctionnalisation des substrats de silicate. Sa chaîne à trois carbones a de plus été rapportée comme permettant la formation d'un cycle stable à cinq atomes favorisant l'hydrolyse amino-catalysée intramoléculaire. La formation de ce cycle à cinq atomes n'est plus favorisée avec l'emploi d'un aminoalkylsilane possédant une chaîne alkyle plus longue, en l'occurrence 11 carbones comme dans notre étude. De plus, la longue chaîne carbonée de l'AUTES (11 carbones) offre une protection hydrophobe au lien $\text{Si}_{\text{surface}}\text{-O-Si}_{\text{silane}}$ le protégeant ainsi de l'hydrolyse. La stabilité à l'hydrolyse de l'AUTES est parmi les meilleures rapportées jusqu'à ce jour et ce même comparée à des SAMs d'alkylsilanes fonctionnalisés ou non.^{1, 2, 16}

L'avancement des connaissances sur les paramètres influençant la stabilité hydrolytique des SAMs d'AUTES apporté par cette thèse peut également servir au développement d'autres SAMs alkylsilanes fonctionnalisés ou non. La protection contre l'hydrolyse du lien d'ancrage à l'aide d'une longue chaîne alkyle et de haute densité de greffage peut également servir à développer des SAMs hydrolytiquement stables sur d'autres types de substrats et avec d'autres natures d'adsorbats (via des liaisons thiol-Au).

6.1.3 Les SAMs amino-fonctionnalisées comme couche d'ancrage

La réactivité chimique des groupements aminés présents à la surface a été démontrée par l'attachement covalent de nanoparticules (NPs) fonctionnalisées avec des groupements carboxyliques. La stabilité hydrolytique de cette immobilisation est similaire à celle de la monocouche d'AUTES et résiste donc au dégreffage pour des temps d'immersion prolongés en conditions acides ou basiques. En plus d'une immobilisation covalente, la physisorption de particules anioniques (NPs de polystyrène sulfate-modifiées) via des interactions électrostatiques sur les SAMs d'AUTES (chargée positivement) a également pu être mise en évidence. L'immobilisation de ces NPs anioniques via des interactions électrostatiques a été possible par auto-assemblage à partir d'une suspension aqueuse et s'est avérée stable pour les temps d'immersion utilisés (de 4 à 16 h) et ce même pour des pH extrêmes (pH = 13). Ainsi, nous avons pu démontrer pour la première fois que la monocouche d'AUTES était encore protonée pour des pH très basiques (pH 13). D'autres techniques plus directes ont été utilisées pour déterminer le potentiel zêta de surface des monocouches d'AUTES mais n'ont pas été concluantes. Tout d'abord, la mesure du potentiel zêta sur surface plane a été employée, mais l'instabilité des traceurs particuliers n'a pas permis de mesurer ce potentiel pour une gamme de pH acceptable. Dans un second temps, le SFA a été utilisé pour mesurer l'amplitude et la portée des interactions entre deux surfaces d'AUTES au travers de l'eau. Cependant, aucune décroissance exponentielle de la force avec la distance de séparation, caractéristique des répulsions électrostatiques, n'a pu être mesurée (comme présenté à la **Figure 5.4a**). Les interactions électrostatiques sont probablement masquées par l'attraction hydrophobe de longue portée provenant des longues chaînes carbonées de l'AUTES composant les deux monocouches se faisant face (**Figure 5.4a**).

Perspectives d'utilisations. Le potentiel d'ancrage des SAMs d'AUTES a été démontré par l'immobilisation de NPs via des liens covalents et des interactions électrostatiques. Cependant, l'emploi de la monocouche d'AUTES ne doit pas seulement se limiter à l'ancrage de systèmes colloïdaux mais peut également servir à l'immobilisation robuste de petites molécules synthétiques, polymères et biomolécules (protéine, enzyme, acide nucléique). Dans la suite de ce manuscrit, les SAMs d'AUTES

ont permis l'immobilisation covalente de NPs polymériques (PAA80% et PAA 25%, **Chapitre 4**) et de polymères (PAA, **Chapitre 4**) mais aussi l'immobilisation physique de ss-siARN (**Chapitre 5**).

6.2 Biomatériaux autolubrifiants

Les travaux présentés au **Chapitre 4** explorent les propriétés de surface et en particulier les mécanismes contrôlant le frottement entre deux substrats structurés préparés, à partir de particules polymériques sensibles aux variations de pH et de particules dures de silice.

Les études s'intéressant aux propriétés de surface de substrats structurés rapportées jusqu'à présent consistent le plus souvent à investiguer la force de frottement entre une surface structurée et une sonde colloïdale ou une surface lisse.^{17, 18} Dans cette thèse, les forces normales et latérales ont été mesurées entre deux surfaces structurées symétriques se faisant face en milieu aqueux. L'étude de la géométrie surface/surface modélise mieux les forces de frottements pouvant avoir lieu entre deux surfaces biologiques en mouvement (ex : deux surfaces articulaires) ou bien entre une surface biologique et la surface d'un dispositif médical (ex : lentille coréenne, cathéters). La structuration de surface, en plus de permettre le contrôle de certaines propriétés physico-chimiques de surface, permet de modéliser la topographie des biomatériaux.

Pour contrôler la lubrification de biomatériaux, la grande majorité des études développent des revêtements à base de brosses de polyélectrolytes. Ces revêtements relativement lisses à l'échelle atomique permettent l'obtention de surfaces aux coefficients de frottement faibles voir très faibles ($0.0006 < \mu < 0.001$).¹⁹⁻²¹ En revanche, le coût de production et la fragilité de ces systèmes à résister aux hautes charges appliquées (> 20 atm) limitent leur utilisation. Dans l'étude présentée au **Chapitre 4**, des réseaux colloïdaux deux dimensions (2D) mous et durs ont été préparés grâce à l'immobilisation respective de particules polymériques et de particules de silice. De manière générale, de faibles coefficients de frottement peuvent être obtenus ($\mu = 10^{-3}$) avec les réseaux 2D discontinus obtenus et ce même pour des charges appliquées très élevées. L'emploi de surfaces structurées est donc particulièrement prometteur pour la supplémentation ou la conception

de surfaces articulaires lubrifiantes où les pressions appliquées peuvent être très élevées. En effet, les pressions appliquées au sein de l'articulation d'un genou sain sont d'en moyenne 590 atm.²² Localement, la pression peut même aller jusqu'à 1300 atm et peut encore augmenter en cas de détérioration de la surface articulaire ou bien lors de l'emploi d'implants articulaires.²²

6.2.1 Préparation de surfaces structurées

Les motifs structuraux (dômes) préparés dans cette étude ont été produits via l'auto-assemblage de particules à partir d'une suspension. Les réseaux 2D discontinus permettent de contrôler l'aire de surface, les interactions, la mouillabilité ou les propriétés tribologiques. C'est pourquoi les surfaces structurées préparées peuvent être employées dans un grand nombre applications, parmi lesquelles : les dispositifs médicaux pour la culture cellulaire²³⁻²⁵ où l'adhésion mais aussi la prolifération des cellules peuvent être contrôlées par le motif structural du substrat, les senseurs optiques dont les propriétés optiques peuvent être modulées réversiblement par la structure et la densité des motifs du substrat^{26, 27} et les micro- et nano-systèmes électromécaniques (MEMs et NEMs) où des nanostructures assurent une bonne lubrification permettant une efficacité et une durée de vie améliorées.²⁸

Des structures molles au gonflement dépendant du pH environnant ainsi que des structures dures ont été étudiées de manière à définir l'effet de la déformabilité et de la teneur en eau sur les propriétés physico-chimiques de surface (adhésion et frottement). Les structures molles et dures présentées aux **Chapitre 4** étaient extrêmement stables en milieu aqueux et ce, pour une large gamme de pH, de force ionique et pour des temps d'immersion prolongés. Cette extrême stabilité en milieu aqueux rend l'emploi de ces surfaces particulièrement approprié pour une utilisation en milieux biologiques.

Au Chapitre 3, il a été démontré que l'immobilisation via l'auto-assemblage à partir d'une suspension de particules permettait d'obtenir des surfaces plus homogènes que par la méthode de convection par évaporation horizontale (**Figure 3.2e et Figure 3.S.4**). En effet, la déposition par convection et évaporation horizontale engendre l'immobilisation de « grappes » de NPs et la présence d'un front d'évaporation de solvant sur les surfaces

(**Figure 3.S.4**). L'auto-assemblage à partir de suspensions a alors été préféré pour préparer les surfaces structurées présentées au **Chapitre 4** car il permet l'obtention d'un réseau 2D discontinu plus homogène dont la densité de greffage en NPs peut être contrôlée via la concentration de la suspension particulaire durant l'immersion.

6.2.2 Frottement entre deux surfaces structurées

Les propriétés tribologiques des structures molles et dures semblent être contrôlées par deux mécanismes très différents : le roulement et l'hydratation de couches déformables (**Figure 6.1**).

Les revêtements structurés à base de NPs molles et pH-stimulables peuvent présenter divers degrés d'ionisation en fonction du pH du milieu environnant. La réponse aux variations de pH dépend de la proportion de PAA des NPs. Plus la proportion de PAA est grande, plus les NPs sont déformables et s'étaleront facilement lors de l'immobilisation à la surface, entraînant donc une plus grande interaction avec celle-ci. La plus grande aire d'interaction des NPs avec le substrat permet leur forte immobilisation à la surface limitant leur gonflement vertical. De manière plus générale, pour maintenir une réponse stimulée par les variations de pH, la déformation et l'interaction de la particule molle avec le substrat doit être minimisée.

Les propriétés de frottement des NPs de PAA sont directement liées à leur gonflement. En effet, plus les NPs de PAA immobilisées gonflent, plus le coefficient de frottement est faible (**Figure 6.1**). Cette observation met clairement en évidence l'importance du gonflement (et donc de l'hydratation des chaînes polymériques) sur les propriétés de surface. Ces systèmes stimulables présentent cependant une limite pour l'investigation de la relation structure/propriétés, à savoir la difficulté à isoler indépendamment les paramètres contrôlant le frottement. Par exemple, une variation de pH entraîne une variation du degré d'ionisation des particules, engendrant l'étirement et le gonflement des chaînes dus à leur plus forte hydratation ce qui modifie les propriétés élastiques de ces surfaces. La difficulté à isoler indépendamment ces paramètres ne permet pas toujours de corrélérer directement leurs effets sur les propriétés de surface et peut rendre l'établissement de la relation structure/propriétés de surface difficile.

Avec les structures dures obtenues à partir de l'immobilisation de particules de silice, l'hydratation ou le gonflement des particules n'intervient pas dans le contrôle de la force. Avec ces structures non déformables, le roulement de certaines particules au sein de l'aire de contact est observé. Le roulement est connu pour engendrer de très faibles forces de frottement et assure ainsi la bonne lubrification du système (**Figure 6.1**). De plus, l'expulsion des particules de l'aire de contact n'a été mise en évidence que pour des vitesses de cisaillement supérieures à $20 \mu\text{m/s}$. Il semble donc que même si les particules roulent, elles peuvent néanmoins rester à la surface des substrats, permettant d'augmenter la durée de vie du revêtement.

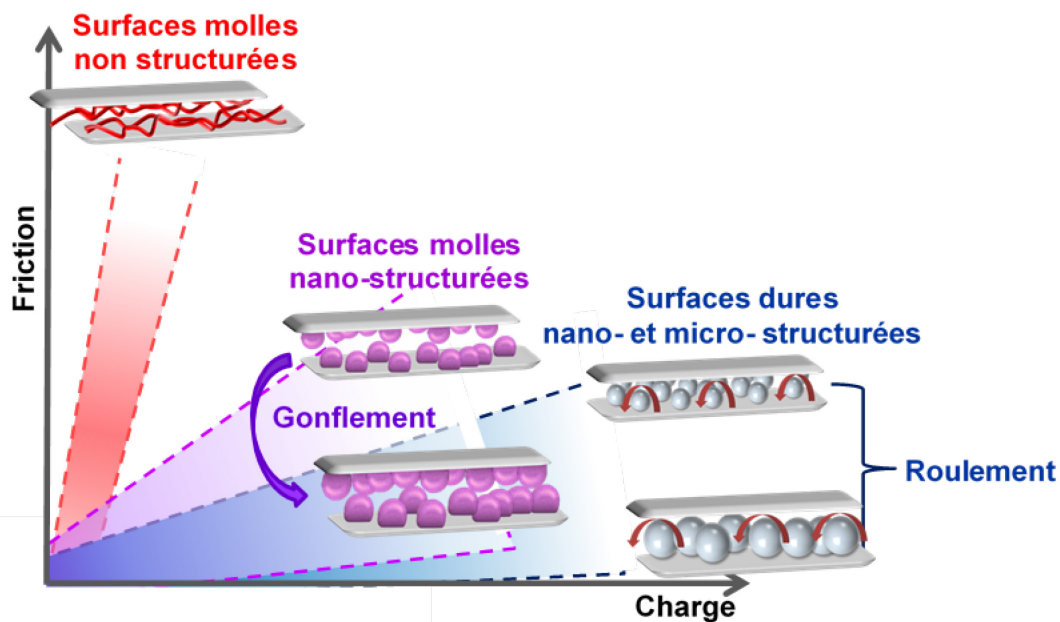


Figure 6.1: Représentation schématique des propriétés tribologiques de surfaces molles et dures structurées et non structurées.

La quantité de particules greffées et non greffées au sein de l'aire de contact, ainsi que la distance sur laquelle ces particules roulent restent difficilement évaluables en temps réel à l'aide des techniques utilisées. La quantification de ces deux phénomènes pourrait grandement aider à la compréhension du mécanisme de roulement et nécessiterait un système permettant leur visualisation. La transparence des substrats de mica utilisés pourrait permettre la visualisation du roulement des microparticules dures de silice ($8 \mu\text{m}$) durant le cisaillement, si la lumière était envoyée dans un microscope optique au lieu du spectromètre.

6.2.3 Les biomatériaux lubrifiants et leurs perspectives pharmaceutiques

Les nanostructures molles et dures permettent toutes deux d'obtenir des coefficients de frottement extrêmement faibles ($\mu=10^{-3}$). De plus, le mécanisme de roulement des structures dures composées de grosses particules de silice (8 μm) permet de supporter de très fortes charges appliquées (600 atm). Les excellentes propriétés lubrifiantes en milieu aqueux de ces deux systèmes sont particulièrement intéressantes pour la conception de substituts articulaires. Le roulement mis en évidence avec les particules permet au système de s'adapter pour répondre au glissement des surfaces tandis que le taux d'hydratation et le gonflement des particules molles permet de contrôler le frottement via le pH environnemental. La combinaison de ces deux structures molles et dures à la surface de biomatériaux pourrait permettre l'obtention de biomatériaux extrêmement lubrifiants et dont le frottement pourrait être contrôlé par des stimuli environnementaux (pH, force ionique, température) tout en s'assurant une bonne résistance à l'usure et ce, sous de fortes charges appliquées. Des nanostructures mixtes discontinues composées de particules de PAA-25% et de silice assemblées de diverses manières (**Figure 6.2**) pourraient permettre l'obtention de propriétés lubrifiantes intéressantes. L'assemblage à la surface de particules dures et molles pourrait influencer grandement les propriétés tribologiques de ce type de

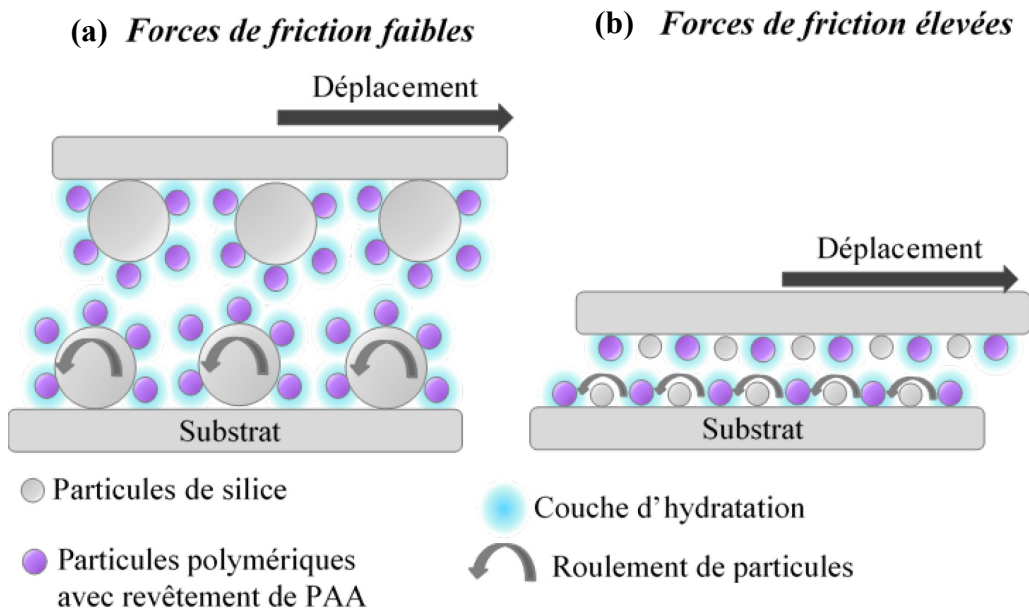


Figure 6.2: Représentation schématique de surfaces composites à base de particules de silice et de PAA.

revêtement. En effet, le greffage aléatoire de particules dures et molles de dimension semblable (**Figure 6.2.b**) pourrait s'avérer être un revêtement moins lubrifiant et résistant que celui issu de l'assemblage de petites particules molles sur de plus grandes particules dures (**Figure 6.2.a**). L'assemblage de petites particules molles sur des particules dures pourrait permettre d'apporter une couche d'hydratation homogène entre les deux surfaces en déplacement assurant ainsi une bonne lubrification du système tout en permettant le roulement de ces structures colloïdales minimisant ainsi les forces de friction et ce même sous de fortes charges appliquées (**Figure 6.2**). A l'opposé, avec un assemblage aléatoire de particules dures et molles de dimension semblable des forces de friction plus élevées entre les deux surfaces sont attendues et pourraient être dues à une couche d'hydratation discontinue, ainsi qu'au dégreffage ou bien l'endommagement des particules molles dû au roulement des particules dures.

Les NPs cœur-revêtement à base de PAA sont des nanohydrogels pouvant être utilisés comme substitut du liquide synovial ou pour le revêtement de substitut cartilagineux. Pour parfaire leur activité pharmacologique, ces particules pourraient encapsuler des principes actifs hydrophiles et/ou hydrophobes respectivement dans le cœur hydrophobe ou le revêtement hydrophile. Le principe actif pourrait alors être libéré durant le glissement des surfaces articulaires par rupture ou abrasion des particules sous l'effet des contraintes de cisaillement ou bien par des stimuli extérieurs (pH, température) permettant une délivrance directement au sein de la capsule articulaire. La délivrance de principe actif contrôlée par la température a déjà été rapportée pour des nanohydrogels lubrifiants et thermosensibles de PNIPAM.²⁹ Les propriétés mécano-sensibles de vésicules lenticulaires ont quant à elles permis la libération contrôlée et localisée de principes actifs dans des vaisseaux sclérosés due aux forces de cisaillement élevées.³⁰ La mauvaise lubrification des surfaces articulaires s'accompagne le plus souvent d'une réponse inflammatoire importante ayant pour conséquence de modifier le pH de la capsule articulaire.³¹ L'utilisation de nanohydrogels à base de polyélectrolytes encapsulant un principe actif permettrait ainsi de suppléer les défaillances de lubrification tout en libérant de manière contrôlée et localement des agents anti-inflammatoires.

6.3 Biomatériaux pour la complexation d'oligonucléotide

L'étude présentée au **Chapitre 5** a permis de mettre en évidence les possibles interactions permettant la complexation de ss-siARN avec des surfaces planes mais aussi avec des vecteurs médicamenteux. Pour la première fois, la complexation de ss-siARN avec des vecteurs médicamenteux neutres ou anioniques a été mise évidence. Cette complexation, rendue possible via l'utilisation seule ou combinée d'interactions électrostatiques et non-électrostatiques, offre la possibilité de s'affranchir de l'emploi des vecteurs cationiques et de leur toxicité importante.

6.3.1 Délivrance d'acides nucléiques simples brins vs doubles brins

L'étude présentée au **Chapitre 5** propose pour la première fois un système de libération de gène spécifique à un simple brin d'acide nucléique et plus spécifique de ss-siARN. Peu d'études s'intéressent à la libération contrôlée de ss-siARN. Si l'activité de silençage des ss-siARN semble clairement établie, l'avantage de la forme simple brin comparée à la forme double brin fait encore débat.³²⁻³⁴ Certaines études rapportent clairement une activité de silençage plus importante et plus rapide pour la forme simple brin comparée à la forme double brin alors que d'autres n'observent que peu de différences ou des tendances inverses. Les résultats contradictoires issue de ces études pourraient provenir de deux phénomènes. Tout d'abord, les résultats issus de l'injection directe et sans vecteur d'acides nucléiques doubles et simples brins pourraient refléter la plus grande sensibilité à la dégradation de la forme simple brins. Ensuite, un vecteur encapsulant plus favorablement des acides nucléiques doubles brins que des simples brins pourraient également biaiser les résultats obtenus. L'utilisation de nanovecteurs développés spécifiquement pour la libération de ss-siARN permettrait l'étude et la comparaison plus rigoureuse des activités de silençage de ces deux formes.

Interactions de simples brins et de doubles brins d'acides nucléiques avec des nanovecteurs. La complexation de ss-siARN avec des surfaces non-cationiques via des interactions hydrophobes ou des liaisons hydrogène a été démontrée. Ce type d'interactions est permis grâce à l'emploi de la forme simple brin du siARN. La forme double brin ne

rend pas disponible les nucléobases qui sont déjà engagées dans un grand nombre d'interactions avec leur brin complémentaire.

Les conclusions faites à la suite de ces travaux s'appliquent à des simples brins de siARN mais peuvent également concerner plus largement tous les oligonucléotides simples brins d'ADN ou d'ARN. Les limites de cette approche peuvent néanmoins être que l'acide nucléique à complexer devra posséder une structure 3D peu complexe ou bien pouvoir la perdre aisément de manière à rendre disponible l'ensemble de ses groupements chimiques pour permettre l'interaction avec le vecteur.

6.3.2 Limites de la quantification d'oligonucléotides à l'aide de sonde fluorescente

La sonde fluorescente SYBR[®] Gold a été utilisée pour déterminer le taux d'encapsulation de ss-siARN au sein de formulations lipidiques ou micellaires. Les sondes fluorescentes (dont la SYBR[®] Gold) sont très largement employées pour évaluer l'efficacité d'encapsulation des acides nucléiques par des vecteurs médicamenteux. La sonde SYBR[®] Gold est l'une des plus sensibles actuellement disponibles sur le marché pour la détection de doubles mais aussi de simples brins d'ADN ou d'ARN.³⁵⁻³⁷ En présence d'acides nucléiques, cette sonde va s'intercaler entre les nucléobases provoquant une augmentation importante du rendement quantique de fluorescence (x 1000). Elle a donc été utilisée pour déterminer la quantité d'acides nucléiques non encapsulés restant en solution après complexation avec les formulations investiguées. Cette quantification suppose néanmoins que la sonde ne s'intercale qu'avec des acides nucléiques libres en solution soit non complexés avec les vecteurs médicamenteux. Pour cela, le mélange de vecteurs encapsulant l'acide nucléique et d'acides nucléiques libres peut être centrifugé pour séparer les nanovecteurs complexant des acides nucléiques libres. Cependant, la grande stabilité des vecteurs ne permet pas toujours leur précipitation et la quantification est donc souvent faite dans la suspension en présence de tous ses composants. Les résultats présentés au **Chapitre 5** démontrent clairement pour la première fois que cette sonde peut interagir avec des ss-siARN déjà complexés aux vecteurs. Cette interaction mène alors à des biais importants lors de la détermination du taux d'encapsulation en ss-siARN. Ce phénomène n'est observé qu'avec des vecteurs médicamenteux non-cationiques

(anioniques et neutres). En effet, il semble évident qu'en présence de vecteurs cationiques, la sonde SYBR[®] Gold n'interagit qu'avec les ss-siARN non encapsulés et libres en solution. Si ce phénomène n'a encore jamais été rapporté, cela peut très certainement s'expliquer par le fait que la grande majorité des études s'intéressent uniquement à l'encapsulation d'oligonucléotides à l'aide de vecteurs cationiques. Le motif cyanine de la sonde SYBR[®] Gold possède une charge positive permettant une interaction répulsive avec les vecteurs cationiques. En revanche, avec des vecteurs anioniques ou neutres, la charge positive supportée par le motif cyanine de la SYBR[®] Gold lui permet d'interagir avec ces nanovecteurs. Une investigation plus approfondie de l'interaction de la sonde SYBR[®] Gold avec les vecteurs médicamenteux non-cationiques est cependant délicate dans la mesure où la structure chimique complète de la sonde est difficilement mise à disposition par la société la commercialisant. L'interaction de la sonde SYBR[®] Gold avec des acides nucléiques déjà complexés définit clairement la limite de cette analyse ainsi que les analyses utilisant des sondes fluorescentes à base de motifs cyanines (ex : SYBR[®] Green). Néanmoins, l'étude des changements des propriétés fluorescentes de la sonde (anisotropie, déplacement du maximum d'émission et rendement quantique de fluorescence) a permis d'apporter des précisions quant à la localisation du ss-siARN au sein des vecteurs médicamenteux.

6.3.3 Avantages et perspectives des vecteurs médicamenteux non-cationiques pour la délivrance d'acides nucléiques

L'avantage premier des vecteurs non-cationiques pour la délivrance de ss-siARN est leur plus faible toxicité comparée à celle des systèmes cationiques qui engendrent une réponse inflammatoire importante.³⁸

L'étude de la délivrance de ss-siARN dans le cytoplasme permettrait d'investiguer le ciblage et le relargage d'oligonucléotides encapsulés dans les vecteurs non-cationiques présentés au **Chapitre 5**. Avec les vecteurs cationiques, la forte interaction entre l'acide nucléique et les charges cationiques peut rendre la délivrance du gène difficile. La difficulté des vecteurs cationiques à délivrer des acides nucléiques est d'autant plus problématique dans le cas d'une internalisation par endocytose. Cette délivrance doit s'effectuer

rapidement (sous 30 min) sous peine de voir l'acide nucléique dégradé par l'action conjuguée de plusieurs enzymes.³⁹ Un grand nombre de vecteurs cationiques pour la libération rapide et contrôlée d'acides nucléiques a été alors développé pour stimuler cette libération. Ces vecteurs utilisent avec plus ou moins de succès l'effet pompe à protons de la PEI,⁴⁰ la bascule de la conformation de lipide (dit « flipid »)⁴¹ ou bien le désassemblage de micelles stimulé par les variations de pH⁴² pour maximiser la délivrance de l'acide nucléique. Le contrôle de la nature des interactions entre le ss-siARN complexé et le vecteur médicamenteux pourrait être une nouvelle voie pour moduler la cinétique de libération de ces acides nucléiques, d'autant plus que les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes sont sensibles aux variations de pH pouvant avoir lieu au sein de l'organisme et à l'intérieur de la cellule.^{43, 44} Il serait également envisageable d'encapsuler des ss-siARN (ou autres acides nucléiques simples brins) dans des vecteurs médicamenteux à plusieurs compartiments via différentes natures d'interactions permettant plusieurs modes de délivrance.

Si l'efficacité de transfection des lipides et polymères cationiques permet une bonne internalisation du gène, le haut taux d'opsonisation et le court temps de circulation sanguine de ces vecteurs en font des systèmes extrêmement peu furtifs.^{45, 46} Pour obtenir un système à libération contrôlée de gène hautement efficace, un autre aspect à considérer est le ciblage de la délivrance. L'emploi de nanovecteurs ciblant des cellules spécifiques s'avère un des défis d'administration les plus étudiés de nos jours.⁴⁷ Actuellement, la stratégie de ciblage actif la plus utilisée pour ce type de problématique consiste à décorer le nanovecteur avec un ligand dont le récepteur est surexprimé à la surface de la membrane cellulaire cible. La spécificité du nanovecteur à cibler de manière sélective les cellules pathologiques peut alors être modulée via plusieurs paramètres telles la densité de greffage du ligand à la surface du nanovecteur, l'accessibilité et la mobilité du ligand à la surface du nanovecteur et l'affinité du couple ligand-récepteur. Pour permettre une meilleure accessibilité et mobilité du ligand, celui-ci peut être attaché de manière covalente à l'extrémité d'un polymère lui-même greffé sur le nanovecteur (le PEG est le plus souvent utilisé). Si l'affinité d'un couple ligand-récepteur ne peut pas être modifiée, à moins de changer les conditions environnementales, l'affinité apparente peut en revanche être modulée. Il est en effet possible de fournir une barrière énergétique permettant de contrôler

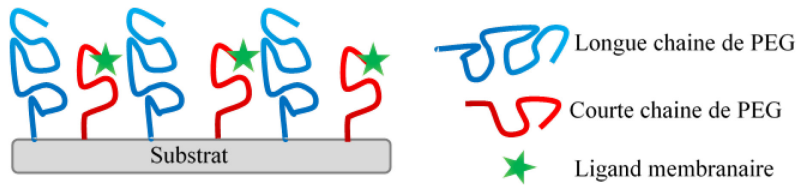


Figure 6.3 : Monocouche bimodale de PEG partiellement fonctionnalisée.

l'interaction du couple ligand-récepteur. Lorsque des ligands greffés en bout de chaînes de polymère sont « enterrés » dans une monocouche de polymère plus épaisse, une barrière énergétique de nature stérique doit alors être surmontée pour permettre l'interaction avec le récepteur membranaire (**Figure 6.3**). Des études théoriques portant sur des NPs possédant à leur surface ce type de revêtement fonctionnalisé bimodal ont démontré une adsorption préférentielle des NPs sur les surfaces possédant les récepteurs membranaires à hautes densités comparée à celles à faibles densités (**Figure 6.4**).⁴⁸ En revanche, avec des revêtements fonctionnalisés monomodaux, l'adsorption des NPs sur les surfaces supportant les récepteurs membranaires est indépendante de la densité en récepteur (**Figure 6.4**).⁴⁸ Les revêtements bimodaux fonctionnalisés semblent donc prometteurs pour permettre

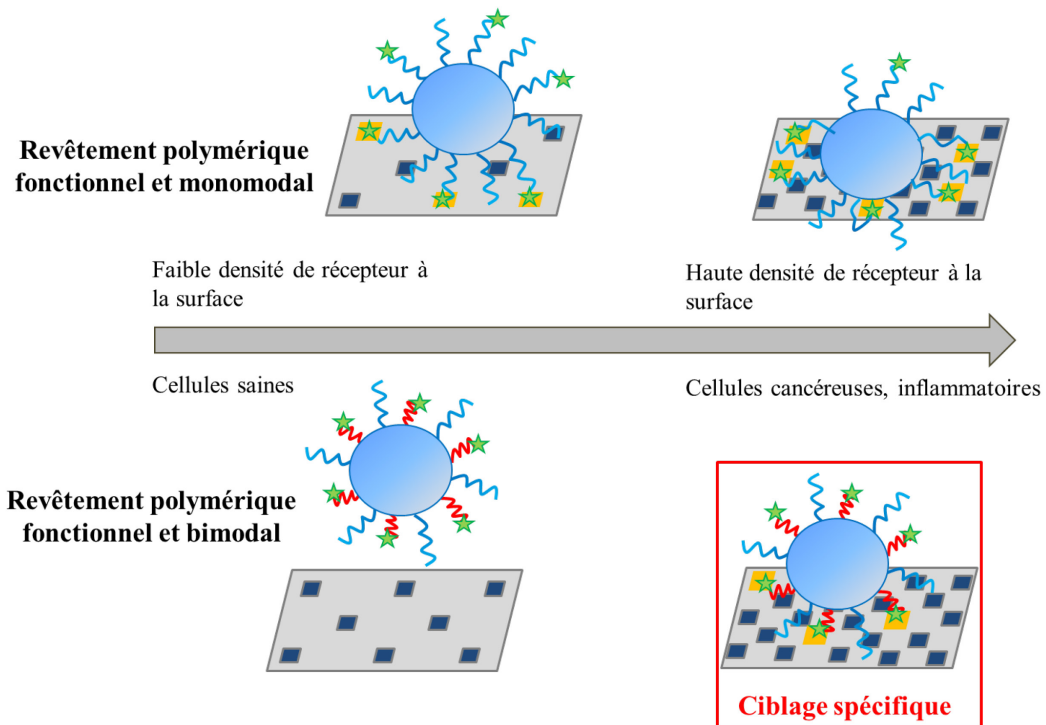


Figure 6.4 : Adsorption de NPs aux revêtements polymériques monomodaux et bimodaux fonctionnalisés avec un ligand sur des surfaces à hautes et faibles densités de récepteurs.

l'adsorption sélective en fonction de la densité de surface en récepteur et pourraient permettre le ciblage efficace des cellules cancéreuses ou inflammatoires.

Ce type de revêtement peut être produit à la surface de nanovecteurs non-cationiques via l'emploi de polymères fonctionnalisés en bout de chaînes. Des liposomes peuvent être formés à l'aide de lipides conjugués à un polymère supportant le ligand à son autre extrémité, l'exposant ainsi au milieu environnant. L'auto-assemblage micellaire à l'aide de deux types de copolymères amphiphiles possédant un bloc hydrophile de longueur variable permettrait également d'obtenir ce type de surface bimodale. La fonctionnalisation avec le ligand en bout de chaîne du segment hydrophile du copolymère le plus court permettrait d'obtenir les revêtements préalablement décrits.

6.4 Références

1. D. Aureau *et al.*, Controlled Deposition of Gold Nanoparticles on Well-Defined Organic Monolayer Grafted on Silicon Surfaces. *J. Phys. Chem. C* **114**, 14180-14186 (2010).
2. N. S. Bhairamadgi *et al.*, Hydrolytic and Thermal Stability of Organic Monolayers on Various Inorganic Substrates. *Langmuir* **30**, 5829–5839 (2014).
3. A. R. Yadav, R. Sriram, J. A. Carter, B. L. Miller, Comparative Study of Solution–Phase and Vapor–Phase Deposition of Aminosilanes on Silicon Dioxide Surfaces. *Mat. Sci Eng. C* **35**, 283-290 (2014).
4. J. A. Howarter, J. P. Youngblood, Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir* **22**, 11142-11147 (2006).
5. R. Chintala *et al.*, Electrical Properties of Amino SAM Layers Studied with Conductive AFM. *Eur. Polym. J.* **49**, 1952-1956 (2013).
6. X. Song, J. Zhai, Yilin Wang, L. Jiang, Self-Assembly of Amino-Functionalized Monolayers on Silicon Surfaces and Preparation of Superhydrophobic Surfaces Based on Alkanoic Acid Dual Layers and Surface Roughening. *J. Colloid Interface Sci.* **298**, 267-273 (2006).
7. B. Liberelle, X. Banquy, S. Giasson, Stability of Silanols and Grafted Alkylsilane Monolayers on Plasma-Activated Mica Surfaces. *Langmuir* **24**, 3280-3288 (2008).
8. Y. Tong *et al.*, Preferential Adsorption of Amino-Terminated Silane in a Binary Mixed Self-Assembled Monolayer. *Langmuir* **27**, 5420-5426 (2011).
9. S. G. Thakurta, A. Subramanian, Fabrication of Dense, Uniform Aminosilane Monolayers: A platform for Protein or Ligand Immobilization. *Colloids Surf. A* **414**, 384-392 (2012).
10. N. Rathor, S. Panda, Aminosilane Densities on Nanotextured Silicon. *Mat. Sci Eng. C* **29**, 2340–2345 (2009).
11. H. Sugimura *et al.*, Molecular Packing Density of a Self-assembled Monolayer Formed from N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltriethoxysilane by a Vapor Phase Process. *Chem. Commun.* **47**, 8841–8843 (2011).

12. T. Fischer *et al.*, Quantification of Variable Functional-Group Densities of Mixed-Silane Monolayers on Surfaces via a Dual-Mode Fluorescence and XPS Label. *Anal. Chem.* **87**, 2685–2692 (2015).
13. M. Zhu, M. Z. Lerum, W. Chen, How to Prepare Reproducible, Homogeneous, and Hydrolytically Stable Aminosilane-derived Layers on Silica. *Langmuir* **28**, 416-423 (2012).
14. M. Etienne, A. Walcarius, Analytical Investigation of the Chemical Reactivity and Stability of Aminopropyl-Grafted Silica in Aqueous Medium. *Talanta* **59**, 1173-1188 (2003).
15. E. Asenath-Smith, W. Chen, How To Prevent the Loss of Surface Functionality Derived from Aminosilanes. *Langmuir* **24**, 12405-12409 (2008).
16. O. Borozenko, V. Machado, W. G. Skene, S. Giasson, Organophosphonic Acids as Viable Linkers for the Covalent Attachment of Polyelectrolyte Brushes on Silica and Mica Surfaces. *Polym. Chem.* **5**, 5740-5750 (2014).
17. B. Quignon *et al.*, Sustained Frictional Instabilities on Nanodomed Surfaces: Stick-Slip Amplitude Coefficient. *ACS Nano* **7**, 10850–10862 (2013).
18. S. N. Ramakrishna, R. M. Espinosa-Marzal, V. V. Naik, P. C. Nalam, N. D. Spencer, Adhesion and Friction Properties of Polymer Brushes on Rough Surfaces: A Gradient Approach. *Langmuir* **29**, 15251–15259 (2013).
19. U. Raviv *et al.*, Normal and Frictional Forces Between Surfaces Bearing Polyelectrolyte Brushes. *Langmuir* **24**, 8678-8687 (2008).
20. M. Benz, N. Chen, J. Israelachvili, Lubrication and Wear Properties of Grafted Polyelectrolytes, Hyaluronan and Hylan, Measured in the Surface Forces Apparatus. *J. Biomed. Mater. Res. A* **71**, 6-15 (2004).
21. U. Raviv *et al.*, Lubrication by Charged Polymers. *Nature* **425**, 163-165 (2003).
22. Q. Rong, J. Bai, Y. Huang, J. Lin, Biomechanical Assessment of a Patient-specific Knee Implant Design Using Finite Element Method. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 353690 (2014).
23. J. Min *et al.*, Designer Dual Therapy Nanolayered Implant Coatings Eradicate Biofilms and Accelerate Bone Tissue Repair. *ACS Nano* **10**, 4441-4450 (2016).
24. J. Wei *et al.*, Investigation of Cell Behaviors on Thermo-responsive PNIPAM Microgel Films. *Colloids Surf., B* **132**, 202-207 (2015).
25. C. Pacholski, Two-Dimensional Arrays of Poly(N-Isopropylacrylamide) Microspheres: Formation, Characterization and Application. *Z. Phys. Chem.* **229**, 283-300 (2015).
26. H. Kawaguchi, Thermoresponsive microhydrogels: preparation, properties and applications. *Polymer International* **63**, 925-932 (2014).
27. J. Kim, M. J. Serpe, L. A. Lyon, Photoswitchable Microlens Arrays. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 1333-1336 (2005).
28. C.-Y. Chen *et al.*, Low-Friction Characteristics of Nanostructured Surfaces on Silicon Carbide for Water-Lubricated Seals. *Tribol. Lett.* **51**, 127-133 (2013).
29. G. Liu *et al.*, Hairy Polyelectrolyte Brushes-grafted Thermosensitive Microgels as Artificial Synovial Fluid for Simultaneous Biomimetic Lubrication and Arthritis Treatment. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 20452-20463 (2014).
30. M. N. Holme *et al.*, Shear-stress Sensitive Lenticular Vesicles for Targeted Drug Delivery. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 536-543 (2012).

31. I. Goldie, A. Nachemson, Synovial pH in Rheumatoid Knee-Joints I. The Effect of Synovectomy. *Acta. Orthop. Scand.* **40**, 634-641 (2009).
32. J. Adamcik, D. V. Klinov, G. Witz, S. K. Sekatskii, G. Dietler, Observation of Single-stranded DNA on Mica and Highly Oriented Pyrolytic Graphite by Atomic Force Microscopy. *FEBS Letters* **580**, 5671–5675 (2006).
33. H. J. Haringsma *et al.*, mRNA Knockdown by Single Strand RNA is Improved by Chemical Modifications. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4125–4136 (2012).
34. W. F. Lima *et al.*, Single-Stranded siRNAs Activate RNAi in Animals. *Cell* **150**, 883–894 (2012).
35. R. S. Tuma *et al.*, Characterization of SYBR Gold nucleic acid gel stain: a dye optimized for use with 300-nm ultraviolet *Anal. Chem.* **268**, 278-288 (1999).
36. R. P. Haugland, S. T. Yue, P. J. Millard, B. L. Roth, *U.S Patent No.* **5,436,134**, (1995).
37. S. T. Yue *et al.*, *U.S Patent No.* **5,658,751**, (1997).
38. Y. Tan, L. Huang, Overcoming the Inflammatory Toxicity of Cationic Gene Vectors. *J. Drug Target* **10**, 153-160 (2002).
39. A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H. J. Haisma, Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J Control Release* **151**, 220-228 (2011).
40. W. Liang, J. K. W. Lam, Endosomal Escape Pathways for Non-Viral Nucleic Acid Delivery Systems. (2012).
41. W. Viricel, A. Mbarek, J. Leblond, Switchable Lipids: Conformational Change for Fast pH-Triggered Cytoplasmic Delivery. *Angew Chem Int Ed Engl* **54**, 12743-12747 (2015).
42. A. M. Jhaveri, V. P. Torchilin, Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Front Pharmacol* **5**, 77 (2014).
43. M. Sotiropoulou, G. Bokias, G. Staikos, Soluble Hydrogen-Bonding Interpolymer Complexes and pH-controlled Thickening Phenomena in Water. *Macromolecules* **36**, 1349-1354 (2003).
44. R. Zangi, M. Hagen, B. J. Berne, Effect of ions on the hydrophobic interaction between two plates. *J Am Chem Soc* **129**, 4678-4686 (2007).
45. A. Malek *et al.*, In vivo Pharmacokinetics, Tissue Distribution and Underlying Mechanisms of Various PEI(–PEG)/siRNA Complexes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **236**, 97–108 (2009).
46. F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, O. C. Farokhzad, Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **5**, 505-515 (2008).
47. B. Yu, X. Zhao, L. J. Lee, R. J. Lee, Targeted Delivery Systems for Oligonucleotide Therapeutics. *AAPS J.* **11**, 195-203 (2009).
48. S. Wang, E. E. Dormidontova, Selectivity of Ligand-Receptor Interactions between Nanoparticle and Cell Surfaces. *Physical Review Letters* **109**, (2012).

Chapitre 7

Conclusion

Les études présentées dans ce manuscrit rapportent le comportement en milieu aqueux de trois types de surfaces pouvant être employées pour des applications diverses (revêtement lubrifiant, culture cellulaire, fonctionnalisation de surface ou bien délivrance de gènes). Ces travaux de recherche contribuent à l'élargissement des connaissances en matière de propriétés physico-chimiques de surface aux interfaces biologiques.

L'auto-assemblage d'aminoalkylsilanes a permis l'obtention de monocouches homogènes et extrêmement stables en milieu aqueux rendant possible leur utilisation pour de longue durée en milieux biologiques. La réactivité chimique de ces surfaces amino-fonctionnalisées a permis l'immobilisation chimique et physique de particules, de polymères mais aussi de biomolécules (tel que des oligonucléotides).

À partir de l'immobilisation chimiques de particules, des surfaces aux réseaux colloïdaux moux et durs bidimensionnels ont alors été préparées. L'étude des propriétés lubrifiantes en milieu aqueux de ces surfaces structurées ont alors permis la mise en évidence de deux mécanismes contrôlant les propriétés de frottement. Les surfaces structurées molles à base de polyélectrolytes présentent des propriétés de frottement directement corrélées au gonflement et donc à la teneur en eau de ces structures. En revanche, avec des structures dures, les propriétés de frottement sont principalement contrôlées par le roulement.

Les monocouches auto-assemblées à base d'alkylsilanes et d'aminoalkylsilanes sur des substrats de mica ont servi de modèles pour étudier la complexation de simples brins de siARN. Les interactions non-électrostatiques mises en jeu lors la complexation de cet oligonucléotide avec ces surfaces ont permis de démontrer la possibilité d'utiliser des micelles et des liposomes neutres et anioniques peu toxiques pour la délivrance d'acides nucléiques.

En conclusion, la surface d'un biomatériau peut être modulée de manière à apporter des propriétés spécifiques pouvant différer de celle du cœur du matériau. Néanmoins, un fin contrôle de ces propriétés peut s'avérer délicat et nécessite une bonne compréhension des mécanismes physico-chimiques ayant lieu à l'interface biologique.